

花生致敏蛋白 Ara h1 与咖啡酸互作对其抗原性的影响

任红涛^{1,2,4}, 石奇磊^{1,2}, 李静^{1,2}, 余秋颖^{1,2,3}, 王凡^{1,2}, 胡梅^{1,2,3}, 王娜^{1,2,3,4,5*}

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002; 2. 郑州市营养与健康食品重点实验室, 郑州 450002; 3. 国际动物免疫学联合研究中心, 郑州 450002; 4. 农业农村部大宗粮食加工重点实验室, 郑州 450002; 5. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450002)

摘要: 为探寻适宜的花生脱敏方法, 该文研究了花生致敏蛋白 Ara h1 与咖啡酸互作对其抗原性的影响, 利用荧光光谱、紫外光谱和间接 ELISA 法对碱法、酶法、自由基法处理后的咖啡酸蛋白复合物抗原性变化进行了分析, 并对碱法互作反应温度、反应时间、pH 值、咖啡酸浓度进行优化。结果表明: 在温度 33.2 °C、时间 25 h、pH 值 8.67 和咖啡酸浓度 1.76 mg/mL 时, 咖啡酸与花生致敏蛋白 Ara h1 碱法互作后其抗原性降至 69.31%, 接枝量为 119.16 nmol/mg。碱法处理后, 咖啡酸与花生致敏蛋白 Ara h1 互作能降低致敏蛋白抗原性, 研究结果可为花生脱敏处理提供参考。

关键词: 蛋白; 优化; 花生; 致敏蛋白 Ara h1; 抗原性; 咖啡酸

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.033

中图分类号: TS201.2; TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2022)-08-0288-09

任红涛, 石奇磊, 李静, 等. 花生致敏蛋白 Ara h1 与咖啡酸互作对其抗原性的影响[J]. 农业工程学报, 2022, 38(8): 288-296. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.033 http://www.tcsae.org

Ren Hongtao, Shi Qilei, Li Jing, et al. Effects of interaction between peanut allergenic protein Ara h1 and caffeic acid on its antigenicity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(8): 288-296. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.08.033 http://www.tcsae.org

0 引言

花生营养丰富, 是人们生活饮食中植物油脂和蛋白质的重要来源^[1], 但花生也是联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 认定的八大类过敏原之一, 是大龄儿童和成人最常见的食物过敏源^[2]。国际免疫学联合会 (International Union of Immunological Societies, IUIS) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 确认了 18 种花生过敏蛋白, 分别命名为 Ara h1-Ara h18^[3]。其中 Ara h1 占花生总蛋白含量的 12%~16%, 35%~95% 的花生过敏反应是由 Ara h1 引发^[4], 并且 Ara h1 能够被 90% 以上患病人群血清进行免疫球蛋白 E (Immunoglobulin E, IgE) 识别^[5]。花生过敏会导致患者产生腹泻、呕吐、红斑丘疹、荨麻疹、血压下降和血管性水肿等症状, 在严重情况下还可能导致过敏性休克并危及生命^[6], 因此对花生脱敏方法的研究非常重要。

当前花生脱敏的主要方法是物理加热法^[7]、基因工程法^[8-9]、酶处理法^[10]、辐照处理法^[11-12]等, 但大都存在不足之处, 如破坏营养成分、安全性低、脱敏效果差、适用范围窄以及部分酶解产物仍具抗原性等^[13]。植物多酚是来源广、绿色安全的天然活性物质, 并且在食品加工过程中易与蛋白质在同一体系中通过共价与非共价键结

合, 改变蛋白质结构进而影响其致敏性, 因此通过植物多酚与花生致敏蛋白相互作用成为解决花生过敏的一种新方法。植物多酚与蛋白的非共价结合依靠疏水相互作用、氢键、静电相互作用和范德华力等维持^[14]; 共价结合主要依靠多酚氧化和亲核加成过程形成的共价键且反应不可逆^[15]。共价结合根据反应原理的不同分为碱法、酶法、自由基法 3 种方法, 其中酶法具有特异性强、安全性高等优点, 但引入的酶需要去除^[16]; 碱法操作简便, 但反应条件较剧烈^[17]; 自由基法条件温和、无毒副产物, 但产生自由基的氧化还原体系构建较复杂^[18]。

研究表明多酚与花生致敏蛋白互作能够影响其致敏性, 如 Plundrich 等^[19]发现花生蛋白与蔓越莓和蓝莓多酚结合能显著降低花生蛋白 IgE 结合能力 (分别降低 38% 和 31%), 细胞试验中组胺和 β -氨基己糖苷酶释放显著降低。Rishipal 等^[20]让致敏小鼠食用富含花生蛋白多酚聚集体的氨基酸饮食, 发现小鼠脾脏裂解物中 CD63 蛋白表达及血浆 IgE 均降低。当前研究主要为植物多酚粗提物与花生蛋白的混合物, 对单一成分多酚与纯化花生致敏蛋白的研究较少。咖啡酸 (Caffeic Acid, CA) 作为内源性酚类植物组分的一种, 广泛存在于水果、蔬菜、谷物等食物中, 具有抗氧化、抗炎症、调节免疫等作用^[21-22]。本试验开展咖啡酸与花生致敏蛋白 Ara h1 共价结合方法筛选及反应条件优化, 为多酚与花生致敏蛋白共价结合降低其致敏原抗原性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生 (豫花 37 号, 黄淮流域种植范围较广, 河南正

收稿日期: 2021-12-27 修订日期: 2022-03-04

基金项目: 郑州市营养与健康食品重点实验室项目 (KF20190426); 河南省高等学校重点科研项目 (22B550004)

作者简介: 任红涛, 副教授, 研究方向为食品加工与食品营养。

Email: ren76@163.com

*通信作者: 王娜, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与免疫学。

Email: na-wang@163.com

阳新地花生集团); 咖啡酸(纯度 $\geq 98\%$), 上海麦克林生化有限公司; DEAE-SepHarose Fast Flow、SepHadexG-200、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、福利酚试剂、漆酶、甘氨酸、L-赖氨酸、透析袋 MD25 (8 000~14 000 Da)、吐温-20、PBS 缓冲液干粉, 北京索莱宝科技有限公司; 兔抗 Ara h1, 瑞典 Agrisera 公司; HRP 标记羊抗兔免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG), 武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

