

# 食物过敏原结构变化的光谱学研究进展

白雨鑫<sup>1,2</sup>, 李欣<sup>1,2</sup>, 赵丽霞<sup>3</sup>, 陈红兵<sup>1,4</sup>, 高金燕<sup>1,2,\*</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.南昌大学生命科学与食品工程学院食品系, 江西 南昌 330047; 3.江西省食品工业研究所, 江西 南昌 330029; 4.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 光谱学方法已广泛应用于研究食物过敏原结构的变化。常用的光谱学方法包括圆二色光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱、拉曼光谱、紫外吸收光谱等, 其中圆二色光谱仅应用于澄清的稀溶液中, 常研究过敏原二级、三级结构变化; 傅里叶变换红外光谱不受过敏原相对分子质量大小、光散射以及荧光的影响, 其酰胺 I 带对于过敏原二级结构的研究最有价值; 拉曼光谱采用光子探针, 对微克级样品无损伤探测, 适用于稀有、珍贵样品; 荧光光谱多用于研究过敏原在变性过程中疏水性以及微环境变化; 紫外吸收光谱在结构鉴定中需与其他光谱方法密切配合。前 3 种方法均可以确定过敏原二级结构的类型和相对含量, 各方法的具体应用仍然值得进一步探索。

**关键词:** 蛋白结构; 光谱学; 过敏原; 食物过敏

## Progress in Spectroscopic Research on Structural Changes of Food Allergens

BAI Yu-xin<sup>1,2</sup>, LI Xin<sup>1,2</sup>, ZHAO Li-xia<sup>3</sup>, CHEN Hong-bing<sup>1,4</sup>, GAO Jin-yan<sup>1,2,\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
2. Department of Food Science, School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
3. Jiangxi Food Industrial Research Institute, Nanchang 330029, China;  
4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Spectroscopy has been widely used in the investigation of structural change of food allergens. The commonly used spectroscopic techniques include circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy and UV absorption spectroscopy. CD is often used to define the change in secondary and tertiary structures of allergens, but is restricted to clear low-concentration solutions only. FTIR can override influence of allergen molecular weight, light scattering and fluorescent light. FTIR amide I band is the most valuable for the analysis of secondary structure of allergens. Raman spectroscopy with photon probe is suitable for non-destructive detection of rare and precious microgram-scale samples. Fluorescence spectroscopy is often used to define hydrophobic and microenvironmental changes of allergens in the course of denaturation, and UV absorption spectroscopy needs to be coordinated closely with other spectroscopic methods for structural identification. In addition, CD, fluorescence spectroscopy and FTIR are available for characterizing the type and relative content of secondary structure of food allergens, and their specific applications are still worthy of further exploration.

**Key words:** protein structure; spectroscopy; allergen; food allergy

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0284-06

食物过敏是食品安全的热点问题之一。目前约有 5% 的儿童和 1%~2% 的成人对食物过敏<sup>[1]</sup>。据报道, 引起过敏的食物大约有 160 多种, 其中八大类食物引起的

过敏占 90%, 包括牛奶、大豆、鸡蛋、小麦、大米、花生、鱼、贝类<sup>[2]</sup>。同时, 大部分食物在生产或加工过程中, 会引起食物过敏原结构的改变而影响其过敏原

收稿日期: 2011-08-31

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0704);

国家自然科学基金项目(31060215; 30860220; 31171716; 21162019);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-MB-201002)

作者简介: 白雨鑫(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: baiyuxin.77@163.com

\* 通信作者: 高金燕(1967—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: gjy1967@yahoo.com.cn

性质。因此,过敏原结构的变化备受关注。

迄今为止,应用于蛋白质结构检测的方法众多,并且大多已应用于测定食物中过敏蛋白的结构变化。X射线晶体衍射分析、电子显微镜三维重构、核磁共振分析是结构生物学3种主要研究手段,它们对蛋白质微观结构分析精确,在蛋白质结构研究领域受到广泛重视。但是这些技术均有其固有局限性,其中,X射线晶体衍射的被测对象只能是单晶的结构,操作过程复杂、费时;核磁共振对被测蛋白质存在一定的分子量上限,并且需求量大;电子显微镜三维重构需将研究对象制备成特殊的样品,且只能研究三级结构和四级结构层面的信息,信息量较少。因此,在便捷程度和检测速度等方面,难以满足实际应用的需求。

