

doi:10.12301/spxb202400674

文章编号:2095-6002(2025)01-0063-11

引用格式:刘萌,李颖,龚菲菲,等.煮制加工降低拟穴青蟹基质的免疫结合活性[J].食品科学技术学报,2025,43(1):63-73.

LIU Meng, LI Ying, GONG Feifei, et al. Immune-binding activity of *Scylla paramamosain* matrix reduced by boiling processing[J]. Journal of Food Science and Technology, 2025, 43(1): 63-73.

## 煮制加工降低拟穴青蟹基质的免疫结合活性

刘萌<sup>1,2</sup>, 李颖<sup>1</sup>, 龚菲菲<sup>1</sup>, 刘庆梅<sup>2</sup>, 孙兆敏<sup>1</sup>,  
刘红<sup>2</sup>, 顾懿<sup>2</sup>, 戴雅萱<sup>1</sup>, 陈桂霞<sup>3</sup>, 刘光明<sup>1,2,\*</sup>

(1. 厦门海洋职业技术学院 海洋生物学院/海洋食品营养安全及精深加工福建省高等学校应用工程技术中心/海洋资源保护与生态治理福建省高等学校应用工程技术中心/厦门市智慧渔业重点实验室, 福建 厦门 361100;

2. 集美大学 海洋食品与生物工程学院/福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 厦门大学 附属妇女儿童医院, 福建 厦门 361003)

**摘要:** 致敏原是甲壳类食物过敏的主要原因,加工处理可有效降低致敏原致敏性,但基于食物基质的研究还有待深入。结合模拟胃肠液连续消化和人结肠 Caco-2 细胞模型转运,构建了仿生消化转运体系;基于拟穴青蟹基质,系统性评估了煮制加工后青蟹基质的消化性及消化产物的转运情况;基于抗原抗体的特异性结合,明确了煮制加工对青蟹基质及其消化转运产物免疫结合活性的影响;进一步从结构的角度探究青蟹基质及其消化转运产物免疫结合活性变化的原因。结果表明,煮制加工后青蟹基质的消化率升高,更容易通过 Caco-2 细胞屏障;青蟹基质及仿生消化转运产物的免疫球蛋白 E 结合能力分别降低了 38.85% ± 0.94% 和 14.82% ± 0.24%,耐热性致敏原原肌球蛋白和肌质钙结合蛋白的免疫球蛋白 G 结合能力也显著降低;其主要原因是煮制加工改变了青蟹基质的纤维束排列,提高了其可消化性,降低了青蟹基质的免疫结合能力;基质中蛋白质组分结构的变化,引起了仿生消化转运产物及热稳定性致敏原的免疫结合活性的降低。从食物基质的角度,解析了煮制加工处理对青蟹基质免疫结合活性的影响,完善了加工处理对水产品基质致敏性影响的研究,为低致敏性水产品加工方式的探究及评估奠定了理论基础。

**关键词:** 拟穴青蟹; 食物基质; 煮制加工; 消化转运; 免疫结合活性

**中图分类号:** TS254.1

**文献标志码:** A

甲壳类水产品因其丰富的营养成分和鲜美的口感广受青睐。2023年,我国甲壳类水产品养殖量高

达 738 万余 t,同比增长 7.81%;捕捞量超过 202 万 t,同比增长 0.82%<sup>[1]</sup>,表明甲壳类水产品及其制品已

收稿日期:2024-10-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32202179,32072336);福建省教育厅中青年教育科研项目(JAT231231);福建省海洋功能食品工程技术研究中心开放基金资助课题(2024MFF02004);厦门市智慧渔业重点实验室开放课题(XMKLIF-OP-202407);厦门海洋职业技术学院高层次人才科研专项(KYG202108,KYG202207)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China (32202179, 32072336); Young and Middle-Aged Teachers' Education Research Project of Fujian Province (JAT231231); Open Funding Project by Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food (2024MFF02004); Open Funding Project by Xiamen Key Laboratory of Intelligent Fishery (XMKLIF-OP-202407); Special Scientific Research Project for High-Level Talents in Xiamen Ocean Vocational College (KYG202108, KYG202207).

第一作者:刘萌,女,副教授,博士,主要从事水产品加工与质量安全控制方面的研究。

\*通信作者:刘光明,男,教授,博士,主要从事食品加工及安全应用方面的研究。

经逐渐成为国人餐桌不可缺少的一部分。然而,随着甲壳类食品消费的增加,由此引发的食物过敏发生率也日益攀升。在世界范围内,甲壳类水产品的过敏发生率为 10.30%<sup>[2]</sup>;食物过敏已逐渐成为世界范围内的食品安全问题之一<sup>[3]</sup>。不同于其他食物过敏,由摄入甲壳类水产品引发的过敏通常会伴随人的一生,严重影响患者的生活质量<sup>[4]</sup>。甲壳类水产品致敏原与其他无脊椎动物之间的交叉反应<sup>[5]</sup>、包装食品标签致敏性信息不够完善以及生产过程中不同致敏原间的交叉接触<sup>[6]</sup>,这些因素共同导致甲壳类过敏患者对严格避食相关过敏食品及其制品的医嘱执行力不足。长期避食相关食品、交叉食品及其制品,极易引发膳食营养不平衡等问题;此外,常见的食物过敏治疗药物存在较大副作用,进一步增加了甲壳类食物过敏的预防及治疗难度<sup>[7-8]</sup>。研究表明,摄入低致敏性食品能够引发机体的免疫耐受,有助于降低乃至消除机体在误食易过敏食物后出现的致敏风险<sup>[9]</sup>。同时,加工处理在一定程度上能够降低虾蟹等水产品致敏原的致敏性<sup>[10-11]</sup>,因此,开展低致敏性加工食品的研究,有望为甲壳类食品过敏患者提供更为多样化的选择,对于甲壳类水产品加工行业的持续发展也具有重要意义。