SCIENTZ-48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); SN-MS-1 型磁力搅拌器(上海尚普仪器设备有限公司); CXG-1 电脑恒温层析柜(上海沪西分析仪器厂有限公司); PHS-3C pH 计(上海仪电科学仪器有限公司); FX303-Z 型电热培养箱(上海树立仪器仪表有限公司); SHA-B 水浴振荡器(上海力辰邦西仪器科技有限公司); BioTek/epoch2 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); LF-1803010 型荧光分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司); Neofuge 1600R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 花生致敏蛋白 Ara h1 提取与纯化

提取方法参考闫飞^[23]的方法。

纯化方法参考 Wu 等^[24]并略作改动。在电脑恒温层析柜中先用 DEAE-SepHarose Fast Flow 填充层析柱进行阴离子交换层析, 以 Tris-HCl 缓冲液平衡 2~3 倍柱体积后即可上样, 然后用含 0~0.5 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.0) 进行线性梯度洗脱并收集各洗脱峰用 SDS-PAGE 检测。将收集后的目标峰蛋白再用 SepHadexG-200 进行凝胶过滤层析纯化, 然后用 3~5 倍柱体积的洗脱液平衡层析柱后进行上样, 然后用上柱缓冲液进行洗脱并收集各峰进行 SDS-PAGE 检测, 经分析后纯度达到 90% 以上。

1.3.2 Ara h1 与 CA 互作方法筛选

碱法互作: 参考 Tao 等^[25]的方法。用去离子水溶解制备浓度为 40 mg/mL 的 Ara h1 溶液, 并将 pH 值调节至 9.0, 同时加入 0.02% 叠氮钠抑制微生物生长。Ara h1 溶液与 CA 溶液 (0.70 mmol/L) 等体积混合后, 再次调节 pH 值至 9.0。将混合物在室温下敞口搅拌 24 h, 为了消除反应体系中的游离酚类化合物, 将混合物转移至透析袋 (截留分子量 14 000Da) 内, 4 °C 下于去离子水中透析 48 h (每隔 6 h 换一次水确保未反应的游离多酚完全透析出去)。透析后的溶液冷冻干燥即得 Ara h1-CA 共价接枝物。

自由基法互作: 参考刘夫国^[26]的方法。以去离子水溶解制备浓度为 20 mg/mL 的 Ara h1 溶液, 加入 0.02% 叠氮钠抑制微生物生长。向 50 mL 上述溶液中依次加入 0.5 mL 双氧水 (10 mol/L) 和 0.25 g 维生素 C, 室温下搅拌反应 2 h。然后向反应液中加入一定量的 CA 使其最终浓度为 0.35 mmol/L, 继续反应 24 h。反应结束后将溶液转移至透析袋 (截留分子量 14 000 Da) 内, 4 °C 下于去离子水中透析 48 h (每隔 6 h 换一次水确保未反应的游

离多酚完全透析出去), 透析后的溶液冷冻干燥即得 Ara h1-CA 共价接枝物。

酶法互作: 参考 Prigent 等^[27]的方法。以去离子水溶解制备浓度为 20 mg/mL 的 Ara h1 溶液, 加入 0.02% 叠氮钠抑制微生物生长。向 Ara h1 溶液中加入一定量的漆酶 (10 U/mL), 调节 pH 值至 7.0, 室温下搅拌 2 h。向反应液中加入一定量的 CA 使其最终浓度为 0.35 mmol/L, 继续反应 24 h 后加入 10 μ mol/L NaHSO₃ 终止反应。然后将溶液转移至透析袋 (截留分子量 14 000 Da) 内, 4 °C 下于去离子水中透析 48 h (每隔 6 h 换一次水确保未反应的游离多酚完全透析出去), 透析后的溶液冷冻干燥即得 Ara h1-CA 共价接枝物。

1.3.3 单因素试验设计

经预试验筛选出较优互作方法, 针对咖啡酸浓度、温度、时间、pH 值 4 个因素研究其对花生致敏蛋白 Ara h1 共价结合的影响。每组试验花生致敏蛋白 Ara h1 为 20 mg/mL 的溶液, 单因素试验设计见表 1, 每组 3 次平行, 结果取平均值。温度设置: 25、35、45、55、65 °C, 其他指标为时间 24 h、pH 值 9、CA 浓度 0.63 mg/mL。时间设置: 6、12、18、24、30 h, 其他指标为温度 25 °C、pH 值 9、CA 浓度 0.63 mg/mL。pH 值设置: 7、8、9、10、11, 其他指标为温度 25 °C、时间 24 h、CA 浓度 0.63 mg/mL。CA 浓度设置: 0.157 5、0.315 0、0.630 0、1.260 0、2.520 0 mg/mL, 其他指标为温度 25 °C、时间 24 h、pH 值 9。以 IgG 结合能力作为主要指标, 多酚蛋白接枝量和紫外光谱扫描结果作为辅助指标, 判定较佳单因素条件。

表 1 单因素试验设计

水平 Level	温度 Temperature / °C	时间 Time /h	pH 值 pH value	咖啡酸浓度 CA(coffee acid) concentration/(mg·mL ⁻¹)
1	25	6	7	0.157 5
2	35	12	8	0.315 0
3	45	18	9	0.630 0
4	55	24	10	1.260 0
5	65	30	11	2.520 0

1.3.4 二次回归正交试验设计

根据单因素试验结果确定 CA 浓度、温度、时间、pH 值 4 个因素的水平编码范围, 以 IgG 结合能力为响应值。试验设计见表 2。

表 2 二次回归正交试验因素水平表

水平编码 Horizontal coding	温度 Temperature/°C	时间 Time /h	pH 值 pH value	咖啡酸浓度 CA concentration / (mg·mL ⁻¹)
1.5467	50.4	33.2	9.77	2.230
1	45.0	30.0	9.50	1.890
0	35.0	24.0	9.00	1.260
-1	25.0	18.0	8.50	0.630
-1.5467	19.5	14.7	8.22	0.285

