



ISSN 1000-8020
CN 11-2158/R
CODEN WEYAEM

卫生研究

WEISHENG YANJIU

2009年1月 第38卷 第1期

中国科学引文数据库来源期刊 中国自然科学核心期刊 国际权威检索系统收录刊物

**JOURNAL
OF
HYGIENE
RESEARCH**

2009.1

Volume 38 Number 1
January 2009

ISSN 1000-8020



中国疾病预防控制中心主办
CHINESE CENTER FOR
DISEASE CONTROL AND PREVENTION



第二届全国优秀科技期刊二等奖
第二届国家期刊奖百种重点期刊
卫生部首届优秀科技期刊一等奖

卫生研究

2009年1月 第38卷 第1期

目次

论著

- 铝对断乳大鼠神经行为和海马 Bcl-2、Fas 蛋白表达的影响 靳翠红, 刘秋芳, 王军明, 等 (1)
- 应用创造酶切位点 PCR-RFLP 检测乙醇脱氢酶 2 基因多态性 焦洁, 王威, 刘静, 等 (4)
- I、II 相代谢酶基因多态性与氯乙烯作业工人 DNA 损伤的关系研究 冀芳, 朱守民, 孙品, 等 (7)
- 双酚 A 暴露对大鼠器官结构及细胞因子表达的影响 苗颂, 寇增强, 高志贤 (11)
- 丙硫氧嘧啶致甲状腺组织增生的时效关系研究 王宇, 张素才, 程薇波, 等 (15)
- 全氟辛烷磺酸对大鼠脑组织氨基酸类神经递质和谷氨酰胺合成酶的影响 杨小混, 王烈, 孙巍, 等 (19)
- 二氧化氯与水中硫氰酸根反应的动力学研究 胡超云, 毕小平, 张丽萍, 等 (22)
- 菌核净内分泌干扰作用研究 陈江, 章荣华, 毛光明, 等 (24)
- 女性肺癌与非癌症人群血浆中 30 种元素的比较分析 张霖琳, 吴国平, 李继华, 等 (28)
- 大剂量芹菜素对大鼠抗氧化酶活性及 DNA 损伤影响的研究 隋海霞, 徐海滨, 蒯士安 (36)
- 食物蛋白质消化稳定性和热稳定性研究 向钱, 张馨, 王伟, 等 (53)
- 经口致敏食物过敏大鼠模型的建立 黄娟, 钟燕, 蔡威, 等 (57)
- 大黄色过敏原的提取、分离及免疫学特性鉴定 杨睿, 吴海强, 刘志刚 (60)
- 四川三峡移民心理健康状况及影响因素研究 丛建妮, 王琳, 汪洋, 等 (63)
- 四川省社区吸毒、社区美沙酮维持治疗、强制戒毒吸毒成瘾者生活质量比较 肖琳, 吴尊友, 王勇胜, 等 (67)
- 合肥市建筑工地农民工艾滋病知识-态度-行为的干预效果分析 黄芬, 程慧, 王君锋, 等 (72)

达能营养中心青年工作者论坛

- 锌对生长期大鼠海马 Uch-L1 表达的调控作用 刘静, 蒋与刚, 黄承钰, 等 (32)
- 2 型糖尿病合并冠心病患者的同型半胱氨酸水平及代谢关键酶基因多态性特点 罗丹, 鄢盛恺, 程歆琦, 等 (39)
- 同型半胱氨酸、半胱氨酸在动脉粥样硬化发病机制中作用的对照研究 苏娟, 王生兰, 黄玉珊, 等 (43)

调查研究

- 大连市集中空调场所军团菌污染及人群健康状况影响调查 姜红梅, 邵祝军, 李建铭, 等 (76)
- 城市家庭吸烟状况与控制吸烟对策措施 王此隐, Ma Grace, 翟成凯, 等 (78)
- 饮酒与肺癌发病关联的 Meta 分析 樊丽辉, 蔡琳 (85)
- 次序统计量回归及其在食品暴露评估未检出值估计中的应用 余小金, 刘沛, 闵捷, 等 (89)