目前,光谱学方法已广泛应用于检测加工后食物过敏原结构的变化,该方法灵敏度高、选择性强、样品用量少、方法简便,可以在分子水平表征过敏原结构的细微变化。尽管检测食物过敏原结构变化的光谱学方法众多,但主要包括圆二色光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱、拉曼光谱、紫外吸收光谱等。因此,将介绍这些光谱学的主要原理,并综述它们在食物过敏原结构研究中的应用进展,将为开展相关的研究提供有价值的参考信息。

## 1 蛋白质结构研究的光谱学方法

随着现代仪器分析的不断发展和光谱学技术在蛋白质结构研究中得到了广泛和深入的应用,为蛋白质结构研究提供了强有力的技术支撑,以下是主要技术原理。

### 1.1 圆二色光谱

1969年,Greenfield等<sup>[3]</sup>最早用圆二色光谱(circular dichroism, CD)数据预测蛋白质的构象,随着研究的深入,远紫外CD数据可用于分析蛋白质二级结构<sup>[4]</sup>,而且远紫外CD光谱辨认蛋白质三级结构也逐渐得到发展。另外,最近研究发现,近紫外圆二色可作为一种灵敏的光谱探针反映蛋白质中芳香氨基酸残基和二硫键的变化<sup>[5]</sup>。

在蛋白质分子中,肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基以及二硫键是主要的光活性生色团,一束平面偏振光通过这些生色团时,由于它们对左、右圆偏振光的吸收 $\varepsilon_l$ 和 $\varepsilon_r$ 不同,其差值 $\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r$ 就是圆二色性<sup>[6]</sup>, $\Delta\varepsilon$ 使得左、右圆偏振光叠加而形成了椭圆偏振光,故圆二色也常用摩尔椭圆率 $[\theta]$ 来度量,单位为 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$ , $[\theta] = 3300(\varepsilon_l - \varepsilon_r) = 3300\Delta\varepsilon$ 。一般光活性物质的圆二色性与波长有关,如果按照一定波长扫描光活性物质,便得到它的CD光谱图,由此谱图便可以得到其结构的相关信息。在近紫外区段190~

240nm,主要的生色团是肽键,这一范围的CD谱包含着蛋白质主链结构的信息,主要应用于蛋白质二级结构的解析;在近紫外区段240~300nm,占支配地位的生色团是芳香氨基酸侧链,这一区域的CD谱能反映芳香氨基酸残基以及二硫键微环境的信息,主要应用于研究蛋白质三级结构的精细变化<sup>[7]</sup>。

### 1.2 荧光光谱

从第一电子激发态的最低振动能级返回基态的不同振动能级,如果能量以光子形式释放,则放出的光称为荧光,从1575年首次记录荧光现象以来,直到1852年,Stokes才提出了“荧光”这一术语;20世纪50年代有研究发现,在生物分子中有各种类型的荧光生色物质,每一种荧光物质都有一定的浓度、吸收谱和发射谱。目前,荧光光谱用于蛋白质结构研究方法包括两种,一种是测定蛋白质自身的荧光,另一种是蛋白质自身不具有内源荧光时,引入外源荧光<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.1 蛋白质的内源荧光

荧光来源于生色团在不同电子能级之间的跃迁,荧光频率取决于能级之间的能量差,蛋白质结构的变化可以导致生色团处于激发态时所具有的能量,从而使荧光频率与强度发生变化,通过检测某种荧光特性参数(包括激发谱、发射谱、荧光强度、量子产率、荧光寿命等)的变化,从而对某些结构和性质进行表征<sup>[9]</sup>。蛋白质的内源性荧光主要来自色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)以及苯丙氨酸(Phe)<sup>[8]</sup>。Phe在绝大多数实验条件下不被激发,故而很少能观察到Phe的发射谱;Trp发出的荧光谱在整个蛋白质的荧光谱中占统治地位;另一芳香族Tyr吸收的能量通常不是自己通过荧光发射释放出来,而是传递给Trp。在同时含有Trp和Tyr的蛋白质中,由于发生了Tyr到Trp的能量转移,从而导致Trp的荧光猝灭和Trp的荧光增强,故而常以Trp为基准来研究蛋白质溶液的构象<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.2 蛋白质的外源荧光