研究表明,我国上海地区的虾蟹等甲壳类水产品过敏的发生率为 19.92%<sup>[12]</sup>。拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*),俗名菜鲟,简称青蟹,是福建地区重要的水产特色经济物种。青蟹中的致敏原组分包括原肌球蛋白(tropomyosin, TM)、精氨酸激酶、肌球蛋白轻链、肌质钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium binding protein, SCP)和细丝蛋白c等。当前研究多集中在青蟹特定致敏原的识别及致敏机理解析和加工处理对特定致敏原致敏性的消减等<sup>[3,11]</sup>。致敏原是机体过敏反应的主要原因,常见的食物致敏原多为蛋白质,目前已有超过 125 个物种的 370 种食物致敏原被报道并系统研究<sup>[13]</sup>。食物致敏原的结构和抗原表位是其致敏性的主要决定因素<sup>[14]</sup>。目前,国内外学者多聚焦于在特定致敏原致敏性的研究,忽视了食物基质中组分之间的复杂关系。食物基质是指构成食物的所有组分,包括碳水化合物、蛋白质和脂类等<sup>[15]</sup>。实际情况下,包括过敏原在内的食物基质组分在加工处理中,可发生组分内或组分间的相互作用<sup>[16-17]</sup>,而这种作用进一步影响致敏原的空间结构及抗原表位,如空间结构的伸展或破坏、抗原表位的聚集或暴露等,从而改变食物基质中致敏原的致

敏性<sup>[18-19]</sup>。此外,致敏原在消化过程中的稳定性也被认为是影响其致敏性的重要因素<sup>[20]</sup>。食物进入机体后,基质中的蛋白质会在胃肠道中被胃酸或消化酶水解为小分子蛋白或多肽<sup>[21]</sup>,引起致敏原结构或抗原表位的变化,进一步影响其致敏性。水产品致敏性的影响因素众多,当前针对青蟹基质致敏性的相关研究仍显不足,不利于低致敏性青蟹加工产品的研发及其在工业化中的应用。

常见的水产品加工方式主要有煮制、蒸制、盐焗等。本研究选择煮制这种家庭常用的青蟹加工处理方式,将模拟胃肠液连续消化与基于人结肠腺癌细胞系(Caco-2)的细胞模型转运有机整合,构建了仿生消化转运评估体系;以拟穴青蟹为研究对象,基于食物基质,系统性评估煮制加工后青蟹基质的消化及在 Caco-2 细胞模型中的转运情况;进一步利用多克隆抗体和青蟹过敏志愿者血清,检测煮制加工后青蟹基质及其消化转运产物的免疫结合能力变化,并结合转运效果评估等解析青蟹基质及其消化产物免疫结合活性变化的原因。希望本研究可有助于阐释过敏性食物基质的致敏性,为低致敏性水产品加工方式的评估及工业化应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活青蟹(*S. paramamosain*)购自厦门市集美区新华都超市,冰上运送至实验室,流动水清洗干净后立即用于实验。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G 抗体,上海 Abmart 公司;HRP 标记的羊抗人 IgE 抗体、胃蛋白酶( $\geq 250$  U/mg)、胰蛋白酶(1 500 U/mg)、胰凝乳蛋白酶(40 U/mg),美国 Sigma 公司;兔抗青蟹 TM 多克隆抗体和兔抗青蟹 SCP 多克隆抗体来自本课题组<sup>[22]</sup>;DMEM 培养基,美国 Hyclone 公司;所有实验用有机溶剂均为国产分析纯。

实验用青蟹过敏患者血清的收集及使用,全程接受厦门大学附属妇女儿童医院伦理委员会的监督,伦理审批号为 KY-2018-018 和 KY-2019-014;过敏患者症状及 sIgE 的相关信息见文献<sup>[23]</sup>。

### 1.2 仪器与设备

Phenom ProG6 型台式扫描电子显微镜,荷兰 Phenom-World BV 有限公司;PT-2100 型组织捣碎

机,瑞士 Kinematica 公司;Fluor Chem Q 型凝胶成像及化学发光成像仪,美国 Alpha 公司;Nano-ZS 型激光散射粒度仪,英国 Malvern 公司;ND-100 型超微量紫外分光光度计,德国 NanoDrop 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 青蟹的煮制加工

参考文献[24]方法,将清洗干净的鲜活青蟹浸没于 10 倍质量的蒸馏水中,100 °C 煮制 15 min。

#### 1.3.2 微观结构的观察

以生鲜蟹为对照,经煮制加工后的青蟹去壳去膜,顺着纤维组织取 2~3 mm<sup>3</sup> 大小的肌肉组织,每组在同一位置取 3~5 个大小相近的组织备用。取出的肌肉组织参考文献方法<sup>[25]</sup>完成组织固定、洗涤、脱水、干燥等程序,以双面胶黏附于电子扫描显微镜(scanning electron microscope, SEM)载物台上,在进行离子溅射喷金处理后,于不同放大倍数的电镜下进行观察并拍照记录。

#### 1.3.3 青蟹基质的制备

煮制后的青蟹捞出,去壳取肉,于 10 倍质量的含 0.3 mol/L NaCl 的 pH 值为 8.0 的冰磷酸缓冲液中均质 5 min,制得青蟹基质;同时收集煮制青蟹后的汤汁,4 °C 保存待分析。

#### 1.3.4 青蟹基质仿生消化产物的制备

参考文献[23]方法,青蟹基质先后经模拟胃液和模拟肠液连续消化。胃液消化前需将青蟹基质用模拟胃液调整 pH 值至 2.0,随后等体积分装,于 37 °C 预热 10 min 后各管同时添加等质量胃蛋白酶(酶和底物质量比为 1:50),在不同时间点用 NaHCO<sub>3</sub> 调节 pH 值为 7.4 以终止胃消化,终止消化的样品记为胃液消化产物,4 °C 保存待分析。模拟肠液连续消化是将胃液消化 60 min 的产物加入胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶(酶和底物质量比为 1:200),37 °C 进行继续消化,采用常见终止方法<sup>[23]</sup>(在沸水浴中加热 10 min)终止肠液连续消化,不同时间下终止消化的样品记为胃肠液连续消化产物,于 4 °C 保存待分析。

参考文献[26]方法,消化产物与含有考马斯亮蓝的上样缓冲液混合,进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。随后利用 Western blotting 对消化产物中致敏原进行免疫结合活性分析,主要检测流程与文献方法<sup>[26]</sup>一致,其中兔抗青蟹 TM 多克隆抗体工作稀释度为 1:10<sup>6</sup>,室温

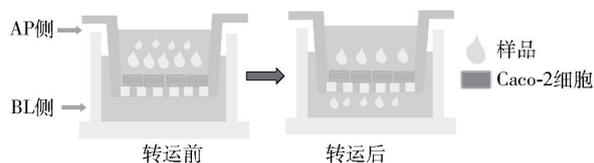
孵育 50 min;兔抗青蟹 SCP 多克隆抗体工作稀释度为 1:(2×10<sup>5</sup>),室温孵育 50 min;羊抗兔 IgG 抗体工作稀释度为 1:(2×10<sup>5</sup>),室温孵育 50 min。