实验研究

- 茶多酚对同型半胱氨酸诱导损伤的人血管内皮细胞纤溶功能的影响 裴晶晶, 郭帅, 张春玲, 等 (47)
- Warthin-Starry 银染色方法显示空气细颗粒物 (PM_{2.5}) 的探讨 白玉萍, 刘红刚, 徐东群, 等 (81)
- 浙江省部分地区河塘底泥及鲫鱼中二噁英和多氯联苯的污染特征研究 韩见龙, 沈海涛, 黄百芬, 等 (92)
- 生物和食品样品中微量金属元素的超声波提取研究 刘丽燕, 张玉雪, 马静, 等 (96)
- 卵巢切除合并慢性铅染毒大鼠中枢外某些元素含量的变化及雌激素的干预效应 赵长安, 许娜, 张文, 等 (99)
- 复合微量营养素对幼鼠学习记忆能力及海马 CA3 超微结构的影响 梁爱华, 陈仪坤, 张文, 等 (103)
- 锰接触对大鼠肝脏的影响 吴燕明, 张德兴, 贺新红, 等 (107)
- 大豆异黄酮代谢产物——雌马酚对更年期症状的影响研究 王路, 赵海田, 程翠林, 等 (117)
- 二乙基二硫代氨基甲酸银修饰电极法测定大米中的微量硒(IV) 连靠奇, 康维钧, 李珊 (123)
- 深圳流感监测网络样品采集工作质量评估 程小雯, 逯建华, 吕星, 等 (125)

食物蛋白质消化稳定性和热稳定性研究

向钱 张馨 王伟 李宁¹

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050

摘要:目的 建立体外模拟胃肠液消化稳定性试验和热稳定性试验方法,确定试验中的阳性和阴性参考蛋白质。方法 在体外模拟胃肠液消化环境和热加工处理环境,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳研究常见食物致敏原(鸡卵清蛋白 OVA、牛 β -乳球蛋白 β -LG)、不常见食物致敏原(牛血清白蛋白 BSA)和非致敏原(大豆脂肪水解酶 LPE、马铃薯酸性磷酸酶 PAP)在其中各观察时间点的降解情况。结果 OVA 在模拟胃肠液中 60min 不降解; β -LG 在模拟胃液中 60min 不降解稳定存在,但在模拟肠液中 30min 内完全降解;BSA 在模拟胃液中 30min 内完全降解,在模拟肠液中 60min 部分降解;PAP 在模拟胃液中 15s 即完全降解,LPE 在 30s 内完全降解;而在模拟肠液中,PAP 60min 完全不降解,LPE 60min 大部分降解。在热稳定性试验中,OVA、 β -LG、BSA 60min 内不降解,PAP 60min 内完全降解。结论 模拟胃液消化稳定性和热稳定性试验中设 OVA 为常见致敏原对照、BSA 为不常见致敏原对照、PAP 为非致敏原对照,模拟肠液消化稳定性试验中设 OVA 为常见致敏原对照、BSA 为不常见致敏原对照、LPE 为非致敏原对照。并据此初步建立体外消化稳定性和热稳定性试验方法。

关键词:食物蛋白质 致敏性 消化稳定性 热稳定性

中图分类号:R151.3

文献标识码:A

Study on digestive stability and heat stability of food proteins

XIANG Qian, ZHANG Xin, WANG Wei, LI Ning

Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish the *in vitro* evaluation method *in vitro* on digestive stability and heat stability of food proteins and ascertain the reference proteins of each test. Methods With SDS-PAGE method, digestive stability of five food proteins with known allergenicity was assessed *in vitro* in simulated gastric and intestinal fluid and heat stability of them was determined by heat treatment. Results OVA and β -LG were stable within 60 min in SGF (simulated gastric fluid). β -LG was digested within 30min in SIF (simulated intestinal fluid). BSA was digested within 30min in SGF and partly digested within 60min in SIF. In SGF, PAP was digested within 15s and LPE within 30s. But in SIF, PAP was stable within 60min and most LPE was digested within 60min. Heat-treated OVA, β -LG and BSA were stable within 60min while PAP was totally disappeared within 60min. Conclusion The methods established in this study can be applied to evaluate the digestive stability and heat stability of food proteins.