在研究一些不具有内源荧光的蛋白质时,我们通常将一些能产生稳定荧光的小分子,结合或插入蛋白质中,根据这些较小的荧光分子性质的改变,分析蛋白质结构的变化<sup>[10]</sup>。荧光探针常用以研究蛋白质在水溶液中的构象,这是因为它在不同的极性介质中有着不同的光谱特性、荧光量子产率以及荧光寿命<sup>[11]</sup>。到目前为止,用以测定蛋白质疏水微区、结构变化的荧光探针种类繁多,其中8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)是应用最普遍的一种疏水探针。

### 1.3 傅里叶变换红外光谱

自1801年发现红外辐射以来,红外技术经过了200多年的发展,在电子学、光学和电子计算机迅速发展

的基础之上,继棱镜光谱、光栅光谱之后,20世纪70年代出现了傅里叶变换红外光谱(FTIR),经过发展,该技术广泛地用于蛋白质、核酸等大分子的结构研究。

由连续波长的红外光源照射样品,未被样品吸收的光到达检测器,这些光信号经过模数转换,再经过傅里叶变换,即可以得到样品的单光束光谱,扣除背景的单光束光谱即得到样品的红外透射光谱<sup>[12]</sup>。通过对蛋白质酰胺吸收带去卷积、二阶导数和拟合分析,可以观察蛋白质在变性条件下产生的新构象、去折叠而引起的二级结构及其相对含量的变化<sup>[13]</sup>。蛋白质在红外区有若干特征吸收带,酰胺I、II带具有二级结构研究的价值,由于蛋白质红外光谱中酰胺III带信号较弱,过去很少用于蛋白质二级结构分析,但是最近发现不同的二级结构在酰胺III带的光谱性质特征明显,尤其对于酰胺I带中因谱峰重叠难以区分的螺旋和无规则卷曲结构,在此谱带中得以明显分离<sup>[14]</sup>。

#### 1.4 拉曼光谱

自20世纪60年代中期激光被用来作为拉曼光谱仪的激发光源后,拉曼光谱技术进入了崭新的历史时期。拉曼光谱已广泛应用于蛋白质分子结构的研究,其中包括表征蛋白质中氨基酸残基以及二级结构的变化<sup>[15]</sup>。

拉曼光谱是一种散射光谱,当入射光照射到物质上时会发生弹性散射,散射光中除有与激发光波长相同的弹性成分(瑞利散射)外,还有比激发光波长更长和更短的成分,后一现象称为拉曼效应。拉曼效应是光与物质分子进行能量交换发生非弹性碰撞的结果,该过程改变了光子的运动方向以及频率。拉曼位移、拉曼频率及强度、偏振等与入射光无关,与散射物质的振动和转动频率有关,从而可以推导出物质结构及组成成分。拉曼光谱和红外光谱都是研究蛋白质的酰胺带,拉曼光谱测定蛋白质主链结构,主要研究酰胺I带和酰胺III带,还用于侧链构型的研究,侧链构型主要是测定二硫键的构型以及氨基酸残基的环境<sup>[16]</sup>。

#### 1.5 紫外吸收光谱

紫外吸收光谱产生于价电子和分子轨道上的电子在电子能级间的跃迁。当分子受到光的照射时,入射光的能量( $h\nu$ )传递给分子,使处于稳定的基态分子跃迁到激发态,只有当激发态和基态的能量差 $\Delta E$ 与 $h\nu$ 相等时才能发生吸收,不同的分子因为结构的不同而具有不同的 $\Delta E$ ,故而对光的吸收也不同<sup>[17]</sup>。

蛋白质在紫外光范围(250~300nm)内的光吸收主要来自于色氨酸和酪氨酸,其次是苯丙氨酸、组氨酸和半胱氨酸的电子激发,此外还有肽键对光的强烈吸收。色氨酸和酪氨酸在280nm波长附近有吸收峰;苯丙氨酸在257nm波长附近有吸收峰;而肽键在225nm波长附近有特征吸收峰<sup>[18]</sup>。因此,利用紫外光谱可以考察到芳香