参考文献[27]方法,不同消化相消化前后样品的质量之比即为消化率,计算仿生消化过程中的消化率。

参考文献[27]方法,取不同时间的胃肠液消化产物,室温下采用激光散射粒度仪对仿生消化过程的基质粒径进行检测,重复 3 次,收集其粒度分布数据、绘制粒径分布曲线。采用 Malvern Mastersizer 软件对数据进行可视化处理,并计算平均粒径。

#### 1.3.5 青蟹基质仿生消化产物的转运处理

参考文献方法<sup>[28]</sup>,培养并构建 Caco-2 细胞转运模型;参考文献方法<sup>[29]</sup>,取模拟胃肠液连续消化产物 0.5 mL 加入建模成功后的 Caco-2 细胞转运小室内侧(apical side, AP),外侧(basolateral side, BL)加入 1.5 mL 缓冲液,37 °C 培养箱中转运 2 h(见图 1)。转运结束后分别收取 AP 和 BL 侧样品,于 -80 °C 保存待分析。



AP 为转运小室内侧;BL 为转运小室外侧。

图 1 Caco-2 细胞模型转运示意

Fig. 1 Schematic of transportation in Caco-2 cell model

#### 1.3.6 免疫结合活性的测定

采用 Dot blotting 的方法分别检测消化转运产物的 IgG 和 IgE 结合能力<sup>[26]</sup>,IgG 结合活性分析分别采用 TM 和 SCP 的多克隆抗体作为一抗,羊抗兔 IgG 抗体作为二抗,工作液稀释度与 1.3.4 节一致。IgE 结合活性分析采用 5 名青蟹过敏志愿者混合血清池作为一抗,各份血清按同样体积进行混合、不稀释,4 °C 孵育过夜;羊抗人 IgE 二抗工作液稀释度为 1:(2×10<sup>5</sup>),室温孵育 50 min。采用 Image J 软件对显色结果进行均一量化处理。

#### 1.3.7 Caco-2 细胞转运程度的测定

以紫外光谱分析青蟹基质消化产物 Caco-2 细胞模型转运前后的吸光度值,表征青蟹基质消化产物经肠道细胞转运的效率。以无样品的缓冲液调零,扫描波长范围为 200~300 nm,扫描宽度为 1 nm。室温下取 2 μL 青蟹基质及其消化转运产物检测吸收曲线,每个样品平行测定 3 次。

## 1.4 数据处理

每个实验重复3次以上,所有结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。方差分析使用 GraphPad Prism 8 软件, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 青蟹肌肉微观结构分析

青蟹肌肉(生鲜和煮制)微观结构见图2。由图2可知,生鲜青蟹肌肉呈现致密紧实的结构,高倍镜下纤维分布较为明显。经煮制加工后的青蟹肌肉呈现出明显的断层现象,高倍镜下孔隙更明显,表明其结构发生了较为显著的改变。疏松的肌肉结构有助于消化酶与蛋白质的接触<sup>[24]</sup>,煮制加工后孔隙更大、结构更疏松的青蟹可能更容易消化。

### 2.2 青蟹基质的仿生消化结果

消化稳定性是致敏原维持其致敏性的前提,具有抗蛋白酶水解和耐酸水解特性的食物蛋白在哺乳动物胃肠道中保持结构完整的时间越长,触发机体对这种食物产生免疫反应的可能性就越大。欧洲食品安全局在评估食品和饲料蛋白致敏性的指导意见中,特别提及了对消化性的评估<sup>[19,30]</sup>。为衡量蛋白质的消化性,国内外学者多采用胃蛋白酶和胰蛋白酶分别对蛋白质进行模拟胃液消化和模拟肠液消化<sup>[31]</sup>;但也有学者认为肠道中存在多种消化酶,且

机体胃肠道的消化进程是连续不间断的<sup>[23]</sup>,不同消化酶通过水解特定的氨基酸以降解大分子蛋白<sup>[32]</sup>,如胰蛋白酶的水解位点主要为精氨酸和赖氨酸,因此研究采用模拟胃肠液连续消化的形式,结合胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶评估煮制加工对青蟹基质消化特性的影响,结果见图3。

图3结果表明,在煮蟹的汤汁中检测到40 kDa、20 kDa左右的蛋白,表明经煮制加工的青蟹基质有部分蛋白或致敏原分散至汤汁中,由此推测可能会导致青蟹基质中的致敏原丰度降低。在图3(a1)胃液消化中,40、20、18 kDa的蛋白均稳定存在,而在消化后期50、30、15 kDa蛋白出现明显的弥散状态,其他大分子蛋白也逐渐消失。在胃肠液连续消化时,基质蛋白条带出现明显的弥散现象;当连续消化达到60 min时,大分子量的条带消失,剩余的基质蛋白条带集中在10~20 kDa。

青蟹肌原纤维蛋白中的TM和肌浆蛋白中的SCP的热稳定性较好,同时也是青蟹中的重要致敏原<sup>[25]</sup>,可作为评估热加工处理对青蟹免疫结合活性影响的靶向致敏原。Western blotting结果显示,煮蟹的汤汁可以与TM和SCP的多克隆抗体发生阳性结合,表明煮蟹的汤汁中含有TM和SCP,这与电泳结果的推测一致,说明煮制加工确实引起了食物基质中致敏原含量的降低。在胃液消化阶

