

发酵生产低致敏乳源蛋白基料的研究*

郭 鸽,任大喜,张英华,雷雨婷,刘 芳,吴 刚,霍贵成

(东北农业大学食品学院,乳品科学教育部重点实验室,黑龙江哈尔滨,150030)

摘 要 利用益生菌发酵,从而降低牛乳蛋白抗原性是目前研究的一个新领域,对于功能性蛋白基料开发具有十分重要的意义。实验中筛选出1株乳杆菌作为发酵菌种,用于生产低致敏乳源蛋白基料。研究其水解乳蛋白的能力及发酵产物中抗原降解的情况。研究发现,发酵乳中 α -乳白蛋白(α -LA), β -乳球蛋白(β -LG), α S-酪蛋白(α S-CN), β -酪蛋白(β -CN)和牛血清白蛋白(BSA)的抗原降解率分别为31.8%,20.54%,4.08%,18.67%和25.47%。确认菌种为瑞士乳杆菌。可被用于生产低致敏乳源蛋白基料。

关键词 牛乳蛋白过敏,乳源蛋白基料,发酵

牛乳蛋白营养丰富,可作为母乳替代品,但某些婴儿食用婴儿配方乳粉会引起牛乳蛋白过敏。大量的流行病学研究发现,牛乳蛋白过敏(Cow Milk Protein Allergy, CMPA)是新生儿和婴儿中最普遍的一类过敏,在西方国家发病率约为1.5%~7%。牛乳蛋白引起的过敏可造成过敏性鼻炎、哮喘、湿疹、特异性皮炎、腹泻、胃肠出血等疾病。导致儿童生长发育缓慢并影响消化吸收,甚至威胁生命。因此如何脱除牛乳蛋白过敏原,制造低致敏性乳源蛋白基料已成为食品科技工作者的研究课题。膳食中发酵食品(或含乳酸菌的食物)调节免疫应答的能力已在动物疾病模型中得到了深入的研究^[1]。研究显示,食用乳酸菌和双歧菌菌株可提高机体对细胞内细菌病原体的抵抗能力,控制鼠内瘤的增长^[2]。本文通过对实验室保藏的乳杆菌进行分离、纯化、筛选,最终确定合适的菌种用于发酵生产可有效降低抗原性的低致敏乳源蛋白基料。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

乳品科学教育部重点实验室收藏的乳杆菌(*Lactobacillus*),共4株,编号分别为KLDS3.315、KLDS5.516、KLDS4.342和KLDS2.227。

1.1.2 培养基

MRS培养基^[3]。

1.1.3 其他试剂和设备

聚苯乙烯塑料板(简称酶标板),96孔(加拿大JET生化制品公司)、酶标仪 Model 680(美国伯乐公司)、洗板机 Model 1575(美国伯乐公司)等,牛乳蛋白抗原购自Sigma公司,弗氏佐剂,L-酪氨酸,三氯乙酸,邻苯二甲醛(OPA)等购自北京奥博星生物技术有限公司。自制多克隆抗体。

1.2 方 法

1.2.1 菌种活化与分离纯培养

在灭完菌的超净工作台中,挑取少量菌种冻干粉,转移到MRS液体培养基中,搅匀后放于37℃生化培养箱,培养24h。按1%的接菌量,将长出菌落的菌株传代培养于新的MRS液体培养基中,37℃培养24h。如此传代培养2~3代,使各菌株活力恢复。

将活化好的菌株划线培养于MRS固体培养基的平板上,置37℃培养箱中培养至长出合适大小的菌落。挑单菌落培养于MRS液体培养基中,同时镜检观察所得菌株是否为纯菌。若菌株已经为纯菌,则进行下一步试验,否则继续分离纯化。

1.2.2 发酵条件的优化

将脱脂乳粉按照11%比例复原为脱脂乳,分别向脱脂乳中加入1%、3%、5%和7%的酪蛋白,另外再向11%脱脂乳中加入1%、3%、5%和7%的乳清蛋白,经115℃,10 min灭菌,冷却后以接种量为4%的比例接入发酵剂,搅拌均匀后分装,放入培养箱在各菌种的最适培养温度条件下发酵。测定不同添加量的发酵乳中的游离氨基酸、残余抗原和细菌总数。确定最适发酵菌种和发酵条件。

1.2.2.1 活菌计数

取0.5 mL待测菌液(发酵液或菌悬液)用稀释液进行10倍梯度稀释,选择适当的稀释梯度,吸取10 μ L菌悬液置于MRS(杆菌)琼脂平板上,每个稀释

第一作者:博士,讲师(霍贵成教授为通讯作者)。

*国家自然科学基金资助项目(No. 30771578/C020303)