1.3.5 试验指标测定

总酚当量测定: 选用福利酚法测定接枝物中 CA 的接

枝量,参考陈卫军等^[28]的方法。

游离氨基的测定:选用 OPA 法测定样品游离氨基含量,参考 Xue 等^[29]的方法。

游离色氨酸的测定:参考陈卫军等^[28]的方法。

巯基含量测定:参考刘夫国^[26]的方法。

紫外光谱分析:参考周昊等^[30]并略作改动。通过双光束紫外可见分光光度计测定其在 190~600 nm 波长范围内的光谱,以缓冲液作为空白对照。

内源荧光光谱分析:参考王喜波等^[31]并略作改动。将样品溶解在缓冲液中,浓度为 0.2 mg/mL。在发射波长 300~500 nm 和激发波长 295 nm 处收集荧光光谱,激发和发射狭缝的宽度均设置为 5 nm。

抗原性检测:参考罗春萍^[32]方法并略做改动。将花生致敏蛋白 Ara h1 与咖啡酸共价结合前后的样品,每孔 100 μ L 加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;每孔加入 250 μ L 5% 的脱脂乳,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;加入一抗(兔抗 Ara h1, 1:200 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加入二抗(HRP 标记羊抗兔 IgG, 1:1 000 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。每步操作之后均用 PBST 洗板。最后加显色液避光显色 15 min,然后加终止液终止显色反应,用酶标仪测定在 490 nm 处吸光值。

$$\text{IgG 结合能力} = \frac{\text{处理样品 OD}_{490} \text{ 值}}{\text{未处理样品 OD}_{490} \text{ 值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6 数据处理

所有试验均设置 3 组平行,使用 SPSS16.0、DPS 7.05 进行数据分析,运用 Origin 2019 及 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图。

2 结果与分析

2.1 Ara h1 与 CA 相互作用方法结果分析

2.1.1 相互作用方法的反应基团与接枝量分析

从表 3 中可以看出 3 种 Ara h1-CA 接枝方法中游离氨基、游离色氨酸、巯基含量均比空白 Ara h1 有所降低,原因是多酚与蛋白质分子共价结合过程中,与蛋白质分子中的氨基、巯基等亲核基团发生加成反应并形成 C-N 或 C-S 共价键^[33]。3 种方法中 CA 接枝量由大到小依次为:碱法>酶法>自由基法,由表 3 可知碱法相互作用后游离氨基、色氨酸、巯基含量均比酶法和自由基法有所降低且均具有显著性差异 ($P<0.05$),因此说明参加反应的基团含量越多,CA 接枝量就越高,剩余游离基团含量就越少,与文献报道一致^[28]。综合分析接枝量和反应基团含量后发现碱法在 3 种共价结合方法中相互作用效率最高。

2.1.2 共价接枝方法光谱分析

由图 1a 可以看出致敏蛋白 Ara h1 在 280 nm 处有最大吸收峰,是由于蛋白质分子上酪氨酸或色氨酸残基的吸收。蛋白质吸收峰值强弱受蛋白质与多酚相互作用强弱的影响,峰值位移是由于蛋白质结构微环境中疏水性改变所导致的^[34]。3 种接枝方法均使得蛋白质 Ara h1 最大吸光度提高,并且多酚所带助色团或发色团使得蛋白质多肽链伸展而发生解折叠,导致最大吸收峰发生蓝移,其中碱法接枝物蓝移最明显,由 280 nm 蓝移至 273 nm,

并且所引起紫外吸收强度改变最大。

表 3 Ara h1 和 Ara h1-CA 中氨基酸、巯基和 CA 接枝量
Table 3 Amino acid, thiol, and CA graft amount of Ara h1 and Ara h1-CA

样品 Sample	游离氨基 Free amino /($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	游离色氨酸 Tyrosine group /($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	巯基 Thiol /($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	CA 接枝量 CA graft amount/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Ara h1	20.76 \pm 1.09 ^a	46.97 \pm 2.1 ^a	2.38 \pm 0.07 ^a	—
自由基法 Free radical method	16.94 \pm 0.05 ^c	36.60 \pm 0.7 ^b	1.64 \pm 0.13 ^b	29.01 \pm 0.24 ^c
酶法 Enzymatic method	18.85 \pm 0.09 ^b	34.95 \pm 0.6 ^b	1.74 \pm 0.18 ^c	42.58 \pm 0.27 ^b
碱法 Alkali method	14.06 \pm 0.21 ^d	27.20 \pm 1.5 ^c	1.33 \pm 0.32 ^d	48.42 \pm 0.41 ^a

注:同一列数据不同字母上标表示差异显著 ($P<0.05$),下同。

Note: In the same column of data, different letter superscripts indicate significant differences ($P<0.05$), the same below.

由图 1b 可知,与 Ara h1 相比 3 种方法的接枝物荧光强度均有所降低,这说明 CA 与 Ara h1 发生共价相互作用,可能是 CA 氧化形成的醌类物质与 Ara h1 中的色氨酸残基发生结核反应,遮掩了 Ara h1 色氨酸残基导致荧光强度下降^[35],并且峰值发生轻微红移,原因是 CA 诱导 Ara h1 三级结构发生解折叠。在 3 种接枝方法中荧光强度由小到大依次为:碱法接枝物<酶法接枝物<自由基法接枝物,从而说明碱法接枝能够更好促进 CA 与 Ara h1 共价作用。碱法处理 pH 值并不高,且此方法在食品加工中常用,例如稀氢氧化钠处理橄榄,以氧化咖啡酸和羟基酪醇,从而生产成熟的橄榄^[36],因此对安全性及环境污染影响较小。

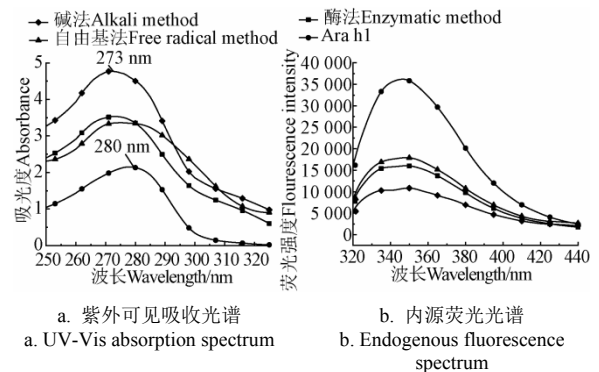


图 1 相互作用对花生致敏蛋白 Ara h1 光谱的影响

Fig.1 Effects of interaction methods on the spectrum of peanut sensitizing protein Ara h1