Key words: food proteins, allergenicity, digestive stability, heat stability

现代科学研究发现,广泛存在的食物过敏原对胃蛋白酶、酸或热加工处理具有抵抗作用^[1,2],以完整或降解片段形式存在,引起人体过敏。美国 FDA 认为,通过分析蛋白质是否具有已知致敏原的常见特征(如与已知过敏原的同源性、具有消化、热和酸稳定性)就可以在一定程度上判断该蛋白作为食物一部分时是否会产生过敏反应^[3]。因此,外源蛋白在模拟胃肠消化液中的消化稳定性和耐热加工处理的稳定性对于其致敏性的预测与评估有重要的参考意义。FAO/WHO 致敏性判

定树评估法中的第 4 项即为模拟胃肠液消化稳定性试验^[4]。

本研究依据美国药典配制模拟胃肠消化液^[5],建立体外模拟胃肠体系,以及模拟热处理加工环境,对不同的已知常见致敏原、不常见致敏原和非致敏原的稳定性进行研究,以寻找用以评价外源蛋白消化稳定性和热稳定性的参照蛋白,建立体外模拟消化稳定性和热稳定性方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、大豆脂肪水解酶(lipoxidase, LPE)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、牛 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)、马铃薯酸性磷酸酶(potato acid phosphatase, PAP)、胃蛋白酶、胰蛋白酶(均购自 Sigma 公司)。

基金项目:国家科技支撑计划项目(No. 2006BAK02A07);国家重点基础研究发展计划项目(No. 2007CB109207)

作者简介:向钱,男,硕士,实习研究员, E-mail: 3all@163.com

¹ 通讯作者:李宁,女,研究员

1.2 溶液配制

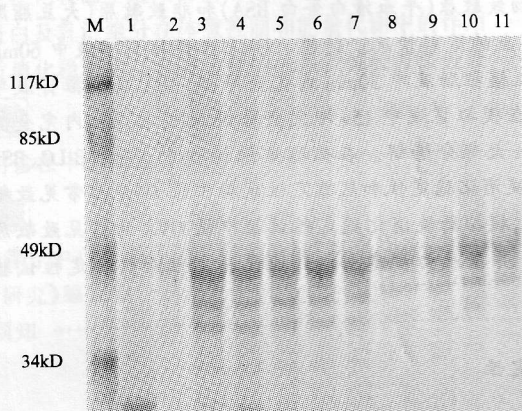
1.2.1 模拟胃液 2.0g NaCl, 3.2g 胃蛋白酶, 7ml 浓盐酸, 双蒸水定容于 1000ml, pH 约为 1.2。

1.2.2 模拟肠液 将 6.8g KH_2PO_4 溶于 250ml 双蒸水, 振荡, 完全溶解后加 190ml 0.2mol/L NaOH 和 400ml 的双蒸水。加胰蛋白酶 10g, 混匀, 用 0.2mol/L NaOH 调 pH 至 (7.5 ± 0.1) , 双蒸水定容于 1000ml。

