

# 水产品主要过敏原的模拟胃液消化 实验的条件优化\*

刘光明 黄园园 蔡秋凤 翁 凌 苏文金 曹敏杰

(福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 集美大学生物工程学院 厦门 361021)

**提要** 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和免疫印迹(Western blot)方法,通过体外模拟消化实验分析水产品主要过敏原原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)和小清蛋白(Parvalbumin, PV)的消化特性,主要研究酶/蛋白的比值、pH 值对模拟胃液(SGF)消化过敏蛋白稳定性的影响。结果表明,提高胃蛋白酶的相对量使甲壳类水产品 TM 从消化稳定性转变成消化不稳定性,但是 TM 具有较强的消化稳定性,当酶/蛋白比值提高到 10/1 时,一些稳定的降解条带仍未被完全分解;当 pH 5 时胃液消化会受到抑制,甲壳类水产品 TM 和鱼类 PV 均不会被消化分解。在优化条件(0.33U 酶/ $\mu\text{g}$  蛋白, pH 3.5)的 SGF 消化试验中,甲壳类水产品 TM 具有较高的消化稳定性,而鱼类 PV 能被较快分解;甲壳类水产品过敏蛋白相对于非过敏蛋白具有较高的消化稳定性,其降解产物仍可能引起过敏反应的发生。

**关键词** 水产品过敏原, 模拟胃液消化, 原肌球蛋白, 小鱼蛋白, SDS-PAGE, Western blot

**中图分类号** TQ93

近年来,因食用水产品而发生过敏反应的比率逐年增高(宋益银等, 2009; Lopata *et al.*, 2009), 因此,开展水产品过敏研究具有重要的现实意义。甲壳类水产品是引起食物过敏的最常见水产品之一,研究表明,原肌球蛋白(tropomyosin, TM)是甲壳类水产品中的主要致敏原(Leung *et al.*, 1998)。小鱼蛋白(parvalbumin, PV)是鱼类主要过敏原(Lopata *et al.*, 2009)。已报道鳕鱼(Aas *et al.*, 1967)、大西洋鲑鱼(Lindström *et al.*, 1996)、鲤鱼(Bugajska *et al.*, 2000)、鲭鱼(Hamada *et al.*, 2003)等多种鱼类 PV 能引起人类 IgE 介导的过敏反应。

过敏原的蛋白酶水解稳定性取决于蛋白酶与过敏蛋白的比值(Wickham *et al.*, 2009), 不同人消化系统分泌的蛋白酶量有所不同。因此,本文以几种具有重要经济价值和食用价值的水产品为研究对象,研究不同的酶与蛋白比值、pH 值对过敏蛋白消化稳定性的影响,优化分析过敏原消化稳定性的实验条件,

以期为保证水产品安全性提供技术依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

鲜活锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*)、鲫鱼(*Carassius auratus cuvieri*)和鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)购自厦门市集美菜市场。即杀取肉后直接用于实验。

SDS-PAGE 所用的标准蛋白为 GE 公司和 Fermentas 公司产品, Western blot 所用的标准蛋白为 New England BioLab 公司产品, DEAE-Sepharose 为 Pharmacia 公司产品, 山羊抗兔 IgG-HRP 为 Pierce 公司产品, 猪胰蛋白酶、猪胰凝乳蛋白酶为 Sigma 公司产品, 猪胃蛋白酶, 兔抗锯缘青蟹 TM 多克隆抗体、兔抗鲢鱼 PV 多克隆抗体由本研究室制备(Liang *et al.*, 2008), 其它试剂均为国产分析纯。

\* 国家自然科学基金项目, 31171660 号, 30871947 号; 福建省自然科学基金项目, 2010J06012 号; 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划, NCETFJ-2007 号; 集美大学创新团队基金, 2010A005 号。刘光明, 博士, 教授, E-mail: gmliu@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-04-09, 收修改稿日期: 2010-06-15

主要仪器设备有组织捣碎机(Kinematica, 瑞士), 高速冷冻离心机(Beckman, 美国), 凝胶成像仪(Vilber Lourmat, 法国), 电泳仪及电转移装置(Bio-Rad, 美国), 恒温水浴锅(Memmert, 德国), 微量蛋白测定仪(ND-1000, 德国)等。