2.1.3 共价相互作用方法抗原性分析

由图 2 可知,3 种相互作用接枝物的 IgG 结合能力均低于空白 Ara-h1,这表明与多酚结合降低了 Ara-h1 的抗原性。IgG 结合能力降低可能是由于原包埋于分子内部的表位暴露或原存在于分子表面的表位与多酚进行共价结合从而进行掩盖,导致 IgG 结合能力降低^[37]。在 3 种接枝物中碱法接枝物的 IgG 结合能力下降最多 ($P<0.05$),降至 76.8%,酶法与自由基法次之且两组间差异不显著 ($P>0.05$),因此选用碱法互作来降低 Ara h1 的 IgG 结合能力。

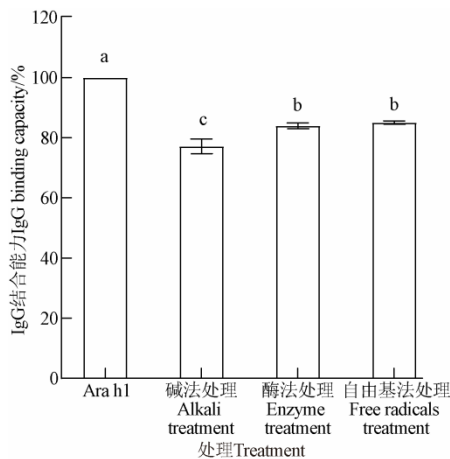


图 2 互作方法对花生致敏蛋白 Ara h1 抗原性的影响
Fig.2 Effects of interaction methods on antigenicity of peanut sensitizing protein Ara h1

2.1.4 碱法处理对致敏蛋白 Ara h1 的影响

本试验目的是通过不同处理使花生致敏蛋白与多酚反应，为避免各处理本身对蛋白抗原性产生影响，以碱法为例，花生致敏蛋白与多酚碱法交互反应后 Ara h1-CA 为互动组，天然花生蛋白 (Native Ara h1) 为空白，采用碱法处理但未添加多酚的 Control Ara h1 为对照组。由图 3a 和图 3b 可知，Control Ara h1 与 Native Ara h1 相比蛋白结构变化小，即碱法处理本身对 Ara h1 蛋白影响较小，但两者与 Ara h1-CA 蛋白结构存在较大差异。

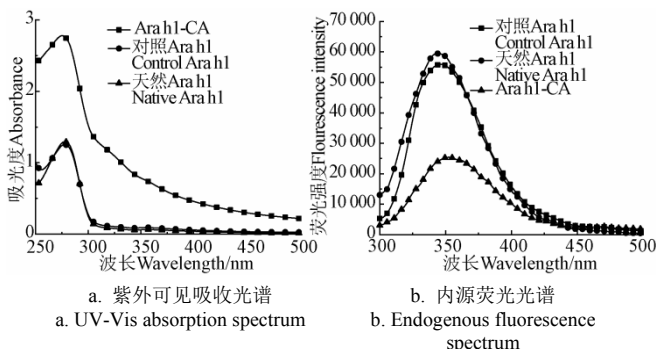


图 3 碱法处理对 Ara h1 影响光谱图

Fig.3 Spectrogram of the effect of alkali treatment on Ara h1

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 咖啡酸浓度对 Ara h1-CA 影响

由图 4a 可知随着 CA 浓度的升高，接枝量增加，IgG 结合能力下降。当 CA 浓度超过 0.630 0 mg/mL 后接枝量无显著性差异 ($P>0.05$)，IgG 结合能力在 CA 浓度超过 1.260 0 mg/mL 后无显著性差异 ($P>0.05$)。原因是随着 CA 浓度增加与之进行共价结合的蛋白质巯基、氨基等基团逐渐被结合完全，剩余多酚无法与蛋白结合进而被透析除去。由图 4b 可知 Ara h1 的紫外光谱强度随着 CA 浓度提高而增加，当 CA 浓度超过 0.630 0 mg/mL 后其紫外光谱变化不明显 ($P>0.05$)。因此综合 IgG 结合能力后选择咖啡酸浓度为 1.260 0 mg/mL。

2.2.2 pH 值对 Ara h1-CA 影响

由图 5a 可知随着 pH 值的升高，接枝量先升高后下降，在 pH 值 9 处有最高值，IgG 结合能力先下降后升高，

在 pH 值 9 处有最低值。多酚在碱性环境下易被氧化为醌类与蛋白质进行共价结合，共价结合程度起初随 pH 值的增加而加强^[38]，但随着 pH 值不断提高会由于静电斥力导致 α -螺旋解体引起蛋白质变性^[39]，从而导致多酚与蛋白质共价结合能力降低。由图 5b 可知 pH 值 9 时的紫外光谱具有最大吸收强度，是因为咖啡酸与致敏蛋白发生共价结合后导致蛋白质微环境发生改变，生成新的显色基团如 C=C、C=O、C=N 等不饱和基团导致吸收强度增加^[40]。因此选择 pH 值为 9。

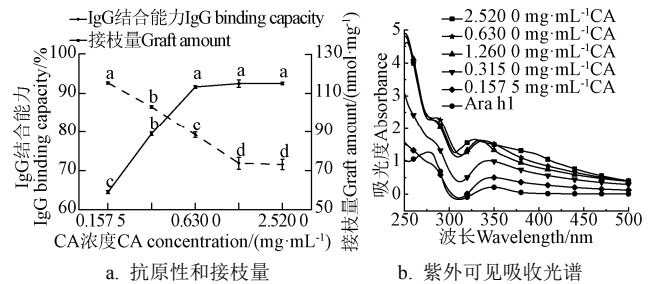


图 4 CA 浓度对 Ara h1-CA 抗原性、接枝量和紫外光谱的影响

Fig.4 Effects of CA concentration on antigenicity, graft amount and UV spectrum of Ara h1-CA

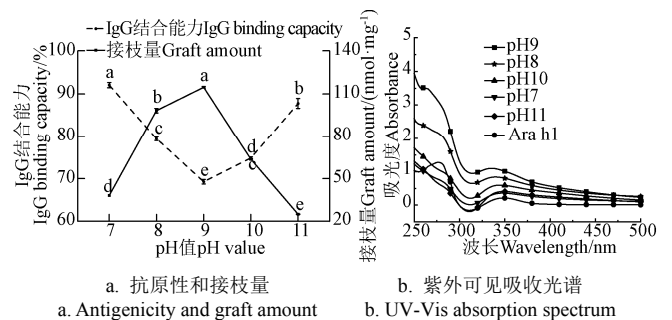


图 5 pH 值对 Ara h1-CA 抗原性、接枝量和紫外光谱的影响

Fig.5 Effects of pH value on the antigenicity, graft amount and UV spectra of Ara h1-CA