氨基酸残基在蛋白质分子中的位置、环境以及数量的变化,用以表征蛋白质二、三级结构的变化。

## 2 光谱学技术在食物过敏原结构变化中的应用

光谱学方法可以检测食物过敏原结构,帮助人们认识过敏原,对阐明过敏原结构与功能之间的关系具有重要价值。迄今为止,已经开展了不少卓有成效的工作,取得了不少新的研究进展。

### 2.1 圆二色光谱的应用

目前,CD光谱主要应用于检测过敏原二级结构的变化。Chakraborty等<sup>[9]</sup>运用CD光谱研究不同pH值下酪蛋白的结构变化,发现生理pH7.4条件下,处于自然状态的两 $\alpha_s$ -酪蛋白的 $\alpha$ -螺旋含量很高,然而 $\beta$ -和 $\kappa$ -酪蛋白主要包含不规则卷曲和 $\beta$ -折叠;碱性pH值条件下,二级结构没有显示实质性的变化;当pH值从7.4降至2.5, $\alpha_s$ -酪蛋白的二级结构部分丢失,不规则卷曲占有优势, $\beta$ -和 $\kappa$ -酪蛋白的不规则卷曲被折叠和螺旋代替。对牛乳中另一主要过敏原 $\beta$ -乳球蛋白,Kim等<sup>[19]</sup>研究发现,在80℃的中性环境下将天然 $\beta$ -乳球蛋白加热5min, $\alpha$ -螺旋从原来的16%降低到12%,不规则卷曲的含量从38%增加到43%,随后时间延长到15min或30min时,该蛋白二级结构的变化几乎可以忽略<sup>[20]</sup>。Liu Guangming等<sup>[21]</sup>通过研究温度对南美白对虾过敏原——原肌球蛋白结构的影响,发现在45℃时,该蛋白特有的 $\alpha$ -螺旋结构消失,蛋白处于去折叠状态。另外,黄惠华等<sup>[22]</sup>利用超声波钝化过敏原Kunitz型大豆胰蛋白酶抑制剂(SKTI)的活性,发现该过敏蛋白的CD光谱受超声波影响较大, $\beta$ -折叠的比例增大, $\beta$ -转角以及无规则卷曲减少,说明SKTI的二级结构在超声波中的稳定性较低。

随着圆二色谱与其他现代分析仪器的联用,能有效地反映出食物过敏原结构变化中的热力学和动力学信息。但是,由于计算出完整的蛋白质二级结构需要参考蛋白体系,参考体系过于简单易丢失一些二级结构信息。因此,过敏原参考体系的完善将成为今后的一大重要工作。

### 2.2 荧光光谱的应用

#### 2.2.1 内源性荧光光谱

吴序栋等<sup>[23]</sup>利用荧光光谱研究了加热过程中鸡蛋中的主要过敏原鸡蛋溶菌酶蛋白的构象变化,实验结果发现鸡蛋溶菌酶蛋白的荧光强度随着温度升高而减弱,说明在热变性过程中,疏水键和氢键遭到了破坏,影响了过敏原蛋白的三级结构。Cairolì等<sup>[24]</sup>也发现,当 $\beta$ -乳球蛋白加热到65℃以上并迅速恢复到室温的情况下,色氨酸的荧光强度发生了不可逆转的增强,并且

发现在 pH 值为 7、5.5 和 4 的条件下, 其强度分别增长为原来的 2、8 倍和 5 倍<sup>[25]</sup>。近年来, 荧光光谱方法发展迅速, 一些新型荧光分析技术逐渐广泛地应用于食物过敏蛋白结构变化的研究, 如张国文等<sup>[26]</sup>通过运用三维荧光光谱和同步荧光光谱技术探讨橙皮苷对牛乳过敏原 BSA 构象的影响, 随着橙皮苷浓度的增加, 同步荧光光谱图显示出, 色氨酸残基和酪氨酸残基的  $\lambda_{\text{ex}}$  发生了明显的蓝移和红移, 这反映 BSA 腔内疏水环境的极性增大, 肽链的伸展程度可能有所增加; 同时, 还测定了 BSA 和 BSA-橙皮苷体系的三维荧光光谱, 由该谱图可以获得激发波长和发射波长同时变化的荧光强度信号, 直观地反映出橙皮苷分子的加入, 导致了 BSA 疏水微环境的变化。