## 1.2 方法

**1.2.1 肌原纤维蛋白的制备** 锯缘青蟹肌原纤维的制备参照 Cao 等(2004)的方法。

**1.2.2 TM的纯化** TM的纯化参照 Liang 等(2008)的方法, 略作修改。以下步骤均在 0—4℃进行: 取蟹肉 20g, 用 10 倍体积的缓冲液 A (含 50mmol/L KCl 的 2mmol/L NaHCO<sub>3</sub>)捣碎, 将悬浮液于 5000g 下离心 5min, 将得到的沉淀重新悬浮于 10 倍体积的缓冲液 A 中并捣碎, 以相同条件离心, 再次取沉淀, 如此重复 4 次。将最后得到的沉淀用 10 倍体积的丙酮处理三次, 纱布过滤, 晾干得丙酮粉。将制得的丙酮粉悬浮于 10 倍体积的缓冲液 B (20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含 1mol/L KCl 和 10mmol/L β-巯基乙醇)并捣碎, 20000g 离心 20min, 得上清, 用 3mol/L HCl 调等电点至 pH 4.5, 然后于 20000g 离心 20min, 取沉淀用缓冲液 B 溶解后再用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.6。将此溶液进行饱和度 41%—60% 硫酸铵盐析。将得到的沉淀用缓冲液 B 溶解, 并调等电点至 pH 4.5, 如此重复调等电点和硫酸铵盐析步骤两次, 将沉淀溶于 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 并于 100℃煮 20min, 20000g 下离心 20min, 最后得到的上清即为纯化的 TM 溶液, 分装并冻存于-30℃。

**1.2.3 肌浆蛋白的制备** 鱼类过敏原 PV 主要存在于鱼肉肌浆蛋白中。取新鲜鱼肉用组织捣碎机于 10 倍体积(V/W)的冰冷 20mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)捣碎。重复三次(每次不超过 30s, 中间间隔 1min), 将悬浮液于 8000g 离心 10min, 上清即为粗提的鱼肉肌浆蛋白(Lindstrøm *et al.*, 1996)。

**1.2.4 PV的纯化** 按 1.2.3 的方法制备粗提的鱼肉肌浆蛋白, 于 100℃水浴加热 10min; 冷却至室温, 然后于 15000g 离心 15min, 所得上清进行 70%—100%的饱和硫酸铵盐析, 所得沉淀溶于适量的 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); 将溶液置于透析袋中, 以 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)透析 24h, 期间更换 3 次透析液; 最后将透析后溶液于 10000g 离心 10min, 取上清上样于预先平衡好的阴离子交换柱 DEAE-Sepharose, 然后用缓冲液充分流洗未吸附蛋白(流速

1ml/min), 待流洗到蛋白浓度约为 0 时, 用 0—0.5mol/L NaCl 进行线性洗脱吸附的蛋白, 以 3ml/管收集, 测定 A<sub>280</sub> 和 A<sub>220</sub>(刘光明等, 2009)。

## 1.2.5 模拟胃液(Simulated gastric fluid, SGF)消化

SGF 参照美国药典方法(US Pharmacopoeia, 1995)配制, 参与消化反应的胃蛋白酶活力为 8185U/mg 蛋白, 1L 胃液中含 NaCl 2g, 用 HCl 调 pH 1.2。体外 SGF 消化参照 Thomas 等(2004)的方法, 并作适当修改。在玻璃试管中加入 SGF, 于 37℃预热 15min, 再将纯化的过敏蛋白加入试管中混匀, 总反应体系为 1ml, 胃蛋白酶与 PV 的比例为 1:50 (W/W), 37℃水浴锅中振荡反应。分别在反应 0、1、2、5、10、15、30、60min 后取出 100μl 反应液于 1.5ml 离心管中, 加入 30μl 200mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 混匀使其中止反应, 置于冰上。其中 0min 样品是将含有胃蛋白酶的 SGF 先与 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 中和终止反应, 加入蛋白底物; 对照不加蛋白酶。