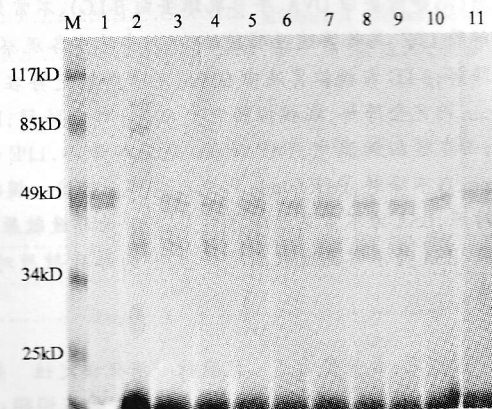
1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质在模拟胃液中稳定性的测定 用双蒸水溶解

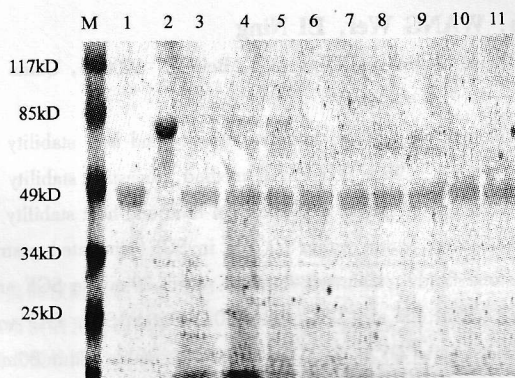
蛋白质标准品, 终浓度为 10mg/ml。取 9 个 1.5ml 灭菌离心管, 每管加入模拟胃液 100 μl (pH1.2), 37 $^\circ\text{C}$ 保温 10min。然后在各管终依次加入 37 $^\circ\text{C}$ 预热的蛋白溶液 100 μl , 准确计时, 反应时间依次为 15s、30s、60s、2min、4min、8min、15min、30min 和 60min。反应结束时, 立即加入 0.168mol/L Na_2CO_3 25 μl 终止反应, 迅速置于冰上。每管取 20 μl 于干净的 1.5ml 离心管中, 分别加 5 $\times$ 凝胶上样缓冲液 5 μl , 100 $^\circ\text{C}$ 煮 5min, 室温冷却, 5000 r/min 离心 3min, 取 15 μl 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳。分离胶浓度为 12%。考马斯亮兰染色, 电泳结果由扫描仪记录, 并进



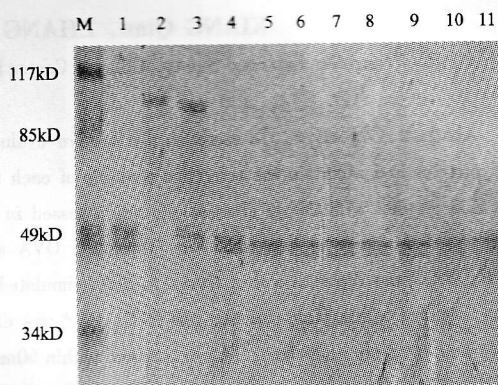
A 鸡卵清蛋白



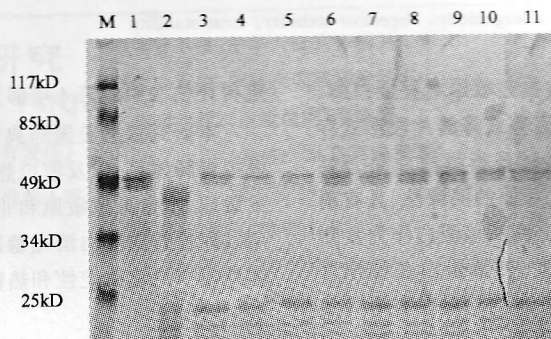
B 牛 β -乳球蛋白



C 牛血清白蛋白



D 大豆脂肪水解酶



E 马铃薯酸性磷酸酶

M: marker; 1: 胃蛋白酶; 2: 标准蛋白; 3~11: 依次为蛋白被模拟胃液消化 15s、30s、60s、2min、4min、8min、15min、30min、60min 时, 标准蛋白被消化的状态