收稿日期:2007-03-15,改回日期:2007-07-26

梯度做3个平行,将菌悬液均匀涂开,然后将平板移入培养箱中37℃恒温培养48h,待长出菌落后计数。

1.2.2.2 邻苯二甲醛(OPA)法检测游离氨基酸含量

将发酵后的脱脂乳搅匀后取1 mL,加入2 mL 0.75 mol/L 三氯乙酸溶液,混匀。6 000 r/min 离心5 min后,取上清液备用。取100 μL 双蒸水,加入200 μL 0.75 mol/L 三氯乙酸溶液、6 mL OPA 试剂后,混匀,作为空白样。取100 μL 样品离心后的上清液,加入2 mL OPA 试剂,混匀后于340 nm 波长下检测其吸光值^[4]。

用L-酪氨酸作为标准样,配制梯度稀释溶液。取100 μL 标准样,加入2 mL OPA 试剂,混匀后于340 nm 波长下检测其吸光值。绘制氨基酸浓度与吸光度的标准曲线,计算样品中游离氨基酸含量。

1.2.2.3 发酵产物残余抗原活性的测定

以牛乳中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α s-酪蛋白、 β -酪蛋白、牛血清白蛋白为抗原免疫兔子,制备多克隆抗体。采用间接抑制酶联免疫吸附法测定牛乳水解物中残余过敏蛋白的含量^[5]。

1.2.2.4 菌种的16SrDNA 基因序列及聚类分析

提取基因组DNA。进行PCR 扩增,16SrDNA 基因序列确定后,克隆16SrDNA 基因与测序,最后进行同源性分析^[6]。

2 结果与讨论

2.1 菌种的选择

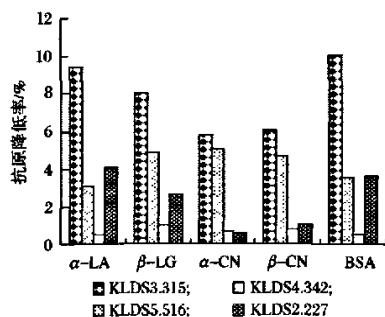


图1 不同发酵乳中抗原活性降低率的比较

图1显示了4个菌株都具有降低乳中过敏原的能力,但是降低能力差异较大。KLDS3.315 对抗原蛋白降解能力较强,尤其是对乳清蛋白。KLDS5.516 次之,且对酪蛋白抗原活性降低程度与KLDS3.315 近似。KLDS4.342 和KLDS2.227 发酵

乳中残余抗原活性较高,尤其是KLDS4.342,几乎不能降低乳蛋白的抗原活性。故选择KLDS3.315 和5.516 进行进一步研究。

2.2 发酵条件的优化

在2株菌的脱脂乳培养基中分别添加不同含量的酪蛋白和乳清蛋白,测定菌株的生长情况,蛋白水解能力和降低抗原的能力,确定最适的添加剂量。实验中为了方便比较,将接种量统一为4%,采用乳酸菌的最适生长温度进行培养,菌种发酵乳凝乳时间为48h,凝乳后,直接处理用于测定。

2.2.1 菌种的生长情况

由图2和图3可见,在分别添加酪蛋白和乳清蛋白后,KLDS3.315 生长良好,活菌数达到 $1.5 \times 10^7 \sim 8 \times 10^8$ CFU/mL。在添加乳清蛋白的培养基中生长情况优于在添加了酪蛋白的培养基中。其中,在添加量为5%的乳清蛋白中,菌落总数最大。

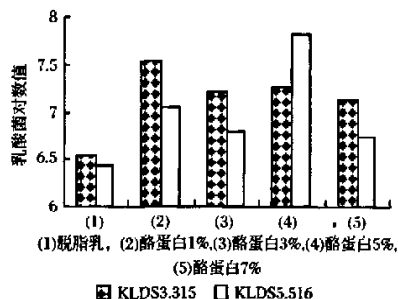


图2 酪蛋白对乳酸菌生长的影响

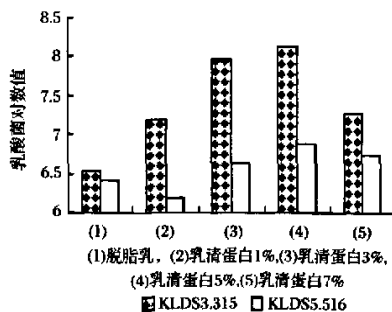


图3 乳清蛋白对乳酸菌生长的影响

KLDS5.516 在添加了酪蛋白的培养基中生长良好,而在添加了乳清蛋白的培养基中生长缓慢。在1%乳清蛋白中菌落总数下降。说明KLDS3.315 更易利用乳清蛋白进行生长,而KLDS5.516 能更好地利用酪蛋白。