**1.2.6 不同酶/蛋白比值的 SGF 消化** 在胃蛋白酶与过敏蛋白不同比值的消化试验, 反应溶液终体积为 100μl, 其中 TM 的终浓度为 60μg/ml, 酶与蛋白的比值分别为 1/20、1/10、1/5、1/1、5/1、10/1 (W/W), 反应在 1.5ml 的离心管中进行。实验步骤如下: 首先将含有胃蛋白酶的 SGF 消化液在 37℃下预热, 然后按不同的比值将纯化的过敏蛋白加入到各预热好的消化液中, 混合均匀, 于 37℃水浴锅中振荡反应 30min (其中鱼类 PV 消化反应 2min), 迅速加入 30μl 的 200mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应, 并置于冰上。对照样品不加酶, 其余步骤相同。

**1.2.7 不同 pH 值的 SGF 消化** 在不同 pH 值的 SGF 消化试验中, 定反应终溶液体积为 100μl, 其中反应液中 TM 的终浓度为 60μg/ml, 胃蛋白酶与过敏蛋白的比值为 1/23 (W/W), 反应在 1.5ml 的离心管中进行。实验步骤如下: 首先将胃蛋白酶和不同 pH 值 (1.2、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0)的缓冲溶液加入到离心管中于 37℃下预热, 然后加入纯化的过敏蛋白, 混合均匀, 在 37℃水浴锅中开始振荡反应 15min 后迅速加入 30μl 的 200mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应, 并置于冰上。

**1.2.8 SDS-PAGE 和 Western blot 分析** SDS-PAGE 参照《精编分子生物学实验指南》(奥斯伯等, 1999), 考马斯亮蓝 R-250 染色; Western blot 依照 Towbin 等(1979)方法, 二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色。

## 2 结果

### 2.1 不同酶/蛋白比值的 SGF 消化甲壳类水产品 TM

在 SGF 试验中改变胃蛋白酶/过敏蛋白相对量来研究 TM 的稳定性, 结果见图 1, 几类甲壳类水产品 TM 的消化稳定性都随着胃蛋白酶/TM 比值的变化而改变。

在酶/蛋白比值为 1/10, 消化 30min 时锯缘青蟹 TM 就被完全分解, 但在 34kDa、20kDa 处仍有降解条带, 这些条带在酶/蛋白比值为 5/1 时被完全分解, SDS-PAGE 检测不到。随着胃蛋白酶的增加, 在 38kDa 处产生一条带, 这个蛋白条带是猪胃蛋白酶(pepsin)(图中简称为 pep, 下同)。TM 经分解后主要在 34kDa、20kDa 处产生蛋白条带(图 1A)。

中华绒螯蟹 TM 的消化规律与锯缘青蟹相似, 但是中华绒螯蟹 TM 对胃蛋白酶相对具有较高的耐消化性。其 TM 在酶/蛋白比值为 1/5, 消化 30min 后仍未被完全分解, 直到比值为 1/1 时, TM 才被完全分解, 其降解条带在 10/1 时完全检测不到。从图中看到, 随着酶相对量的增加, TM 在分子量 34—38kDa 之间及 20kDa 处产生一系列的分解产物(图 1B)。

斑节对虾和南美白对虾 TM 对胃蛋白酶的耐消化性与中华绒螯蟹 TM 一致。它们都是在酶/蛋白比值为 1/1 时, TM 条带被完全分解, 并在 34kDa、22kDa 产生分解产物, 这些分解产物随着酶量的增加, 被逐渐的分解, 但是两种虾 TM 的降解产物(20kDa、18kDa)在酶/蛋白比值为 10/1 时仍然未被完全分解(图 1C、图 1D)。

### 2.2 不同酶/蛋白比值的 SGF 消化鱼类 PV

由于鱼类 PV 对胃蛋白酶比较敏感, 较易被分解, 所以取消化反应时间为 2min。从图 2A 中可以看到鲫鱼 PV 在酶/蛋白比值为 1/20 时, PV 条带已经检测不到, 在 4kDa、2kDa 处产生降解产物, 这些降解产物在 1/1 时用 SDS-PAGE 无法检测到。而鲢鱼 PV 对胃蛋白酶消化相对来说更加不稳定, 它在酶/蛋白比值为 1/20 时就完全分解, 且检测不到降解产物(图 2B)。