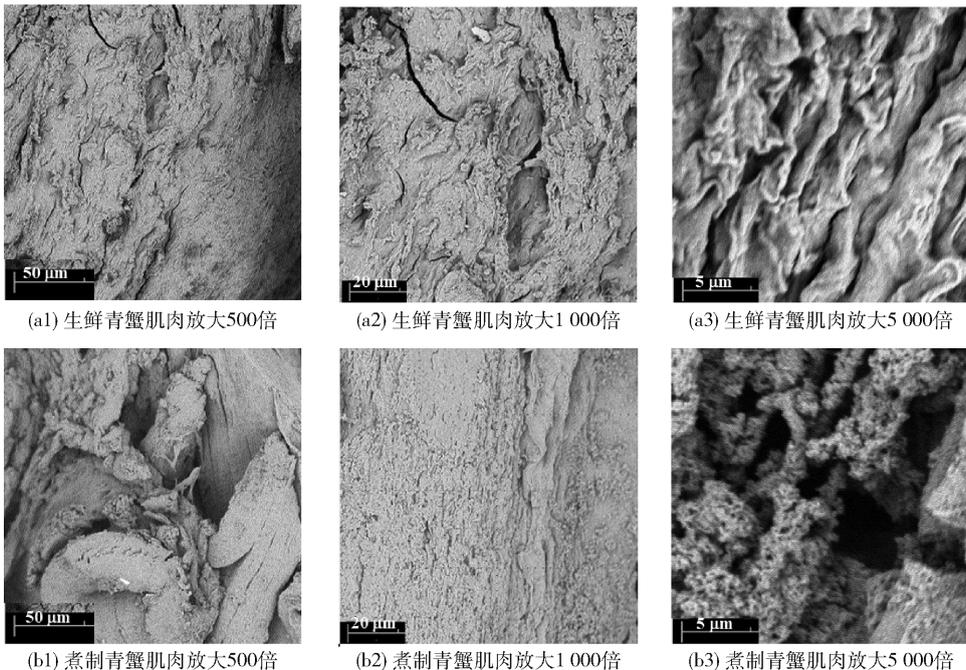
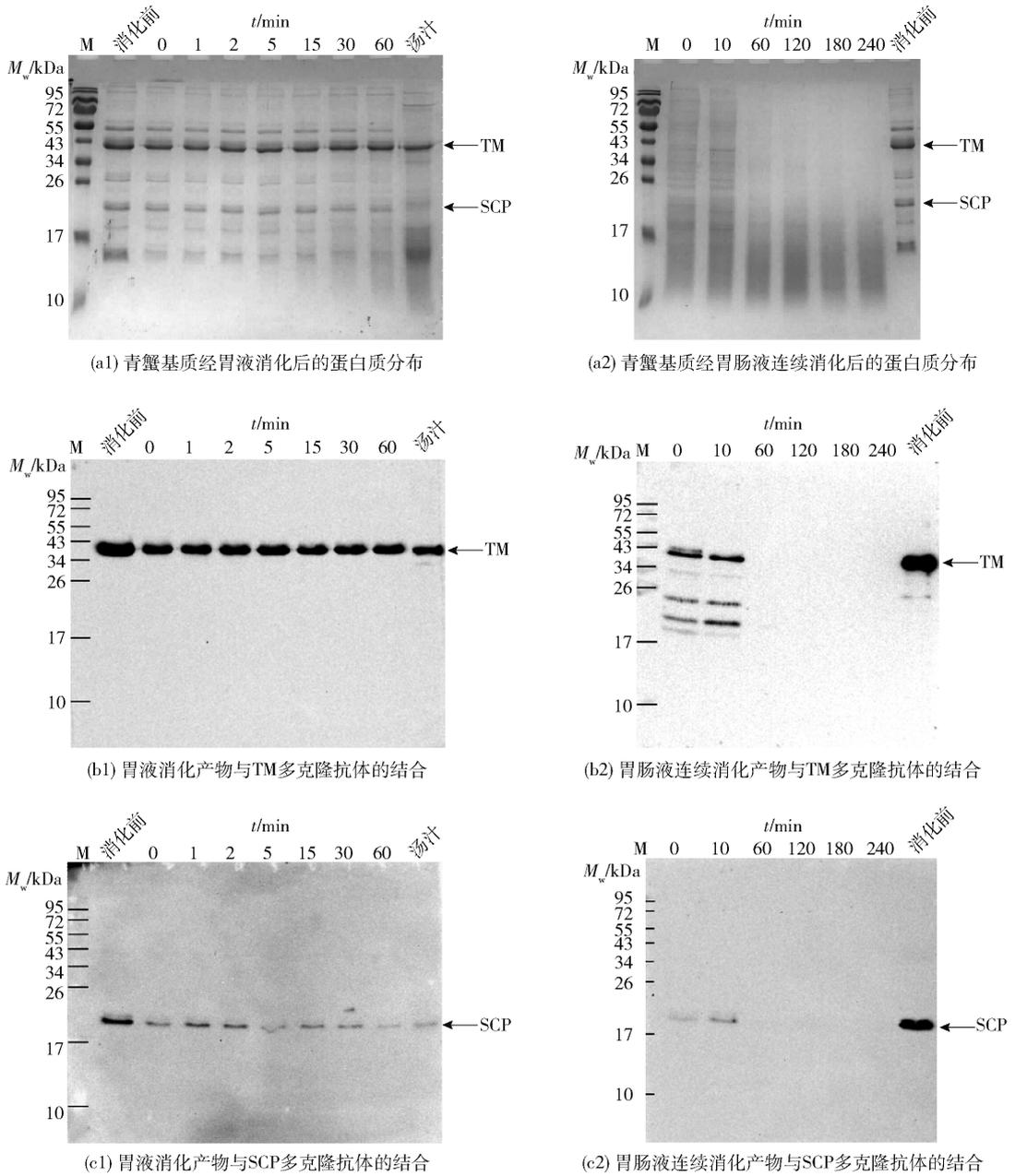


图2 青蟹肌肉的微观结构

Fig. 2 Microstructure diagram of crab muscle



M 为标准分子量 marker; 消化前为青蟹基质蛋白; 汤汁为煮蟹汤汁; 其余泳道表示加热不同时间的青蟹基质蛋白。TM 为原肌球蛋白; SCP 为肌质钙结合蛋白。

图 3 煮制加工青蟹基质的胃肠液连续消化结果

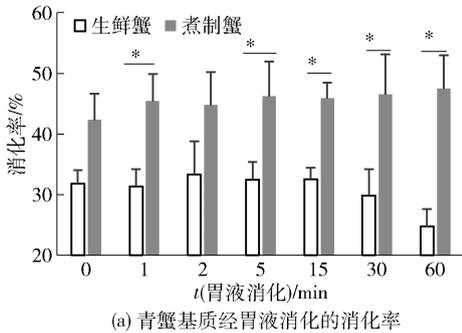
Fig. 3 Results of continuous gastrointestinal phase digestion of boiled crab matrix

段, TM 始终稳定存在; 在胃肠液连续消化中, TM 主条带降解, 在 20 ~ 40 kDa 内出现小分子量的 TM 降解条带。在图 3 (c1) 胃液消化中, SCP 的主条带稳定存在; 但随着消化时间的延长, SCP 主条带变浅, 表明 SCP 逐渐被胃蛋白酶降解。肠液连续消化中, SCP 的多克隆抗体在 60 min 及之后并未检测到任何阳性蛋白条带, 表明 SCP 不耐肠道消化。Hu 等<sup>[33]</sup>发现纯化的 SCP 在 15 min 时即可被胃蛋