2.2.2 蛋白水解能力

采用OPA 试剂法来测定游离氨基酸以酪氨酸

标准品作为参比,达到初步定量标准曲线见图4,得到标志曲线方程为 $y=1.418x+0.0143$,相关系数为0.9993。

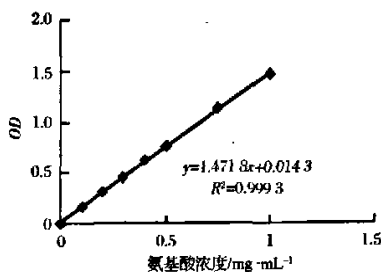


图4 游离氨基酸测定标准曲线

通过比较各菌株发酵样品在波长为340 nm处的吸光度值或相当于酪氨酸浓度值较大的菌株为今后研究内容的供试菌株。测定结果见图5和图6。

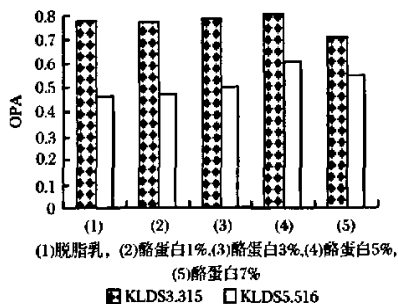


图5 酪蛋白对乳酸菌蛋白分解能力的影响

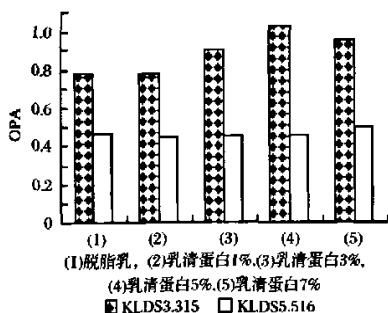


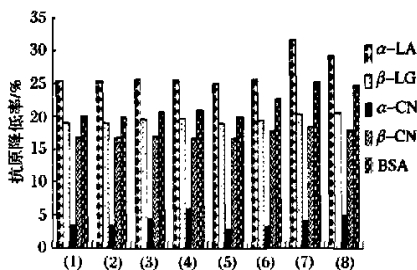
图6 乳清蛋白对乳酸菌蛋白分解能力的影响

不同乳酸菌的蛋白水解度差别很大,即使是同一菌株的不同菌种,其蛋白水解度也存有差异。因此本试验选择的是实验室保存的乳杆菌作为研究对象,以便消除不同乳杆菌和乳球菌无法比较而产生的偏差。结果显示了KLDS3.315和KLDS5.516的蛋白分解能力随着添加酪蛋白或乳清蛋白而逐渐增加,KLDS3.315在添加了乳清蛋白的脱脂乳中分解蛋白的能力尤其突出,在5%乳清蛋白中游离氨基酸含量为1.03mg/mL。此外,KLDS3.315的蛋白分解能力

要明显高于KLDS5.516。同菌株的生长性状结合可以发现,细菌生长活力影响了菌株的蛋白分解能力。菌株生长活力强,蛋白分解的能力就大。

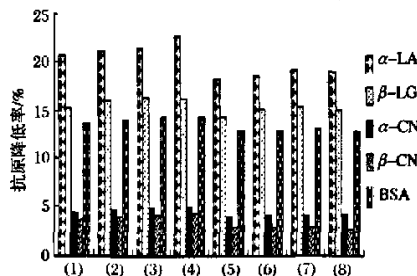
2.2.3 酪蛋白和乳清蛋白对残余抗原活性的影响

不同蛋白添加量的发酵乳中残余抗原活性结果见图7和图8,随着蛋白添加量的增加,2株菌株都可不同程度地降低乳中的过敏原。



(1)酪蛋白1%,(2)酪蛋白3%,(3)酪蛋白5%,(4)酪蛋白7%,(5)乳清蛋白1%,(6)乳清蛋白3%,(7)乳清蛋白5%,(8)乳清蛋白7%

图7 酪蛋白和乳清蛋白对KLDS3.315发酵乳中残余抗原活性的影响



(1)酪蛋白1%,(2)酪蛋白3%,(3)酪蛋白5%,(4)酪蛋白7%,(5)乳清蛋白1%,(6)乳清蛋白3%,(7)乳清蛋白5%,(8)乳清蛋白7%

图8 酪蛋白和乳清蛋白对KLDS5.516发酵乳中残余抗原活性的影响

实验中验证了Janine推断的乳酸菌的抗过敏机理的假设,即:乳酸菌具有酶解致敏食物蛋白的能力,或乳酸菌附植在肠粘膜上减少了食物产生过敏原的系统摄入量的能力^[7]。