2.2.3 温度对 Ara h1-CA 影响

酚类物质受温度影响产生热氧化生成醌类物质从而与蛋白质发生共价结合^[41]，但随着温度不断升高，温度影响蛋白质与多酚之间氢键并导致疏水键的形成，从而影响其共价结合^[42]。从图 6a 可看出随着温度的升高，接枝量先升高后下降，在 35 °C 和 45 °C 处均较高且无显著性差异 ($P>0.05$)，IgG 结合能力则是先下降后升高，并在 35 °C 处降到最低，各组间具有显著性差异 ($P<0.05$)。从图 6b 可知 Ara h1 紫外吸光强度在 35 °C 和 45 °C 时均较高，说明在这两个温度时蛋白质与多酚反应更充分。因此结合接枝量及 IgG 结合能力选择反应温度为 35 °C。

2.2.4 反应时间对 Ara h1-CA 影响

多酚在碱性条件下发生自动氧化形成醌类物质，随着反应时间的增加多酚逐渐全部氧化并与蛋白质结合，直至氧化完全后不再反应。从图 7a 可知随着反应时间的增加，接枝量逐渐增加，当时间为 24 h 时接枝量最高，24 h 与 30 h 两组间无显著性差异 ($P>0.05$)，IgG 结合能力先下降后升高，在 24 h 时最低，各组间差异显著 ($P<0.05$)。从图 7b 可知随着反应时间延长，Ara h1 紫外

吸收强度不断升高,但在 24 h 与 30 h 处的紫外光谱图较为接近。因此选择反应时间为 24 h。

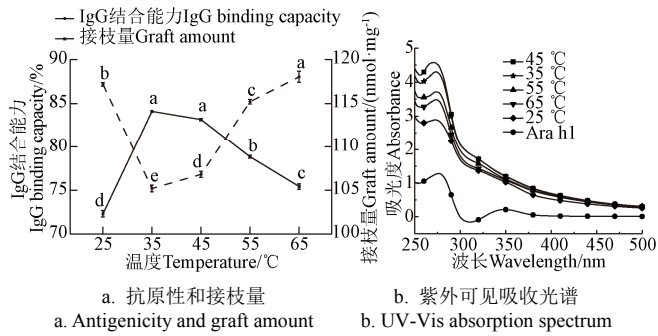


图 6 温度对 Ara h1-CA 抗原性、接枝量和紫外光谱的影响
Fig.6 Effects of temperature on antigenicity, graft amount and UV spectra of Ara h1-CA

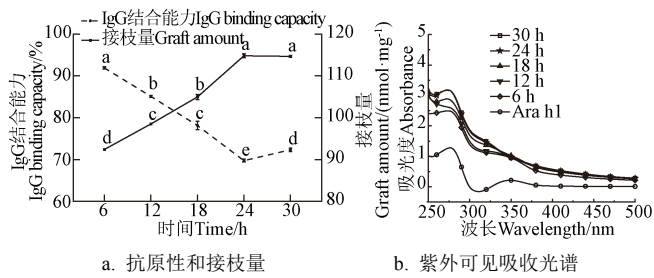


图 7 反应时间对 Ara h1-CA 抗原性、接枝量和紫外光谱的影响
Fig.7 Effects of reaction time on the antigenicity, graft amount and UV spectrum of Ara h1-CA

2.3 二次回归正交试验结果分析

2.3.1 相关性分析

通过对 IgG 结合能力与接枝量进行双变量 Pearson 检验,结果表明 IgG 结合能力与接枝量呈极显著负相关 ($r=-0.975, P<0.01$),同时由于本试验研究互作对花生致敏蛋白 Ara h1 抗原性的影响,因此选择 IgG 结合能力作为正交试验评价指标。

2.3.2 二次回归正交试验设计及结果

根据表 4 中数据通过计算机软件 DPS7.05 进行分析,建立数学回归模型,得到二次多项式逐步回归方程如下:

$$Y=5.415\ 94-0.024\ 89X_1-0.032\ 24X_2-0.762\ 66X_3-0.737\ 42X_4+0.000\ 19X_1^2+0.000\ 77X_2^2+0.040\ 49X_3^2+0.112\ 54X_4^2+0.000\ 09X_1X_2+0.000\ 54X_1X_3+0.003\ 39X_1X_4-0.000\ 48X_2X_3-0.002\ 16X_2X_4+0.031\ 51X_3X_4$$
 (2)

式中 Y 为 IgG 结合能力, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 为反应温度、反应时间、pH 值、咖啡酸浓度实际值。

经回归分析,二次多项式逐步回归线性方程相关系数 $r=0.977\ 5$,体现出二次多项式逐步回归方程与全部试验值在整体上的符合程度较高。显著水平 $P=0.001<0.05$,回归方程显著。

2.3.3 因素间交互效应分析

由表 5 及图 8 可知,交互项 x_1x_4 对 IgG 结合能力影响极显著,表示 x_1 (温度) 与 x_4 (咖啡酸浓度) 之间存在交互作用, x_1 (温度) 与 x_4 (咖啡酸浓度) 交互图见图 8。经 DPS 分析数据后发现,当温度为 33.210 6 °C、CA 浓度为 1.767 6 mg/mL 时, IgG 结合能力降到最低。

表 4 二次回归正交组合设计正交表及结果

Table 4 Quadratic regression orthogonal combination design orthogonal table and results