### 2.3 不同 pH 值的 SGF 消化甲壳类水产品 TM 改变 SGF 的 pH 值(pH 1.2—5.0), 研究

pH 值对过敏蛋白消化稳定性的影响, 结果见图 3。锯缘青蟹 TM 在 pH 3.0—4.0 时, 分解比较快, TM 原条带几乎被完全分解, 在其它 pH 值下其稳定性相似, 但在 pH 5.0 时, 胃蛋白酶的消化能力最差, TM 被分解的最少(图 3A)。

中华绒螯蟹 TM 在 pH 3.5 和 4.5 时被分解的最快, 其余的 pH 值下有少量的分解, 同样在 pH 5.0 时, TM 几乎未被分解(图 3B)。

斑节对虾和南美白对虾 TM 在消化 15min 时几乎未被分解, 但是可以发现在 pH 3.5 时紧挨 TM 蛋白下

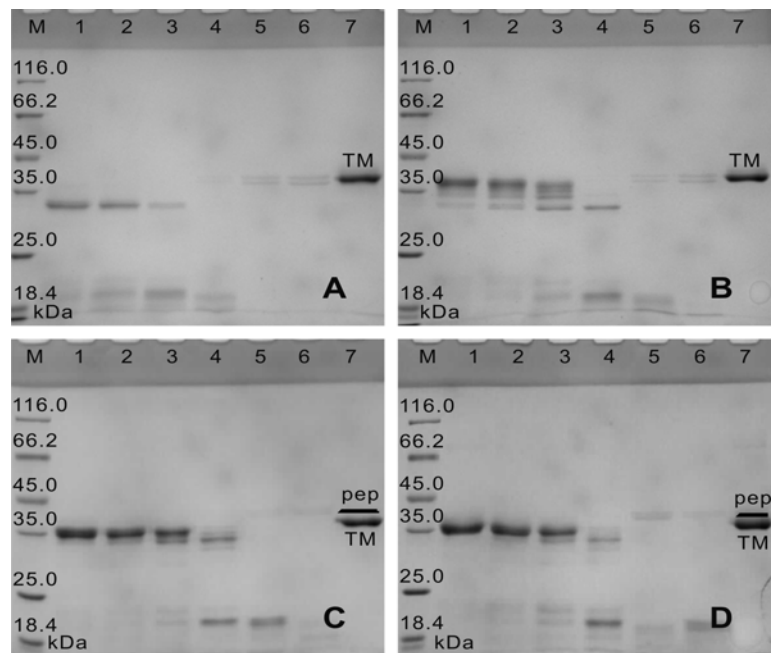


图 1 不同比值的酶/甲壳类 TM 的 SGF 消化

Fig.1 SGF digestion at different ratios of pepsin / crustaceans TM  
M: 蛋白分子量标准; A: 锯缘青蟹; B: 中华绒螯蟹; C: 斑节对虾; D: 南美白对虾。1—6 表示不同的 pepsin/TM 比值, 1 为 1/20; 2 为 1/10; 3 为 1/5; 4 为 1/1; 5 为 5/1; 6 为 10/1; 7 为对照组

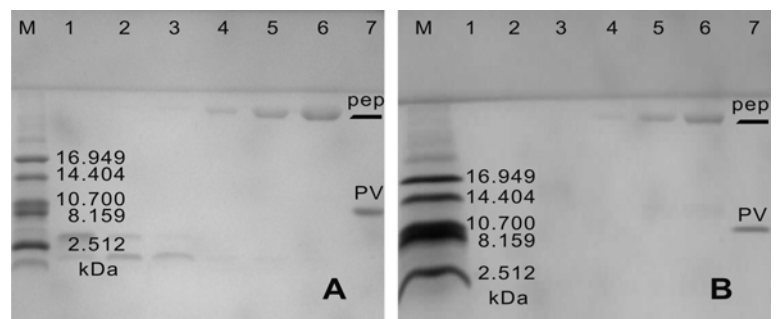


图 2 不同比值的酶/鱼类 PV 的 SGF 消化

Fig.2 SGF digestion at different ratios of pepsin / fish PV  
M: 蛋白分子量标准; A: 鲫鱼; B: 鲢鱼。1—6 表示 pepsin/TM 比值, 1 为 1/20; 2 为 1/10; 3 为 1/5; 4 为 1/1; 5 为 5/1; 6 为 10/1; 7 为对照组