图 1 各蛋白质在模拟胃液中的稳定性

Figure 1 Digestive stability of proteins in SGF

行分析。

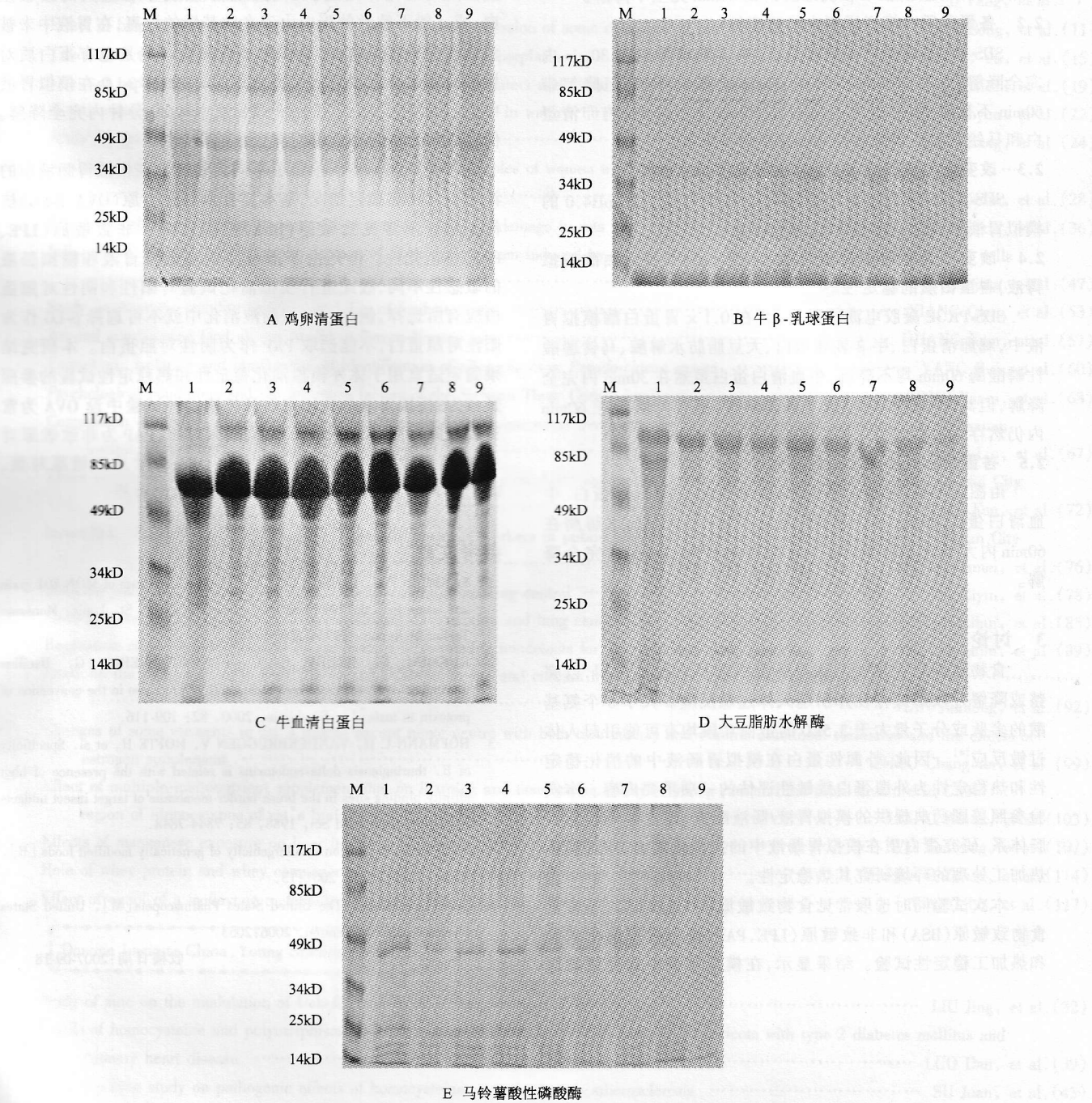
1.3.2 蛋白质在模拟肠液中稳定性的测定 用双蒸水溶解蛋白质标准品,终浓度为 10mg/ml。取 9 个 1.5ml 灭菌离心管,每管加入模拟肠液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 保温 10min。然后在各管终依次加入 37 $^{\circ}$ C 预热的蛋白溶液 100 μ l,准确计时,反应时间依次为 15s、30s、60s、2min、4min、8min、15min、30min 和 60min。反应结束时,每管取 20 μ l 于干净的 1.5ml 离心管中,分别加 5 $\times$ 凝胶上样缓冲液 5 μ l,100 $^{\circ}$ C 煮 5min,室温冷却,5000r/min 离心 3min,取 15 μ l 上样,SDS-PAGE 凝胶电泳。分离胶浓度为 12%。