随着其他学科的发展, 近年来出现了一些新荧光光谱技术, 例如同步荧光光谱法、三维荧光光谱法、荧光共振能量转移、时间分辨荧光光谱等, 这些技术应用于食物过敏原结构的检测, 均具有各自的优越性, 但仍在继续探索中。

### 2.2.2 荧光探针

涂宗财等<sup>[27]</sup>利用 ANS 探针研究经过高压微射流处理的鸡蛋过敏原卵清蛋白的结构变化, 发现随着压力的增加, 该蛋白的荧光强度增强, 120MPa 时达到最大, 由此可知高压处理可以增强卵清蛋白的表面疏水性。利用荧光分光光度计检测 ANS 与  $\beta$ -乳球蛋白形成的复合物可以了解该蛋白质疏水区域的结构变化。因此, Das 等<sup>[28]</sup>研究发现, 在 pH5.5 的溶液中,  $\beta$ -乳球蛋白的表面疏水性最小, 当 pH 值升至 7 或降至 4 的时候, 其疏水性均有所增加。该方法也可以应用于辐照处理后的过敏蛋白结构变化的检测, 电离辐射对蛋白质结构的影响主要是打断了肽键、氢键、二硫键, 使肽链发生交联以及氨基酸的化学变化<sup>[29]</sup>, 张明琦等<sup>[30]</sup>通过研究辐照前后蟹过敏蛋白-ANS 荧光强度的变化, 发现辐照后蟹过敏蛋白的疏水性基团暴露在分子表面。在不同的 HCl 浓度条件下, SKTI 会发生不同程度的折叠。另外, Roychaudhuri 等<sup>[31]</sup>利用 ANS 探针研究天然的去折叠蛋白, 发现 HCl 浓度分别为 19、80、190mmol/L 时, SKTI 的荧光强度均显著增大, 并且影响 ANS 进入其疏水核中; HCl 浓度达到 1900mmol/L 时, 荧光强度急剧下降, 显示出 SKTI 的完全变性导致三级结构的丢失。

到目前为止, 产生了越来越多形式和类型的探针, 在食物过敏原结构研究方面也愈见广泛, 除了常用的近红外区和紫外-可见区的荧光探针<sup>[32]</sup>外, 荧光共振能量转移探针能够测量自由状态的单分子过敏原折叠的表面自由能特征。但是, 这些荧光探针着重于表征过敏原结构的变化, 未能达到预示过敏性变化的目的。因此, 我们将不断探索荧光探针对过敏原结构的监测以表征过敏原性的变化。

### 2.3 傅里叶变换红外光谱的应用

据 Smith 等<sup>[33]</sup>报道, 过敏原卵白蛋白经过 400MPa 以上的高压处理后, 傅里叶变换红外谱图显示出二级结构发生了不可逆的改变,  $\alpha$ -螺旋含量增加, 同时  $\beta$ -折叠的含量减少。由于该二级结构存在着连续的表位, 因此二级结构的丢失可能影响了卵白蛋白的过敏性。Navarra 等<sup>[34]</sup>运用傅里叶红外技术研究了  $\beta$ -乳球蛋白在热聚合过程中不同的金属离子对其构象的影响, 发现在较低温度下锌离子能够促进  $\beta$ -乳球蛋白的聚合作用; 铜离子的结合使  $\beta$ -乳球蛋白的二级结构发生了变化, 并且形成了更强的分子内氢键。Murayama 等<sup>[35]</sup>利用傅里叶变换红外谱图研究温度对牛血清白蛋白的构象影响发现, 牛血清白蛋白在加热过程中二级结构发生了变化, 随着温度的升高,  $\alpha$ -螺旋含量逐渐降低, 而  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角的含量逐渐增加。Somkuti 等<sup>[36]</sup>对苹果中的过敏原 Mal d 1 的结构变化进行研究, 发现当温度在 60℃ 以上, 酰胺 I 带具有典型的无序结构特征; 在较高的温度下, 红外图谱中显示出显著的特征, 在 1616cm<sup>-1</sup> 和 1685cm<sup>-1</sup> 出现了一个较强和一个较弱的旁带, 据 Meersman 等<sup>[37]</sup>研究报道, 这些谱带的产生与分子内如同聚合结构一样的  $\beta$ -折叠有关。