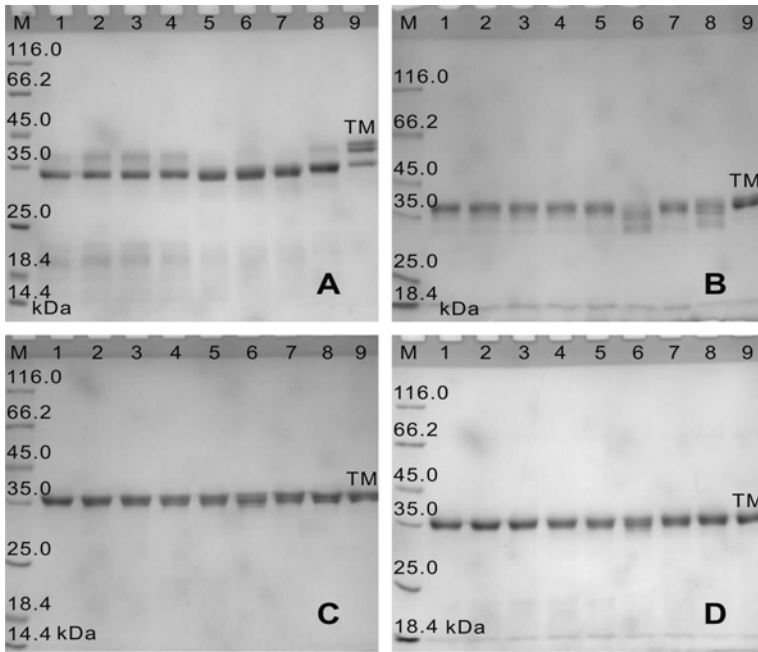


图3 不同pH值下甲壳类TM的SGF消化

Fig.3 SGF digestion of crustacean TM at different pH

M: 蛋白分子量标准; A: 锯缘青蟹; B: 中华绒螯蟹; C: 斑节对虾; D: 南美白对虾。1: pH 1.2; 2: pH 1.5; 3: pH 2.0; 4: pH 2.5; 5: pH 3.0; 6: pH 3.5; 7: pH 4.0; 8: pH 4.5; 9: pH 5.0

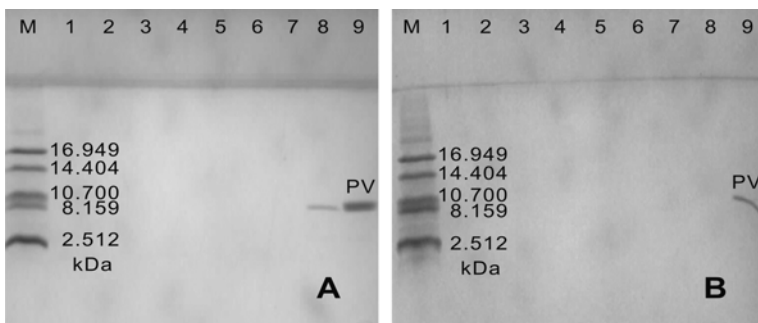


图4 不同pH值下鱼类PV的SGF消化

Fig.4 SGF digestion of fish PV at different pH

M: 蛋白分子量标准; A: 鲫鱼; B: 鲢鱼。1: pH 1.2; 2: pH 1.5; 3: pH 2.0; 4: pH 2.5; 5: pH 3.0; 6: pH 3.5; 7: pH 4.0; 8: pH 4.5; 9: pH 5.0