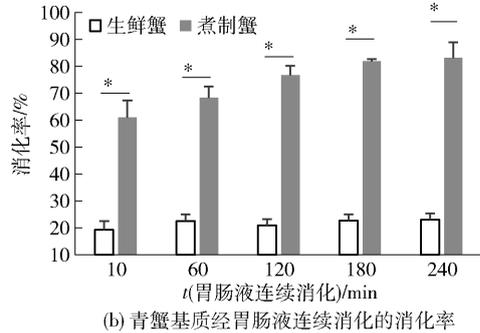
白酶彻底降解, 但研究结果表明煮制青蟹基质中的 SCP 可耐受胃蛋白酶消化、但不耐受肠道蛋白酶消化, 造成这种差异可能有以下 2 点: 1) SCP 的存在状态不同。本研究基于青蟹基质, 基质组分之间的相互作用(例如脂质等)对致敏原具有一定的保护作用<sup>[34]</sup>, 改变了消化酶与致敏原的接触情况。2) 热处理改变了致敏原的空间结构, 进而影响其消化性<sup>[35-36]</sup>。因此, 研究中煮制加工后的青

蟹基质致敏原呈现出与纯化致敏原不同的消化特性,这与文献报道一致<sup>[29]</sup>。此外,在消化过程中, TM 的免疫印迹反应强度显著高于 SCP,其主要原因可能是不同致敏原在食物基质中的含量存在差异, TM 作为主要致敏原,在青蟹中含量显著高于次要致敏原 SCP<sup>[23]</sup>。

青蟹基质的成分复杂,虽然 SDS-PAGE 可分析可溶性蛋白的消化情况,但不溶性蛋白和脂质等其他组分的消化性评估也不容忽视。因此,研究以生鲜青蟹的消化情况为对照,结合消化率等分析,全面



探究煮制青蟹基质的消化情况,结果见图4。图4结果表明,在相同的消化时长下,煮制加工后的青蟹基质消化率均显著高于生鲜青蟹基质的消化率,其主要原因可能是:1)热处理破坏了基质空间结构,隐藏在蛋白质构象结构中的消化酶酶切位点暴露出来,进而增加了基质蛋白与消化酶之间的接触<sup>[24,37]</sup>,促进消化率的提升。2)经煮制加工后,青蟹中部分蛋白质分散至汤汁中,降低了青蟹基质中的蛋白质丰度,虽然煮制加工的青蟹基质消化总量降低,但消化率呈现升高趋势。



\*表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 青蟹基质的消化率

Fig. 4 Digestibility of crab matrix

随后,采用激光散射粒度仪对消化产物的粒径进行分析,结果见图5。相较于生鲜青蟹基质的平均粒径 $[(758.5 \pm 20.9) \text{ nm}]$ <sup>[29]</sup>,煮制加工的青蟹基质平均粒径显著降低 $[(256.7 \pm 7.6) \text{ nm}]$ ,表明煮制加工破坏了青蟹基质的结构,引起大分子组分的降解。随着消化时间的延长,青蟹基质消化液中粒径谱峰呈现明显的左移趋势,表明消化产物中尺寸较大的粒子在逐渐减少,小尺寸的粒子则逐渐富集。这一结果与消化产物的 SDS-PAGE 轮廓图一致,进一步说明了在基质组分中,不仅大分子量蛋白可以被消化酶降解,其他较大体积的食物基质组分同样也会被降解。

### 2.3 基质消化产物的转运及免疫结合能力分析

致敏原中某些耐消化的肽段被空肠吸收后,仍然具有引起机体致敏的能力<sup>[38]</sup>,因此探究基质消化产物在肠道的吸收非常重要。Caco-2 细胞因具有与人小肠上皮细胞相似的结构和生化特点,常被用来研究生物活性物质在肠道的跨膜转运,以评估活性物质被肠道吸收的情况<sup>[39]</sup>。研究利用 Caco-2 细胞建立肠上皮屏障模型,以评估消化产物中肽段等小分子在肠道的吸收转运。在连续培养第 22 d 时, Caco-2 细胞形成了类似肠上皮细胞的紧密单层膜,

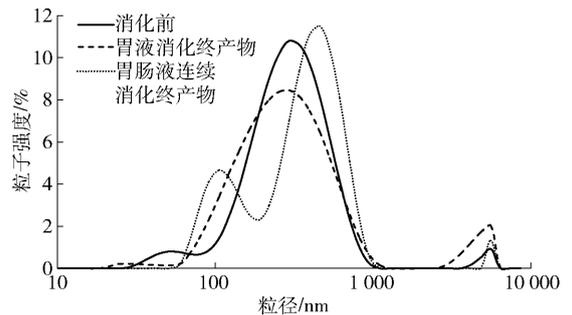


图5 煮制加工青蟹基质消化产物的粒径分析

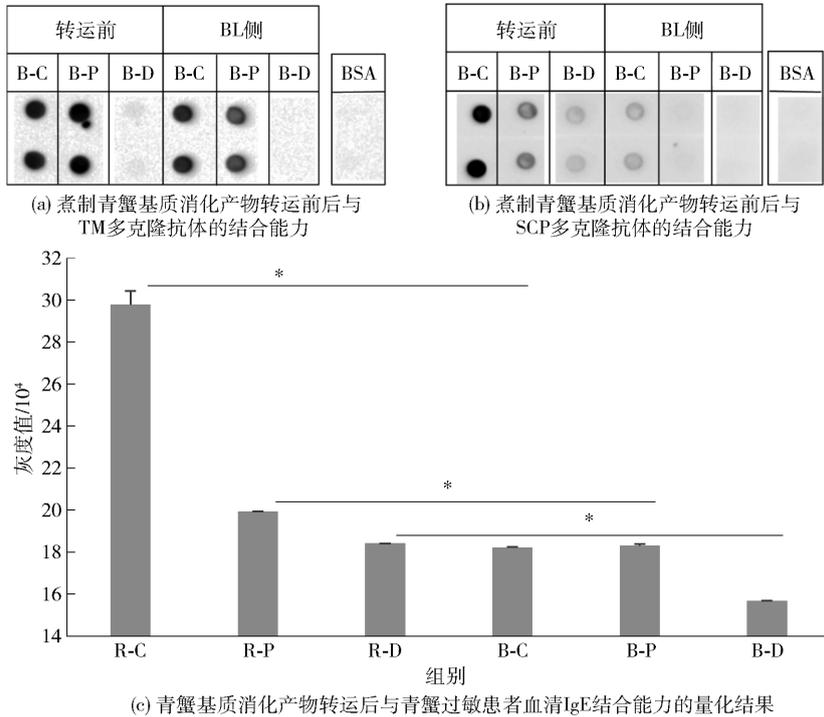
Fig. 5 Particle size of boiled crab matrix after continuous gastrointestinal phase digestion