试验号 Test No.	温度 Temperature x_1	时间 Time x_2	pH 值 pH value x_3	CA 浓度 CA concentration x_4	IgG 结合能力 IgG binding capacity/%
1	1	1	1	1	80.75
2	1	1	1	-1	85.97
3	1	1	-1	1	75.71
4	1	1	-1	-1	87.52
5	1	-1	1	1	77.28
6	1	-1	1	-1	83.86
7	1	-1	-1	1	73.37
8	1	-1	-1	-1	82.69
9	-1	1	1	1	74.32
10	-1	1	1	-1	89.76
11	-1	1	-1	1	69.12
12	-1	1	-1	-1	93.23
13	-1	-1	1	1	73.81
14	-1	-1	1	-1	88.66
15	-1	-1	-1	1	73.63
16	-1	-1	-1	-1	86.36
17	-1.546	0	0	0	72.67
18	1.546	0	0	0	77.99
19	0	-1.546	0	0	79.13
20	0	1.546	0	0	75.21
21	0	0	-1.546	0	72.72
22	0	0	1.546	0	73.32
23	0	0	0	-1.546	92.76
24	0	0	0	1.546	69.77
25	0	0	0	0	69.68
26	0	0	0	0	71.23
27	0	0	0	0	71.79

表 5 偏回归系数显著性检测结果

Table 5 Significance test of partial regression coefficients

来源 Source	偏相关 Partial correlation	T 检验值 T score	P-值 P-value	显著性 Significance
x_1	-0.521 2	2.115 8	0.054 2	
x_2	-0.421 4	1.609 7	0.131 5	
x_3	-0.406 0	1.538 8	0.147 8	
x_4	-0.767 1	4.142 4	0.001 2	**
x_1^2	0.640 3	2.887 6	0.012 7	*
x_2^2	0.759 2	4.041 2	0.001 4	**
x_3^2	0.393 7	1.483 8	0.161 7	
x_4^2	0.882 8	6.510 2	0.000 1	**
x_1x_2	0.246 0	0.948 1	0.360 4	
x_1x_3	0.134 7	0.470 8	0.645 6	
x_1x_4	0.729 4	3.693 1	0.002 7	**
x_2x_3	-0.072 8	0.252 7	0.804 5	
x_2x_4	-0.378 1	1.414 6	0.180 7	
x_3x_4	0.443 6	1.714 8	0.110 1	

注: $P\leq 0.01$ 为极显著,用**表示; $P\leq 0.05$ 为显著,用*表示; $P>0.05$,不显著。

Note: $P\leq 0.01$ is highly significant, denoted by **; $P\leq 0.05$ is significant, denoted by *; $P>0.05$, non-significant.

2.3.4 验证试验

利用数学求极值的方法,对回归方程求一阶偏导数,

解方程组并代入取整后温度、时间、pH 值和咖啡酸浓度的值分别为 33.2 °C、25 h、8.67、1.76 mg/mL, 可以得到理论上最低的 IgG 结合能力为 67.63%。按照最佳交互参数进行 3 次验证, 其 IgG 结合能力为 69.31%, 与理论值接近, 相对误差为 2.48%, 实测接枝量 119.16 nmol/mg, 与理论值 121.78 nmol/mg 接近, 相对误差 2.14%, 进一步验证数学回归模型的可信度。另外从图 9a 紫外光谱图及图 9b 荧光光谱图看出在优化条件下咖啡酸与 Ara h1 交互后改变蛋白结构, 从而影响其抗原性, 表明优化条件能较好促进咖啡酸与花生致敏蛋白 Ara h1 交互。

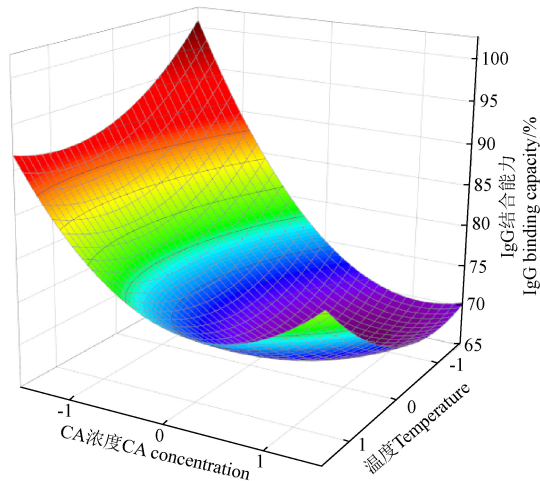


图 8 温度与咖啡酸浓度的交互图

Fig.8 Interaction plot of temperature and coffee acid concentration

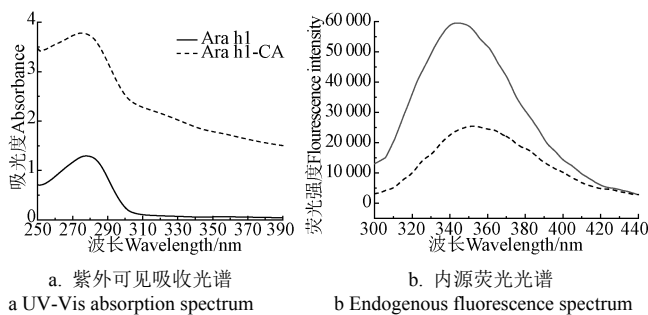


图 9 验证试验光谱图

Fig.9 Validation test spectrogram

3 结论

1) 利用碱法、酶法、自由基法使致敏蛋白 Ara h1 与咖啡酸共价结合后, 其抗原性下降, 其中碱法共价接枝物抗原性下降显著, 接枝量 48.42 nmol/mg, 显著高于其他两种方法。在紫外光谱中碱法接枝物蓝移最明显, 所引起紫外吸收强度改变最大。在荧光光谱中 3 种接枝方法荧光强度由小到大依次为: 碱法接枝物<酶法接枝物<自由基法接枝物。因此综合选择碱法作为较优反应方法。

2) 经单因素试验和二次回归正交组合试验优化碱法交互工艺参数, 优化条件为反应温度 33.2 °C、反应时间 25 h、pH 值 8.67、咖啡酸浓度 1.76 mg/mL, 此时花生致敏蛋白 Ara h1 的 IgG 结合能力下降到 69.31%,