考马斯亮兰染色,电泳结果由扫描仪记录,并进行分析。

1.3.3 蛋白质在不同 pH 值模拟胃液中稳定性的测定 准备 pH4 的模拟胃液,按 2.1 的方法再次测定 pH 改变对稳定性的影响。

1.3.4 胃蛋白酶浓度对蛋白质稳定性的影响 用 0.1 $\times$ 胃蛋白酶消化液消化蛋白质,观察蛋白质稳定性变化。方法同 1.2.1。

1.3.5 蛋白质对热加工稳定性试验 将各标准蛋白(1.0mg/ml) 20 μ l 放入 1ml 离心管中加热至 99 $^{\circ}$ C 以上持续 5 ~ 120min,在所



M: marker; 1 ~ 9 泳道依次为标准蛋白沸水浴中加热 5、15、20、30、45、60、90

和 120min 时,标准蛋白的稳定性情况

图 2 各蛋白质对热加工的稳定性

Figure 2 Heats stability of proteins

涉及的 11 个时间序列为 5、10、15、20、30、45、60、90 和 120min 然后各管中加入 5 μ l 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,并于 100 $^{\circ}$ C 加热 5min,将各时间点样品中的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果

2.1 各蛋白质在模拟胃液中的稳定性

由图 1 可见,马铃薯酸性磷酸酶在 15s 即完全降解;大豆脂肪水解酶在 30s 内完全降解;牛血清白蛋白在 2min 内完全降解;鸡卵清蛋白和牛 β -乳球蛋白在 60min 完全不降解。

2.2 各蛋白质在模拟肠液中的稳定性

SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示:牛 β -乳球蛋白在 30min 内完全降解;大豆脂肪水解酶在 60min 大部分降解,但降解带 60min 不被降解;牛血清白蛋白在 60min 少量降解;鸡卵清蛋白和马铃薯酸性磷酸酶在 60min 完全不降解。

2.3 改变模拟胃液的 pH(pH4.0)各蛋白质的稳定性

SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示:5 种标准蛋白在 pH4.0 的模拟胃液中 60min 都不降解,稳定存在。

2.4 改变模拟胃液中胃蛋白酶的浓度(0.1 $\times$ 胃蛋白酶模拟胃液)各蛋白质的稳定性

SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示:在 0.1 $\times$ 胃蛋白酶模拟胃液中,鸡卵清蛋白、牛 β -乳球蛋白、大豆脂肪水解酶、马铃薯酸性磷酸酶 60min 均不降解,牛血清白蛋白虽然在 30min 内完全降解,但其降解过程中生成 7 条降解带,部分降解带在 60min 内仍然存在。

2.5 各蛋白质对热加工的稳定性

由图 2 可见,在沸水浴中,鸡卵清蛋白、牛 β -乳球蛋白、牛血清白蛋白 60min 内不降解,稳定存在;大豆脂肪水解酶在 60min 内大部分被降解;马铃薯酸性磷酸酶 60min 内完全降解。