此时细胞之间形成了具有紧密连接和较高电阻的极化单层,表明转运模型已经可用于样品透皮吸收转运。因此,采用培养第 22 d 的 Caco-2 细胞模型进行消化产物的转运,转运后分别收集 AP 侧和 BL 侧样品,分析其免疫结合活性,结果见图6。

煮制加工青蟹的消化转运产物中, TM 和 SCP 的 IgG 结合活性明显降低。相对于 TM, SCP 阳性检出强度更弱,推测主要原因是:1) SCP 分子量较小且具有复杂的空间结构,即使在同样的蛋白稳定性及消化条件下,断裂出来的肽段更小且更不完整,降低了被抗体识别的概率。2) SCP 的消化

稳定性不如 TM, 这与图 2 的结果一致, 研究表明 TM 确实具有较好的耐消化特性<sup>[25]</sup>。此外, 经转运后的各组样品均保留了与青蟹过敏患者血清中特异性 IgE 结合的能力, 这与文献报道一致<sup>[38]</sup>。消化前后的样品中部分组分可经肠上皮黏膜直接吸收转运, 或被细胞分泌的水解酶降解后进入机体免疫系统, 且保留明显的 IgE 结合能力。其主要原因可能是产物中存在耐消化的肽段, 这些肽段保留了致敏原的 IgE 结合位点<sup>[23]</sup>。煮制加工后青蟹基质的 IgE 结合能力降低了 38.85% ± 0.94%, 连

续消化终产物转运后的 IgE 结合能力降低了 14.82% ± 0.24%, 表明煮制加工处理可显著降低青蟹基质及其消化产物的 IgE 结合活性。IgE 和 IgG 结合活性降低的主要原因包括: 1) 致敏原在热加工过程中分散至汤汁中, 引起基质中致敏原丰度降低, 这与图 2 结果吻合。2) 在胃肠道的连续消化及 Caco-2 细胞分泌的肠上皮刷状缘酶的水解转运中, 完整的蛋白空间结构被破坏, 大分子蛋白被降解成分子量大小不同的肽段, 进而导致 IgG 和 IgE 结合表位被破坏, 无法被抗体识别<sup>[11]</sup>。



(c) 青蟹基质消化产物转运后与青蟹过敏患者血清 IgE 结合能力的量化结果

B-C 为煮制青蟹基质消化前样品, B-P 为煮制青蟹基质的胃液消化产物, B-D 为煮制青蟹基质的胃肠道连续消化终产物, BSA 为牛血清白蛋白对照组, R-C 为生鲜青蟹基质消化前样品, R-P 为生鲜青蟹基质的胃液消化产物, R-D 为生鲜青蟹基质的胃肠道连续消化终产物, \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 6 青蟹基质及其消化产物转运前后的免疫结合能力

Fig. 6 Immune-binding activity of crab matrix and digested samples before and after transportation

## 2.4 青蟹基质消化转运产物的效率分析

青蟹中的致敏原均为蛋白质, 蛋白质中色氨酸等发色氨基酸的存在使得其在特定波长下有明显的光吸收特性, 蛋白质构象的改变可以反映在其紫外吸收光谱上<sup>[40]</sup>, 蛋白质吸收峰的改变主要体现在其二级结构和三级结构的改变<sup>[41-42]</sup>, 因此, 研究进一步采用紫外全波长扫描的方法来评估消化产物的转运效率及基质结构变化。图 7 是青蟹基质及消化产物转运前后的紫外全波长扫描结果。

图 7(a) 中煮制加工青蟹基质的谱峰出现明显蓝移, 这与文献报道一致<sup>[23]</sup>, 表明煮制加工改变了

青蟹基质蛋白质组分结构, 其主要原因可能是加工促进了食物基质中组分之间的相互作用<sup>[43]</sup>, 改变了基质中蛋白质组分的结构, 增加了与消化酶的接触, 进而引起青蟹基质消化率的升高。随着消化时间的延长, 图 7(b) 中煮制青蟹经胃液消化后吸收峰出现了明显蓝移, 经胃肠道连续消化后的吸收峰变化不显著; 经 Caco-2 细胞转运后, Caco-2 细胞分泌的刷状缘酶与基质蛋白组分接触, 引起了不同阶段的消化产物出现了不同程度的蓝移, 进一步改变了基质蛋白组分的空间结构。

煮制加工引起青蟹基质在微观结构上孔隙增多

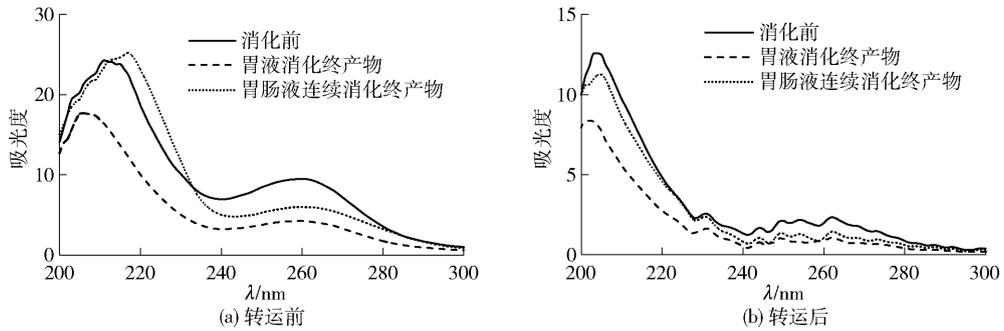


图7 青蟹基质及其消化产物转运前后的紫外全波长扫描

Fig. 7 UV absorbance scanning of crab matrix and digested samples before and after transportation

且基质蛋白的紫外吸收峰蓝移,表明煮制加工可影响青蟹基质的空间结构。此外,空间结构的变化也可能引起蛋白质伸展等结构的破坏,这有助于消化酶与基质中蛋白质组分的接触,从而提升其消化率,同时减少 IgE 和 IgG 抗体与抗原特异性位点的结合、降低其免疫结合活性。与此同时,煮制加工后的汤汁中存在的致敏原及其他蛋白,降低了青蟹肌肉中致敏原的丰度,这有助于进一步降低青蟹基质及其消化转运产物的免疫结合活性。