作为最近 20 年发展起来的新光谱技术, FTIR 快速地应用于多种蛋白质结构的测定, 并且成为了研究食物过敏原二级结构变化的主要手段之一。另外, 在研究蛋白质结构变化的基础之上发展起来的衰减全反射傅里叶变换红外光谱、二维相关傅里叶变换红外光谱等也将迅速应用于过敏原结构研究之中。

### 2.4 拉曼光谱的应用

目前, 拉曼光谱主要用于测定食物过敏原二级结构中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和不规则卷曲的含量<sup>[38]</sup>。Herrero 等<sup>[39]</sup>通过研究大豆蛋白热处理后的拉曼光谱图发现, 加热至 70、100、200℃ 时, 大豆蛋白的二级结构没有显著的变化, 但是其疏水基的环境发生了改变, 由 1340cm<sup>-1</sup> 处谱带的增强显示出暴露于溶剂中的色氨酸残基增多。拉曼光谱日益广泛地用于检测未折叠蛋白的结构变化, 因为该状态的蛋白具有监控二级结构变化的能力。Ashton 等<sup>[40]</sup>运用拉曼光谱研究了 pH 值诱导  $\alpha$ -乳白蛋白的结构变化, 发现 pH 值为 6.5~4.6 和 4.6~3.6 的时候, 主要是  $\beta$ -折叠发生了变化; pH 值为 3.6~1.8 的时候, 二级结构以及侧链上暴露于溶剂中的氨基酸残基均发生了变化。由于蛋白修饰技术通常改变了蛋白质二级和三级结构, Ferrer 等<sup>[41]</sup>将 3 种不同浓度的硬脂酸乳酸钠(SSL)应用于小麦中谷蛋白的化学修饰, 由拉曼光谱图发现, 添加 SSL 使得酰胺 I 带中 1657cm<sup>-1</sup> (表征  $\alpha$ -螺旋结构) 处光谱强度增加, 然而添加 0.5% 和 1%

的SSL使得1613~1625 $\text{cm}^{-1}$ (表征 $\beta$ -折叠结构)处光谱强度降低,并且0.25% SSL-谷蛋白的结构表征在该酰胺带中消失。

20世纪90年代兴起的新技术——傅里叶变换拉曼光谱使用1064nm的近红外激光照射样品,大大减弱荧光背景,克服了之前不适用荧光样品的缺陷。目前,拉曼光谱可快速、简单、无损伤地用于过敏原结构的分析,并且完全不受过敏原状态的影响,这为将来进一步研究过敏原性创造了有利条件。

## 2.5 紫外吸收光谱的应用

胡纯秋等<sup>[42]</sup>采用不同温度和时间加热花生过敏原Ara h 2后,经过紫外光谱扫描发现加热温度高于55℃的时候,包埋在蛋白质分子内部的氨基酸残基暴露出来,它的紫外吸光度升高。由于色氨酸的贡献, $\beta$ -乳球蛋白在近紫外-可见光谱中最大吸收在280nm波长处,但当它与阴离子磷脂DMPG结合之后,吸收光谱没有明显的变化,却发生了轻微的减色效应。究其原因,Liu Xiaohua等<sup>[43]</sup>结合其他光谱分析发现DMPG的结合使 $\beta$ -乳球蛋白二级结构以及色氨酸残基微环境发生了变化。Su Rongxin等<sup>[44]</sup>则利用二阶导数紫外分光光度法进一步研究牛血清白蛋白在热处理后苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的暴露情况,发现苯丙氨酸在较高的温度趋向于非极性环境,在70℃左右,色氨酸和酪氨酸暴露于极性溶剂中。另外,Ruso等<sup>[45]</sup>研究发现,在过敏原溶菌酶溶液中加入表面活性剂——十五氟代辛酸钠,导致该溶菌酶生色团的紫外吸收光谱发生变化,由此可反映出氨基酸微环境的变化,并推断出该过敏原蛋白质分子的构象变化趋势。