方有微弱的降解产物(图3C、图3D)。在消化1h后,能明显的观察到在pH 3.5时,胃蛋白酶水解能力最强,其它pH值下, TM也有微量的分解,但是在pH 5.0时,几乎没有被分解(该图片未呈上)。

#### 2.4 不同pH值的SGF消化鱼类PV

鱼类PV的酶解稳定性同样也受到pH值的影响。从图4中可以看到,鲫鱼PV在pH 1.2—4.0时已经被完全分解,在pH 4.5时PV有少量的分解,但未被完全分解,而在pH 5.0时,PV几乎未被分解(图4A)。鲢

鱼PV同样在pH 1.2—4.5时已不能用SDS-PAGE检测到,但是在pH 5.0时,鲢鱼PV同样不能被分解(图4B)。

#### 2.5 过敏患者血清免疫检测SGF消化产物

为了更清楚地了解SGF消化对过敏蛋白致敏性的影响,用甲壳类水产品过敏患者血清对经优化条件后(0.33U酶/ $\mu$ g蛋白,pH 3.5)的SGF消化产物进行免疫印迹试验,检测其产物的IgE结合能力。从图5A中可知,青蟹TM经胃蛋白酶消化后产生的34kDa产物和经胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶处理后产生的37kDa分解产物以及TM完整蛋白能与过敏患者血清IgE抗体结合,而分子量稍小一些的28kDa和22kDa降解产物失去了它的IgE结合能力,可能是其IgE结合位点被破坏,也可能是过敏患者血清的效价比较低,难以检测。中华绒螯蟹TM(图5B)和斑节对虾TM(图5C)同样只有TM条带以及分子量较近的产物能检测到,由于中华绒螯蟹TM经胰凝乳蛋白酶分解的比较严重,所以用血清检测时,蛋白条带比较淡(图5B, Lane 3)。南美白对虾TM经消化酶分解后,除了在36kDa、34kDa处能检测到条带外,在22kDa的蛋白条带也能与患者血清发生IgE结合(图5D),说明其IgE结合位点未被破坏。

### 3 讨论

研究表明,采用不同比值的胃蛋白酶,相同的过敏蛋白对于胃蛋白酶消化既可以呈现出消化稳定性,也可以呈现出消化不稳定性(Fu *et al.*, 2002)。Wickham等(2009)也指出,过敏原的耐消化性取决于消化酶与过敏蛋白的比值。因此,在SGF消化中,当采用不同胃蛋白酶/蛋白比值时,同种蛋白可以表现为对胃蛋白酶稳定,也可表现为不稳定。

从本实验结果来看,甲壳类水产品TM和鱼类PV的消化稳定性都受胃蛋白酶相对含量的影响,提高胃蛋白酶的相对含量,目的蛋白能更快的被分解。但相对比较, TM比PV对胃蛋白酶消化具有更高的稳定性。TM在酶/蛋白比值提高到5/1时,尤其是虾类TM在10/1时,其降解条带仍然未被完全分解,这可能就是为什么甲壳类水产品引起人类过敏排行榜