### 3 结论

结合模拟胃肠液连续消化和 Caco-2 细胞模型转运,构建了仿生消化转运体系;以拟穴青蟹为研究对象,基于食物基质,系统性评估了煮制加工后青蟹基质消化转运情况。煮制青蟹消化率显著升高,青蟹基质的 IgE 结合能力降低了  $38.85\% \pm 0.94\%$ , 经仿生消化转运后产物的 IgE 结合能力降低了  $14.82\% \pm 0.24\%$ , 基质中热稳定性致敏原 TM 和 SCP 也呈现出较低的 IgG 结合活性。主要原因是煮制加工改变了青蟹基质结构和蛋白质组分的空间构象,增加了青蟹基质的可消化性,同时降低其免疫结合活性。本研究基于食物基质,结合免疫结合活性的分析,构建了仿生消化转运评估体系,旨在为水产品低致敏性加工方式的评估奠定基础,也希望为海洋食品加工方式的工业化应用提供理论依据,并有助于水产品加工行业持续健康发展。后续可在此基础上,着重关注低致敏性加工方式对水产品食用品质等的影响,以完善低致敏性水产品加工方式的全面评估。

#### 参考文献:

[1] 农业农村部渔业渔政管理局. 2024 中国渔业统计年

鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 37.

Ministry of Agriculture and Rural Fisheries Administration. 2024 China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 37.

[2] MOONESINGHE H, MACKENZIE H, VENTER C, et al. Prevalence of fish and shellfish allergy: a systematic review[J]. *Annals of Allergy, Asthma Immunology*, 2016, 117(3): 264–272.

[3] 李振兴, 赵金龙. 甲壳类水产品过敏原及其致敏性消减技术研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(3): 21–33.

LI Z X, ZHAO J L. Research progress in crustacean allergens and their mitigation technologies [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(3): 21–33.

[4] 刘萌, 姚有容, 张建华, 等. 美拉德反应影响甲壳类水产品致敏原致敏性的研究进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(7): 10–18.

LIU M, YAO Y R, ZHANG J H, et al. Recent advances in understanding the influence of Maillard reaction on the allergenicity of crustacean allergens in aquatic products [J]. *Food Science*, 2024, 45(7): 10–18.

[5] LAURA D M, FEDERICA M, MASSIMO L, et al. Allergenicity assessment of the edible cricket *acheta domestica* in terms of thermal and gastrointestinal processing and IgE cross-reactivity with shrimp [J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129878.

[6] ZHAO J L, TIMIRA V, AHMED I, et al. Crustacean shellfish allergens: influence of food processing and their detection strategies [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(12): 3794–3822.

[7] JEFFERSON A A, DAVIDSON L, SCURLOCK A M, et al. Food insecurity and health inequities in food allergy [J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2024, 24(4): 155–160.

[8] BARTHA I, ALMULHEM N, SANTOS A. F. Feast for thought: a comprehensive review of food allergy 2021–2023 [J]. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 2024, 153(3): 576–594.

- [9] WAI C Y Y, LEUNG N Y H, LEUNG P S C, et al. Immunotherapy of food allergy: a comprehensive review[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2019, 57(1): 55–73.
- [10] LIU K X, LIN S Y, LIU Y, et al. Mechanism of the reduced allergenicity of shrimp (*Macrobrachium nipponense*) by combined thermal/pressure processing: insight into variations in protein structure, gastrointestinal digestion and immunodominant linear epitopes[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134829.
- [11] 刘光明, 刘庆梅, 杨阳, 等. 蟹类水产品过敏原及其致敏性消减技术研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 25–34.
- LIU G M, LIU Q M, YANG Y, et al. Research progress in crab allergens and their mitigation technologies [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(4): 25–34.
- [12] ZHENG C J, ZOU Y. Allergen sensitization in patients with skin diseases in Shanghai, China [J]. *Journal of Asthma and Allergy*, 2023, 16: 305–313.
- [13] RADAUER C, NANDY A, FERREIRA F, et al. Update of the WHO/IUIS allergen nomenclature database based on analysis of allergen sequences [J]. *Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2014, 69(4): 413–419.
- [14] CHIZOBA E F G, CHENG J H, SUN D W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: a review of recent research advances [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74: 12–25.
- [15] NOWAK-WEGRZYN A, FIOCCHI A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity [J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2009, 9(3): 234–237.
- [16] CASTAN L, BØGH K L, MARYNIAK N Z, et al. Overview of *in vivo* and *ex vivo* endpoints in murine food allergy models: suitable for evaluation of the sensitizing capacity of novel proteins? [J]. *Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2020, 75(2): 289–301.
- [17] TONG P, XIONG L J, GAO J Y, et al. Influence of heat treatment and egg matrix on the physicochemical and allergenic properties of egg custard [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 789–799.
- [18] LIU M, HAN T J, HUAN F, et al. Effects of thermal processing on the allergenicity, structure, and critical epitope amino acids of crab tropomyosin [J]. *Food & Function*, 2021, 12(5): 2032–2043.
- [19] BØGH K L, MADSEN C B. Food allergens: is there a correlation between stability to digestion and allergenicity? [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(9): 1545–1567.
- [20] 李东晓. 酶促糖基化反应影响翡翠贻贝基质中原肌球蛋白致敏性的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2024.
- LI D X. Study on the effect of enzymatic glycosylation on the sensitization of tropomyosin in the matrix of *Mytilus viridis* [D]. Xiamen: Jimei University, 2024.
- [21] ZHOU H F, WU Z H, CHANG X J, et al. The effect of roasting on peanut allergens' digestibility, allergenicity, and structure [J]. *Food Bioscience*, 2021, 44: 101454–101460.
- [22] LIU M, HUAN F, HAN T J, et al. Combination processing method reduced IgE-binding activity of *Litopenaeus vannamei* by modifying lysine, arginine, and cysteine on multiple allergen epitopes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(16): 4865–4873.
- [23] LIU M, HUAN F, LI M S, et al. Mapping and IgE-binding capacity analysis of heat/digested stable epitopes of mud crab allergens [J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128735.
- [24] LIU M, LIU G Y, YANG Y, et al. Thermal processing influences the digestibility and immunoreactivity of muscle proteins of *Scylla paramamosain* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 98: 559–567.
- [25] LIU M, LIU S H, HAN T J, et al. Effects of thermal processing on digestion stability and immunoreactivity of the *Litopenaeus vannamei* matrix [J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 5374–5385.
- [26] 亢帅, 何欣蓉, 李东晓, 等. 美拉德反应对四角蛤蜊原肌球蛋白免疫结合活性的影响 [J]. *食品科学*, 2023, 44(16): 16–24.
- KANG S, HE X R, LI D X, et al. Effect of Maillard reaction on tropomyosin immunoreactivity in *Mactra veneriformis* [J]. *Food Science*, 2023, 44(16): 16–24.
- [27] 刘思寒. 热加工对凡纳滨对虾过敏原免疫结合活性的影响研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- LIU S H. Research on the effect of thermal processing on immune binding activity of allergens from *Litopenaeus vannamei* [D]. Xiamen: Jimei University, 2020.
- [28] 刘萌. 热加工影响拟穴青蟹肌肉过敏原致敏性及其分子机理研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- LIU M. The molecular mechanism and the allergenicity of thermal processing influences on the muscle allergen in *Scylla paramamosain* [D]. Xiamen: Jimei University, 2020.
- [29] 刘光明, 刘萌, 韩天娇, 等. 一种仿生评估甲壳类产品致敏性的方法: CN201910856916.X [P]. 2019–12–13.
- [30] DO A B, WILLIAMS K, TOOMER O T. *In vitro* digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins [J].