在实际检测中,食物过敏原的紫外光谱所反映的是分子中发色基团和助色基团的特性,而不是整个过敏原分子的特性。所以,单独从紫外吸收光谱不能完全表征过敏原的分子结构,必须与其他光谱学方法相配合,提供一些重要的辅助检测信息。

## 3 结 语

光谱学方法是研究过敏原蛋白结构的一个重要工具,它具有操作简单、用量较少、灵敏度高、检测快速等优势。因此,该方法已广泛应用于检测食物过敏原加工后结构的变化。由于每种方法都存在一些局限性,对过敏原结构变化的研究提出了新的挑战。但是,随着各学科的发展,光谱学技术之间的联用或与其他分析技术的联用,将在一定程度上促进过敏原结构的研究。

另外,在食物过敏原结构的研究中,很少有报道阐明过敏原结构与免疫学性质的对应关系。因此,运用光谱学方法检测食物过敏原结构的变化,并用以阐明其免疫学性质变化的物质基础将会成为一个重要的研究

方向。光谱学检测作为一种快速、准确的检测食物过敏原结构变化的方法,必将推动这一研究的深入开展。

## 参考文献:

- [1] KAGAN R S. Food allergy: an overview[J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(2): 223-225.
- [2] FERNANDEZ-RIVAS M, BOLHAAR S, GONZALEZ-MANCEBO E, et al. Apple allergy across europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods[J]. Journal of Allergy Clinical Immunol, 2006, 118(2): 481-488.
- [3] GREENFIELD N, FASMAN G D. Computed circular dichroism spectra the evaluation of protein conformation[J]. Biochemistry, 1969, 8(10): 4108-4116.
- [4] JOHNSON W C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures[J]. Proteins Structure Function and Bioinformatics, 1999, 35(3): 307-312.
- [5] DOCKAL M, CARTER D C, RUKER F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH[J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3042-3050.
- [6] 梁毅. 结构生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 261-267.
- [7] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. 分析化学评述与进展, 2004, 32(3): 388-394.
- [8] CRONEY J C, JAMESON D M, LEARMONTH R P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations[J]. Biochem Mol Biol Ed, 2001, 29(2): 60-65.
- [9] CHAKRABORTY A, BASAK S. pH-induced structural transitions of caseins[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2007, 87(3): 191-199.
- [10] 梁毅. 结构生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 255-256.
- [11] GASYMOV O K, GLASGOW B J. ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins[J]. Biochimica Biophys Acta, 2007, 1774(3): 403-11.
- [12] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 1-2.
- [13] JACKSON M, MANTSCH H H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995, 30(2): 95-120.
- [14] RUCKEBUSCH C, NEDJAR-ARROUME N, MAGAZZENI S, et al. Hydrolysis of haemoglobin surveyed by infrared spectroscopy: I. solvent effect on the secondary structure of haemoglobin[J]. Journal of Molecular Structure, 1999, 478(1/3): 185-191.
- [15] 朱自莹, 顾仁敖. 中国拉曼光谱研究十年(1981—1991)[J]. 光谱学与光谱分析, 1993, 13(1): 47-82.
- [16] CAREY P R. Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies[M]. New York: Academic Press, 1982: 77.
- [17] RUO J M, GONZALEZ-PEREZ A, PRIETO G, et al. Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different surfactant-protein ratios[J]. Int J Biol Macromol, 2003, 33(1/3): 67-73.
- [18] 吴丹, 徐桂英. 光谱法研究蛋白质与表面活性剂的相互作用[J]. 物理化学学报, 2006, 22(2): 254-260.
- [19] KIM D A, CORNEC M, NARSIMHAN G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of  $\beta$ -lactoglobulin[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 285(1): 100-109.
- [20] BOYE J I, ISMAIL A A, ALLI I. Effects of physicochemical factors on the secondary structure of beta-lactoglobulin[J]. J Dairy Res. 1996, 63(1): 97-109.