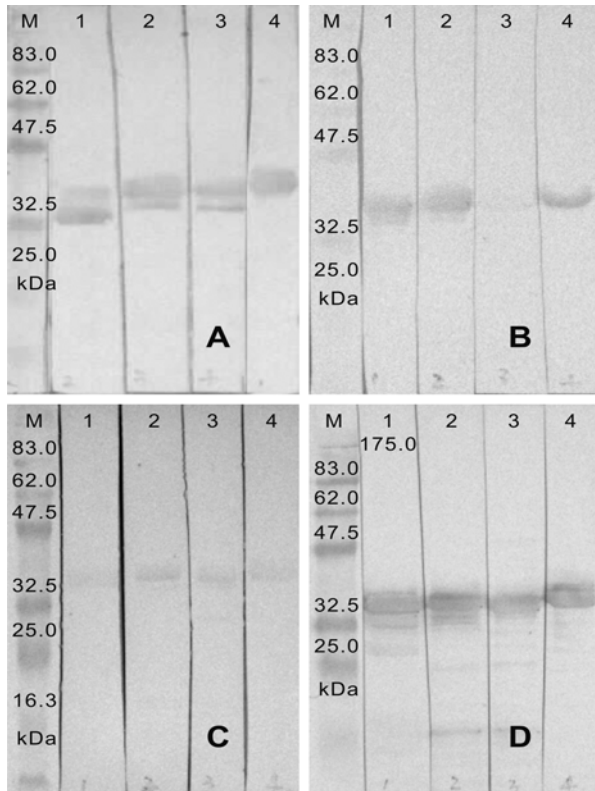


图5 过敏患者血清免疫印迹分析 SGF 消化 TM 产物  
Fig.5 Detection of the products of TM digested by SGF with the serum from crustacean-allergic humans by IgE-Immunoblotting

M: 蛋白分子量标准; A: 锯缘青蟹; B: 中华绒螯蟹; C: 斑节对虾; D: 南美白对虾。1: 胃蛋白酶; 2: 胰蛋白酶; 3: 胰凝乳蛋白酶; 4: 对照组。所有的消化时间均为 60min

上居高的原因, 因为这些稳定的降解产物仍可能引起致敏反应。

pH 值对蛋白消化稳定性的影响, 主要取决于胃蛋白酶在不同 pH 值的酶活。当然, 这也与个人的饮食情况、食物成分都有关系。由于不同人分泌的胃酸的量、成分会有所不同, 因此很有必要研究不同 pH 值对过敏蛋白水解稳定性的影响(Prichard *et al.*, 1985)。

本文研究不同 pH 值对 SGF 消化的影响, 发现在高 pH 值下(pH 5), 胃蛋白酶的水解作用会受到抑制, 过敏蛋白不被分解, 这是因为胃蛋白酶在高 pH 值条件下, 酶活会受到抑制。Untersmayr 等(2005)对鳕鱼的提取液进行不同 pH 值的 SGF 消化试验, 发现其只在 pH 1.25、2.0 和 2.5 时被分解, 在 pH>2.75 时, 含有 PV 的鳕鱼提取液就不能被分解。这与本研究结果稍有不同, 可能是其所用的胃蛋白酶的 pH 作用范围比较窄或其缓冲溶液缓冲能力不同等原因; 相同的是, 在高 pH 值下过敏蛋白几乎不被分解。结果提示,

对于一些不能正常分泌胃酸的人(如新生儿、萎缩性胃炎患者、因长期食用抗溃疡药物的消化不良者), 其胃液 pH 值会偏高, 摄入水产品等食物后, 由于不能充分消化, 完整的过敏蛋白就可能进入肠粘膜经系统吸收, 从而更易引发一般的过敏症状。

选择合适的酶/蛋白比值来适当反映人体正常生理分泌情况是很重要的, 而酶/蛋白比值与消化酶活力有很大的关系, 因此在讨论消化酶对蛋白的消化稳定性时, 需要注明消化酶的比活力, 这样不同实验室的研究之间才具可比性。按照 Moreno(2007)方法推算, 将人体分泌的胃蛋白酶活力换算成商业酶活力, 人体每天分泌的胃蛋白酶与每天摄入的蛋白的比值应为 1 : 7500 (W/W)。而传统上模拟体外消化试验设定的比值要比体内的高很多, 且均以质量比为基础, 而不是以消化酶的酶活力为基础, 这样就可能会偏离实际。本课题组采用本文优化后条件(0.33U 酶/ $\mu$ g 蛋白, pH 3.5), 模拟人体消化酶对蟹类过敏蛋白的分解作用, 达到了较为理想的实验效果(黄园等, 2009)。有关模拟人体消化酶对鱼类过敏原——小清蛋白分解效果的实验研究也在深入研究之中, 将于近期完成。