3 讨论

食物致敏原对热加工和胃肠蛋白酶具有抵抗作用,以完整或降解片段形式存在并引起人体过敏反应。大于 8 个氨基酸的多肽或分子量大于 3.5kD 的蛋白片段均有可能引起人体过敏反应^[4]。因此,外源性蛋白在模拟胃肠液中的消化稳定性和热稳定性为外源蛋白致敏性评估的一项重要内容。本实验参照美国药典提供的模拟胃液/肠液配方,建立体外模拟胃肠体系,研究蛋白质在模拟胃肠液中的抗消化能力,并且模拟热加工处理的环境研究其热稳定性。

本次试验同时选取常见食物致敏原(OVA、 β -LG)、不常见食物致敏原(BSA)和非致敏原(LPE、PAP)进行模拟消化试验和热加工稳定性试验。结果显示,在模拟胃液中常见致敏原

稳定性很强,60min 内完全不降解;不常见食物致敏原和非致敏原则较易被降解。而当模拟胃液的 pH 升高和胃蛋白浓度降低时,原本容易降解的不常见食物致敏原和非致敏原稳定性明显增加。证明在机体胃液分泌异常的状态下,或是大量饮水导致胃液稀释的状态下,致敏的可能性将大大增加。这也与胃肠功能不健全的婴幼儿、临床患胃肠疾病的病人食物过敏发生率高于普通人群的情况相吻合。在模拟肠液中,不常见食物致敏原和非致敏原的稳定性较模拟胃液中明显增加,说明对于外来食物,胃蛋白酶的消化作用是主要的,而胰蛋白酶的消化作用是次要的。所以食物中含量大的致敏蛋白,或一般不致敏的蛋白由于食物基质的包裹,在胃液中未被消化而进入肠道中,便易引起过敏反应。但是也有蛋白质对胃蛋白酶和胰蛋白酶的敏感性不同,例如牛 β -LG 在模拟胃液中 60 分钟稳定存在,而在模拟肠液中却 30 分钟内完全降解。但是大部分的蛋白质都对胃蛋白酶更敏感一些。

本次试验基本模拟出了不同食物蛋白在模拟胃肠液中的消化情况和热稳定情况,基本复合常见致敏原(OVA、 β -LG)抗消化性 > 不常见致敏原(BSA)抗消化性 > 非致敏原(LPE、PAP)抗消化性。但是由于部分蛋白对模拟胃液和模拟肠液的敏感性不同,故此进行模拟消化试验时阳性和阴性对照蛋白应有所选择,例如在模拟肠液消化中就不可选择 β -LG 作为阳性对照蛋白,不能选取 PAP 作为阴性对照蛋白。本研究结果确定适宜用于体外模拟消化稳定性和热稳定性试验的参照蛋白为:模拟胃液消化稳定性和热稳定性试验中设 OVA 为常见致敏原对照、BSA 为不常见致敏原对照、PAP 为非致敏原对照,模拟肠液消化稳定性试验中设 OVA 为常见致敏原对照、BSA 为不常见致敏原对照、LPE 为非致敏原对照。

参考文献

- 1 SANDERS P R, PATZER S S. Compositional analysis of MON 801 grain and silage from the 1993 and 1994 maize trials[R]. St. Louis: Monsanto Technical Report, 1995: MSL-14180.
- 2 RUKMINI V, REDDY C Y, VENKATESWERLU G. Bacillus thuringiensis crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin[J]. Biochimie, 2000, 82: 109-116.
- 3 HOFMANN C H, VANDERBRUGGEN V, HOFTE H, et al. Specificity of B. thuringiensis delta-endotoxins is related with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts [J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85: 7844-7848.
- 4 FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods [R]. Rome: FAO/WHO, 2001:13.
- 5 Board of Trustees. The United States Pharmacopeia [M]. United States Pharmacopeial Convention, 2006:2053.

收稿日期:2007-09-18