- [21] LIU Guangming, CHENG H, NESBIT J B, et al. Effects of boiling on the IgE-binding properties of tropomyosin of shrimp(*Litopenaeus vannamei*)[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(1): T1-T5.
- [22] 黄惠华, 梁汉文, 郭乾初. 超声波对大豆胰蛋白酶抑制剂活性及二级结构的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 29-33.
- [23] 吴序栎, 朱倩倩, 成小娟, 等. 光谱法研究鸡蛋溶菌酶热变性 with 免疫原性的关系[J]. 分析化学研究报告, 2011, 39(2): 198-201.
- [24] CAIROLI S, IAMETTI S, BONOMI F. Reversible and irreversible modifications of beta-lactoglobulin upon exposure to heat[J]. J Protein Chem, 1994, 13(3): 347-54.
- [25] LALIGANT A, DUMAY E, VALENCIA C C, et al. Surface hydrophobicity and aggregation of beta-lactoglobulin heated near neutral pH[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(12): 2147-2155.
- [26] 张国文, 王安萍, 蒋婷, 等. 荧光光谱法研究橙皮苷与牛血清白蛋白相互作用特征[J]. 分析实验室, 2008, 27(1): 1-4.
- [27] 涂宗财, 王辉, 刘光宪, 等. 动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 495-498.
- [28] DAS K P, KINSELLA J E. Effect of heat denaturation on the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin at the oil/water interface and on coalescence stability of emulsions[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1990, 139(2): 551-560.
- [29] CIESLA K, VANSANT E F. Physico-chemical changes taking place in gamma irradiated bovine globulins studied by thermal analysis[J]. J Therm Anal Calorim, 2010, 99(1): 315-324.
- [30] 张明琦, 高美须, 支玉香, 等. 辐照对蟹过敏蛋白生化性质和抗原性的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3259-3264.
- [31] ROYCHAUDHURI R, SARATH G, ZEECE M, et al. Stability of the allergenic soybean Kunitz trypsin inhibitor[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2004, 1699(1/2): 207-212.
- [32] 陈蓁蓁, 张宁, 张文申, 等. 蛋白质分子荧光探针研究及其应用新进展[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1341-1347.
- [33] SMITH D, GALAZKA V B, WELLNER N, et al. High pressure unfolding of ovalbumin[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2000, 35(4): 361-370.
- [34] NAVARRA G, LEONE M, MILITELLO V, et al. Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin: aggregation kinetics and structural changes[J]. J Inorg Biochem, 2009, 103(12): 1729-1738.
- [35] MURAYAMA K, TOMIDA M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Biochemistry, 2004, 43(36): 11526-11532.
- [36] SOMKUTI J, HOUSKA M, SMELLER L. Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d 1[J]. Eur Biophys J, 2011, 40(2): 143-151.
- [37] MEERSMAN F, HEREMANS K. High pressure induces the formation of aggregation-prone states of protein under reducing conditions[J]. Biophys Chem, 2003, 104(1): 297-304.
- [38] ALIX A J P, PEDANDOU G, BERJOT M. Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide I band[J]. Journal of Molecular Structure, 1988, 174: 159-164.
- [39] HERRERO A M, JIMENEZ-COLMENERO F, CARMONA P. Elucidation of structural changes in soy protein isolate upon heating by Raman spectroscopy[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(4): 711-717.
- [40] ASHTON L, BLANCH E W. pH-induced conformational transitions in  $\alpha$ -lactalbumin investigated with two-dimensional Raman correlation variance plots and moving windows[J]. Journal of Molecular Structure, 2010, 974(1/3): 132-138.
- [41] FERRER E G, GOMEZ A V, ANON M C, et al. Structural changes in gluten protein structure after addition of emulsifier. A Raman spectroscopy study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(1): 278-281.
- [42] 胡纯秋, 高金燕, 陈红兵, 等. 热加工对花生过敏原 Ara h 2 抗原性及构象的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2550-2554.
- [43] LIU Xiaohua, SHANG Li, JIANG Xiue, et al. Conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin induced by anionic phospholipid[J]. Biophysical Chemistry, 2006, 121(3): 218-223.
- [44] SU Rongxin, QI Wei, HE Zhimin, et al. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(6): 995-1005.
- [45] RUSO J M, GONZÁLEZ Z-PÉREZ A, PRIETO G, et al. Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different surfactant-protein ratios[J]. Int J Biol Macromol, 2003, 33(1/3): 67-73.