## 参 考 文 献

- 刘光明, 梁银龙, 苏文金等, 2009. 鲤鱼小清蛋白的纯化及其过敏性鉴定. 食品科学, 30(3): 188—191
- 宋益银, 林 蕾, 苏秀榕等, 2009. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)特异性过敏原的研究. 海洋与湖沼, 40(1): 62—67
- 黄园, 刘光明, 周利巨等, 2009. 蟹类主要过敏原的模拟肠胃液消化及其对过敏性的影响. 中国食品学报, 9(4): 15—22
- 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等编, 1999. 马学军, 舒跃龙译, 2004. 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京: 科学出版社, 378—397
- Aas K, Jepsen J W, 1967. Studies of hypersensitivity to fish: Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod. Int Arch Allergy Appl Immunol, 32(1): 1—20
- Bugajska S A, Grote M, Vangelista L *et al.*, 2000. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. Gut, 46(5): 661—669
- Cao M J, Shao W, Li Y *et al.*, 2004. Identification of a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of silver carp. J Food Biochem, 28: 373—386
- Fu T J, Abbott U R, Hatzos C, 2002. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-A comparative study. J Agr

- Food Chem, 50(24): 7154—7160
- Hamada Y, Tanaka H, Ishizaki S *et al*, 2003. Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. Food Chem Toxicol, 41(8): 1149—1156
- Leung P S, Chen Y C, Gershwin M E *et al*, 1998. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. J Allergy Clin Immunol, 102(5): 847—852
- Liang Y L, Cao M J, Su W J *et al*, 2008. Identification and characterization of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Food Chem, 111(4): 998—1003
- Lindstrøm C D, van Dô T, Hordvik I *et al*, 1996. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Scand J Immunol, 44(4): 335—344
- Lopata A L, Lehrer S B, 2009. New insights into seafood allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 9(3): 270—277
- Moreno F J, 2007. Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. Biomed Pharmacother, 61(1): 50—60
- Prichard P J, Yeomans N D, Mihaly G W *et al*, 1985. Omeprazole: a study of its inhibition of gastric pH and oral pharmacokinetics after morning or evening dosage. Gastroenterology, 88: 64—69
- Thomas K, Aalbers M, Bannon G A *et al*, 2004. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. Regul Toxicol Pharm: RTP, 39(2): 87—98
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. P Natl Acad Sci USA, 76(9): 4350—4354
- Untersmayr E, Poulsen L K, Platzer M H *et al*, 2005. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. J Allergy Clin Immunol, 115(2): 377—382
- US Pharmacopoeia, 1995. The National Formulary. Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid, TS. In: The United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18, The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 1—2053
- Wickham M, Faulks R, Mills C, 2009. *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. Mol Nutr Food Res, 53(8): 952—958

## OPTIMIZATION OF SIMULATED GASTRIC FLUID DIGESTION OF MAJOR ALLERGENS FROM AQUATIC PRODUCTS

LIU Guang-Ming, HUANG Yuan-Yuan, CAI Qiu-Feng, WENG Ling, SU Wen-Jin, CAO Min-Jie  
(College of Biological Engineering, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety in Fujian Province, Jimei University, Xiamen, 361021)

**Abstract** Stability in simulated gastric fluid (SGF) is regarded as an important parameter in estimation of food allergenicity. The digestive conditions of crustacean allergens (tropomyosin, TM), fish allergens (parvalbumin, PV) and nonallergenic proteins from muscles of mud crab (*Scylla serrata*), Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), grass prawn (*Penaeus monodon*), whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*), Crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) and Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in SGF were compared. Porcine pepsin was used to simulate digestive proteinases from human. Stabilities of allergens were studied with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western-blot at different pepsin/protein ratios and pH. It was found that the apparent susceptibility of allergens to proteolysis was dependent on the ratio of pepsin to allergen. TM was of relatively higher stability; even at pepsin/allergen = 10/1, some stable degradation fragments still existed. Under optimized conditions (0.33U pepsin/ $\mu$ g protein, pH 3.5), crustacean allergen TM was relatively resistant to pepsin, but fish allergen PV was rapidly degraded within a short period of time. Further study by Western-blot using sera from crustacean-allergic patients indicated that allergenicity of TM was partially decreased, but the products of TM digested by pepsin still had a little IgE-binding capacity.

**Key words** Aquatic product allergens, Simulated gastric fluid digestion, Tropomyosin, Parvalbumin, SDS-PAGE, Western-blot