接枝量为 119.16 nmol/mg, 均与理论值接近。咖啡酸浓度对致敏蛋白 IgG 结合能力影响极显著 ($P<0.01$), 交互项温度与咖啡酸浓度对 IgG 结合能力影响极显著 ($P<0.01$)。本研究为后续花生致敏蛋白 Ara h1 与多酚交互脱敏提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] 郝莉花, 陈复生, 刘昆仑, 等. 不同品种花生油脂体粒径电位和蛋白质组成的分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(18): 279-284.
Hao Lihua, Chen Fusheng, Liu Kunlun, et al. Analysis of sizes, zeta potential and protein component of oil bodies extracted from different peanut varieties[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(18): 279-284. (in Chinese with English abstract)
- [2] Hurlburt B K, McBride J K, Nesbit J B, et al. Purification of recombinant peanut allergen Ara h1 and comparison of IgE binding to the natural protein[J]. Foods, 2014, 3(4): 642-657.
- [3] 潘迪. 超高压及其协同酶处理对花生致敏蛋白 Ara h1 的免疫反应性及结构的影响研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
Pan Di. Effects of High Hydrostatic Pressure and Its Assisted Enzyme Treatment on the Immunoreactivity and Structure of Peanut Allergenic Protein Ara h1[D]. Xiamen: Xiamen University, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [4] Alves R C, Pimentel F B, Nouws H P A, et al. Detection of Ara h1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 64: 19-24.
- [5] Sobhan A, Oh J H, Park M K, et al. Assessment of peanut allergen Ara h1 in processed foods using a SWCNTs-based nanobiosensor[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 82(7): 1134-1142.
- [6] Faisal S, Aimin S, Jon A, et al. Peanut allergy: Characteristics and approaches for mitigation[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(5): 1361-1387.
- [7] 李颖超. 加工处理对花生致敏原的影响及其机理[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
Li Yingchao. Effect of Processing on Peanut Allergens and Its Mechanisms[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [8] Bublin M, Breiteneder H. Developing therapies for peanut allergy[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2014, 165(3): 179-194.
- [9] White B L, Shi X L, Burk C M, et al. Strategies to mitigate peanut allergy: Production, processing, utilization, and

- immunotherapy considerations[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2014, 5(1): 155-176.
- [10] 石振鹏, 吴子健, 刘敏尧, 等. 酶法消减花生浆中两种主要过敏蛋白的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 44-48.
Shi Zhenpeng, Wu Zijian, Liu Minyao, et al. Enzymolysis conditions for alleviating two important allergic proteins of peanut pulp[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(21): 44-48. (in Chinese with English abstract)
- [11] 王烁, 张春红, 李淑荣. 辐照处理对花生致敏蛋白的影响[J]. *花生学报*, 2009, 38(2): 1-5.
Wang Shuo, Zhang Chunhong, Li Shurong. Effect of radiation process on allergic proteins of peanut[J]. *Journal of Peanut Science*, 2009, 38(2): 1-5. (in Chinese with English abstract)
- [12] 许舒婷. 低敏花生品种筛选及电子束辐照对其免疫原性影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
Xu Shuting. Screening of Hypoallergenic Peanut and Effect of Electron Beam Irradiation on Immunoreactivity of Peanut Allergens[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [13] 张驰, 李春翼, 王启明, 等. 植物多酚与花生致敏蛋白相互作用及脱敏机理研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(23): 313-318.
Zhang Chi, Li Chunyi, Wang Qiming, et al. Interaction between plant polyphenols and peanut allergenic proteins and mechanism for allergenicity reduction: A review[J]. *Food Science*, 2019, 40(23): 313-318. (in Chinese with English abstract)
- [14] 苏世伟, 王睿黎, 郭顺堂, 等. 核桃酚类物质和蛋白间的相互作用及其抗氧化活性[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(22): 309-314.
Su Shiwei, Wang Ruican, Guo Shuntang, et al. Walnut phenolic compounds: Binding with proteins and antioxidant activities[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2016, 32(22): 309-314. (in Chinese with English abstract)
- [15] 黄子林, 孔祥珍, 张丽娜, 等. 蛋白质与多酚相互作用研究进展[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(3): 195-202.
Huang Zilin, Kong Xiangzheng, Zhang Lina, et al. Research progress in the interaction between protein and polyphenol[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2021, 36(3): 195-202. (in Chinese with English abstract)
- [16] Li M Q, Karboune S, Liu L, et al. Combining phenolic grafting and laccase-catalyzed cross-linking: Effects on structures, technofunctional properties and human immunoglobulin E binding capacity of egg white proteins[J]. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129587-129587.
- [17] Cao Y, Xiong Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. *Food Chemistry*, 2015, 180: 235-243.
- [18] 顾璐萍. 儿茶素-蛋清蛋白抗氧化性载体材料的制备、表征及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
Gu Luping. Preparation, Characteristics and Application of Antioxidant Delivery System: Catechin-egg White Protein Conjugates[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [19] Plundrich N J, Bansode R R, Foegeding E A, et al. Protein-bound Vaccinium fruit polyphenols decrease IgE binding to peanut allergens and RBL-2H3 mast cell degranulation in vitro[J]. *Food & Function*, 2017, 8(4): 1611-1621.
- [20] Rishipal R B, Priscilla D R, Nathalie J P, et al. Peanut protein-polyphenol aggregate complexation suppresses allergic sensitization to peanut by reducing peanut-specific IgE in C3H/HeJ mice[J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125025.
- [21] Dziedzic A, Kubina R, Agata K D, et al. Caffeic acid reduces the viability and migration rate of oral carcinoma cells (SCC-25) exposed to low concentrations of ethanol[J]. *International Journal of Medical Students*, 2014, 15(10): 18725-18741.
- [22] Xiao S, Zhu Y D, Zhou J Y, et al. Antioxidant effects of caffeic acid lead to protection of drosophila intestinal stem cell aging[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 735483.
- [23] 闫飞. 花生过敏原蛋白 Ara h1 的纯化表达研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
Yan Fei. Purification and Expression of Peanut Allergen Ara h1[D]. Nanchang: Nanchang University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [24] Wu Z H, Yan F, Wei X N, et al. Purification and recombinant expression of major peanut allergen Ara h1[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 45(5): 438-446.
- [25] Tao F, Jiang H, Chen W W, et al. Covalent modification of soy protein isolate by (-)-epigallocatechin-3-gallate: Effects on structural and emulsifying properties[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(15): 5683-5689.
- [26] 刘夫国. 蛋白质-多酚-碳水化合物共价复合物制备及其对功能因子稳态作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
Liu Fuguo. Fabrication of Protein-polyphenol-Carbohydrate