KLDS3.315对添加了乳清蛋白的乳的抗原性消除能力大,尤其是对 α -LA的降解能力较高,而不论是添加了乳清蛋白还是酪蛋白的培养基中,对酪蛋白的抗原性消除能力都不大。与之相比的KLDS5.516降解抗原能力较弱。随着培养基中蛋白添加量的增加,菌株对抗原性的消除逐渐增加。但增加到一定程度,则即使增加蛋白添加量,残余抗原降低率也未见

明显增加。

KLDS3.315 在添加了乳清蛋白的脱脂乳中生长良好,蛋白水解力强,降低残余抗原含量多;而 KLDS5.516 在酪蛋白优化的培养基中降低残余抗原含量大。这说明两株菌虽然具有蛋白水解能力,其快速的生长又摄取了自身酶分解基质蛋白质释放的游离氨基酸。他们带有对酪蛋白和乳清蛋白特异性水解的酶类。

2.3 菌种的 16S rDNA 基因序列及聚类分析

重组质粒经过筛选、质粒提取和质粒酶切验证后,挑选其中的 1 个阳性克隆进行测序,结果获得长度为 1 500bp 左右的 16S rRNA 基因序列,然后利用 Genebank 上的 Blast 程序对这些序列与 Genebank 中收录的序列进行了同源性比较,结果如下: KLDS3.315 与瑞士乳杆菌 *L. helveticus* 的同源性达到 99%,因此可以判定 KLDS3.315 为瑞士乳杆菌 *L. helveticus*。

3 结 论

近年来的研究表明,食用发酵食品,尤其是以牛乳为基料的乳制品可减轻一些遗传性过敏的症状并限制病症的发展。因此将益生菌应用于牛乳蛋白中,开发新的功能水解物是减缓过敏的有效技术。本实验以 KLDS3.315 为发酵剂,在 10% 脱脂乳中添加 5% 乳清蛋白为发酵原料制备低致敏乳源蛋白基料是

可行的。

参 考 文 献

- 1 Frick OL, Teuber SS, Buchanan BB, et al. Allergen immunotherapy with heat-killed *Listeria monocytogenes* alleviates peanut and food-induced anaphylaxis in dogs[J]. *Allergy*, 2005, 60:243~250
- 2 Adel Patient K. Prevention of an IgE response to bovine beta-lactoglobulin by gene immunization in mice[J]. *Allergy Immunol (Paris)*, 2002, (4):7~81
- 3 凌代文主编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 6~33
- 4 Church FC, Swaisgood HE, Porter DH. Spectrophotometric assay using α -phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins[J]. *Journal Dairy Science*, 1983, 66:1 219~1 227
- 5 Barbara Wroblewska, Magdalena Karamac, Ryszard Amarowicz, et al. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, 39: 839~850
- 6 Giorgio G. An evaluation of chelex based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42:175~184
- 7 Janine Ezendam, Henk van Loveren. Probiotics; Immunomodulation and evaluation of safety and efficacy[J]. *Nutrition Reviews*, 2006, 64(1): 1~14

Study on Hypoallergenic Protein Ingredients from Milk Source by Fermentation

Guo Ling, Ren Daxi, Zhang Yinghua, Lie Yuting, Wu Gang, Huo Guicheng

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education Northeast Agricultural University, Food College, Harbin 150030, China)

ABSTRACT Reducing the protein antigen fermented by probiotic has become a new research field in recent years, and it is significant to the development of the functional food market. Proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* was studied in this article and the ACE-inhibitory activity of the products was also researched. It showed that the products harvested in the period of logarithm growth have better performance. A strain was used to decrease allergen. Proteolytic activity of *Lactobacillus* was studied in this article and the degradation of antigen of the fermented products was also researched. The decreasing rates of allergen are α -LA31.8%, β -LG20.54%, α -s-CN4.08%, β -LCN18.67% and BSA25.47%. The stain is identified as *Lactobacillus helveticus*. It can be used to produce hypoallergenic protein ingredients from milk source.

Key words cow milk protein allergy, milk proteins ingredients from milk source, fermentation