- Conjugates and Their Stabilization Effect on Functional Components[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [27] Prigent S V, Voragen A G, Li F, et al. Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(10): 1748-1754.
- [28] 陈卫军, 刘东红, 李云成, 等. 制备方法对乳清分离蛋白-绿原酸共价接枝物结构和功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(13): 43-50.
- Chen Weijun, Liu Donghong, Li Yuncheng, et al. Effect of preparation methods on the structural and functional properties of whey protein isolate-chlorogenic acid conjugates[J]. *Food Science*, 2021, 42(13): 43-50. (in Chinese with English abstract)
- [29] Xue F, Li C, Zhu X W, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through maillard reaction[J]. *Food Research International*, 2013, 51(2): 490-495.
- [30] 周昊, 王成章, 叶建中, 等. 高静压处理改善白果蛋白致敏性和功能特性[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(8): 292-298.
- Zhou Hao, Wang Chengzhang, Ye Jianzhong, et al. Improvement of allergenicity and functional properties of proteins from ginkgo seeds by high hydrostatic pressure treatment[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2016, 32(8): 292-298. (in Chinese with English abstract)
- [31] 王喜波, 张安琪, 王玉莹, 等. 巴氏杀菌和超巴氏杀菌对牛乳清蛋白结构及热稳定性的影响[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(6): 307-313.
- Wang Xibo, Zhang Anqi, Wang Yuying, et al. Effect of pasteurization and ultra-pasteurization on structure and thermal stability of fresh milk whey protein[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2019, 35(6): 307-313. (in Chinese with English abstract)
- [32] 罗春萍. 热加工、辐照及超高压微射流对花生过敏原 Ara h 6 结构与抗原性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- Luo Chunping. Effect of Heat-treatment, Irradiation and High-pressure Microfluidization on the Structure and Antigenicity of Peanut Allergen Ara h6[D]. Nanchang: Nanchang University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [33] 阚茗铭, 叶发银, 赵国华. 多酚-蛋白质共价作用及其对食品体系的影响研究进展[J]. *食品科学*, 2015, 36(1): 245-249.
- Kan Mingming, Ye Fayin, Zhao Guohua. Advance in research on covalent interactions of polyphenol and protein and their effects on food system[J]. *Food Science*, 2015, 36(1): 245-249. (in Chinese with English abstract)
- [34] Poklar U N. Analytical techniques for the study of polyphenol-protein interactions[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2017, 57(10): 2144-2161.
- [35] 魏子淇. 乳蛋白-EGCG 和壳聚糖-绿原酸复合物的制备、结构表征及功能评价[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- Wei Zihao. Preparation, Structural Characterization and Functional Evaluation of Milk Protein-EGCG and Chitosan-Chlorogenic Acid Complexes[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [36] Prigent S V E, Voragen A G J, Li F, et al. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(13): 2502-2510.
- [37] Tantoush Z, Apostolovic D, Kravic B, et al. Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase[J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(3): 650-660.
- [38] Kroll J, Rawel H M, Rohn S, et al. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(3), 205-218.
- [39] 孙崇荣. 蛋白质化学导论[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1991: 207-212.
- [40] Li S, Huang K, Zhong M, et al. Comparative studies on the interaction of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid with bovine serum albumin[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, 77(3): 680-686.
- [41] Prigent S, Gruppen H, Visser A, et al. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(17): 5088-5095.
- [42] Ozdal T, Capanoglu E, Altay F, et al. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. *Food Research International*, 2013, 51(2): 954-970.

Effects of interaction between peanut allergenic protein Ara h1 and caffeic acid on its antigenicity

Ren Hongtao^{1,2,4}, Shi Qilei^{1,2}, Li Jing^{1,2}, Yu Qiuying^{1,2,3}, Wang Fan^{1,2}, Hu Mei^{1,2,3}, Wang Na^{1,2,3,4,5*}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Nutrition and Healthy Food of Zhengzhou, Zhengzhou 450002, China; 3. International Joint Research Center for Animal Immunology, Zhengzhou 450002, China; 4. Key Laboratory of Bulk Grain Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhengzhou 450002, China; 5. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Peanut is one of the eight major allergens identified by the Food and Agriculture Organization (FAO), because of the high prevalence, severe reactions, and the lack of reliable treatment. Thus, a large negative impact has posed on the peanut-allergic population and the peanut industry. Most current peanut desensitization treatments have presented nutritional damage and low safety, including physical heating, and genetic engineering. Alternatively, a new avenue of peanut desensitization can be the interactions between natural plants' polyphenols and proteins. This study aims to explore the effect of interactions between peanut allergenic protein Ara h1 and caffeic acid on the antigenicity during peanut desensitization. Firstly, the peanut allergen Ara h1 was covalently treated with caffeic acid by three methods: alkaline, enzymatic, and free radical method. Then, the complex structural, antigenic changes, the reactive groups, and the binding equivalents of Ara h1-CA were analyzed by fluorescence spectroscopy, Ultraviolet (UV) spectroscopy, and indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results showed that the alkali method performed the best in the three ones, indicating the highest binding equivalents, and the largest number of reactive groups participated in the reaction. In the UV spectrum, the blue shift of the graft was found to be the most outstanding from 280 to 273 nm in the alkali method, indicating the greatest change in UV absorption intensity. The fluorescence intensity of the alkali graft decreased significantly, and there was a slight red shift in the fluorescence spectra. The Immunoglobulin G (IgG) binding capacity of the alkali graft decreased to 76.8% by ELISA analysis, followed by the enzyme and the free radical method. There was no significant difference between the enzyme and free radical method. Therefore, the best reaction was optimized on the reaction temperature, reaction time, pH value, and caffeic acid concentration in the alkali interactions. The single-factor and quadratic regression orthogonal experiments showed that the optimal combination was achieved, where the reaction temperature was 33.2 °C, the reaction time was 25 h, pH value was 8.67, and the caffeic acid concentration was 1.76 mg/mL. In this case, the antigenicity of Ara h1-CA decreased to 69.31%, and the grafting amount was 119.16 nmol/mg. Furthermore, it was found that the caffeic acid concentration and its interaction with the temperature were extremely remarkable to influence the IgG-binding ability. The experiments showed that the interaction between caffeic acid and peanut allergenic protein Ara h1 reduced the antigenicity of peanut allergenic protein. The finding can provide a strong reference for the peanut desensitization and further influencing mechanism.

Keywords: proteins; optimization; peanut; allergenic protein Ara h1; antigenicity; caffeic acid