- Food Chemistry, 2016, 190: 581–587.
- [31] XU L L, ZHANG X M, WEN Y Q, et al. Comparison of tropomyosin released peptide and epitope mapping after *in vitro* digestion from fish (*Larimichthys crocea*), shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and clam (*Ruditapes philippinarum*) through SWATH-MS based proteomics [J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134314.
- [32] KEIL B. Proteolysis data bank: specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages [J]. Protein Sequences & Data Analysis, 1987, 1(1): 13–20.
- [33] HU M J, LIU G Y, YANG Y, et al. Cloning, expression, and the effects of processing on sarcoplasmic-calcium-binding protein: an important allergen in mud crab[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30): 6247–6257.
- [34] MIROTTI L, FLORSHEIM E, RUNDQVIST L, et al. Lipids are required for the development of Brazil nut allergy: the role of mouse and human iNKT cells[J]. Allergy, 2013, 68(1): 74–83.
- [35] LIU Q Z, LIN S Y, SUN N. How does food matrix components affect food allergies, food allergens and the detection of food allergens? A systematic review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127(1): 280–290.
- [36] AGUILERA J M. The food matrix: implications in processing, nutrition and health [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(22): 3612–3629.
- [37] LIU K X, LIN S Y, GAO X C, et al. Reduced allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) by altering the protein fold, digestion susceptibility, and allergen epitopes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23): 9120–9134.
- [38] LACK G, CHAPMAN M, KALSHEKER N, et al. Report on the potential allergenicity of genetically modified organisms and their products[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2002, 32(8): 1131–1143.
- [39] 常畅, 刘治平, 陈哲漪, 等. 棉籽蛋白 ACE 抑制肽的酶法制备及其体外稳定性研究[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(1): 106–114.
- CHANG C, LIU Z P, CHEN Z Y, et al. Study on enzymatic preparation and *in vitro* stability of ACE inhibitory peptides from cottonseed protein [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(1): 106–114.
- [40] KHAN M U, AHMED I, LIN H, et al. Potential efficacy of processing technologies for mitigating crustacean allergenicity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(17): 2807–2830.
- [41] QING M M, ZANG J N, LIU Y T, et al. Mechanistic study on the decline of foaming characteristics of egg white under heat stress: emphasizing apparent phenomena, structure, and intermolecular interactions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 136446.
- [42] Dos SANTOS R F H, DELGADO G G, Da COSTA T S, et al. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts [J]. BBA Advances, 2023, 3: 100091–100103.
- [43] RAHAMAN T, VASILJEVIC T, RAMCHANDRAN L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 49: 24–34.

## Immune-Binding Activity of *Scylla paramamosain* Matrix Reduced by Boiling Processing

LIU Meng<sup>1,2</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, GONG Feifei<sup>1</sup>, LIU Qingmei<sup>2</sup>, SUN Zhaomin<sup>1</sup>, LIU Hong<sup>2</sup>,  
GU Yi<sup>2</sup>, DAI Yaxuan<sup>1</sup>, CHEN Guixia<sup>3</sup>, LIU Guangming<sup>1,2,\*</sup>

(1. School of Marine Biology/Applied Technology Engineering Center of Fujian Provincial Higher Education for Marine Food Nutrition Safety and Advanced Processing/Applied Technology Engineering Center of Fujian Provincial Higher Education for Marine Resource Protection and Ecological Governance/Xiamen Key Laboratory of

Intelligent Fishery, Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China;

2. College of Ocean Food and Biological Engineering/ Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Women and Children's Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China)

**Abstract:** Allergen was the main reason for crustacean allergy, processing could effectively reduce the allergenicity of allergens, while the research based on food matrix needed to be further studied in-depth.

A biomimetic evaluation digestion and transport system was constructed based on the simulated continuous digestion of the gastrointestinal phase and the human colon Caco-2 cell transport model. The digestibility of the crab matrix and the transport of digestive products after boiling processed were systematically evaluated based on the crab matrix. Based on the specific binding of antigens and antibodies, the effect of boiling processing on the immune-binding activity of boiled crab matrix and digestive transport products was clarified. The main reasons for the changes in the immune-binding activity of crab matrix and digestive transport products were further analyzed from the structure perspective. The results showed that the digestibility of the boiled crab matrix was increased, it was easier to pass through the Caco-2 cell barrier. The immunoglobulin (Ig) E binding activity of crab matrix and biomimetic digestive transport products were reduced by  $38.85\% \pm 0.94\%$  and  $14.82\% \pm 0.24\%$ , respectively. The IgG binding activity of the heat stable allergens tropomyosin and sarcoplasmic calcium binding protein in matrix was significantly decreased. It was mainly due to the boiling process changed the fiber bundle arrangement, improved the digestibility of the crab matrix, and lowered the immune-binding activity. Changes in the structure of protein components in the matrix reduced the immune-binding activity of biomimetic digestive transport products and heat stable allergens. Basing on the food matrix, this study analyzed the effect of boiling on the immune-binding activity of crab matrix, improved the study on the effect of processing on the immune-binding activity of aquatic products, and provided a theoretical foundation for the exploration and evaluation of hypoallergenic aquatic product processing methods.

**Keywords:** *Scylla paramamosain*; food matrix; boiling processing; digestion transportation; immune-binding activity

(责任编辑:李 宁)

(上接第 62 页)

screening XO inhibitory peptides, but their activities were still need to be improved, and the inhibitory mechanisms were not yet clear. *Undaria pinnatifida* proteins were hydrolyzed by different proteases, and XO inhibitory peptides were screened by chromatographic fractionation and peptide segment identification, of which inhibitory mechanisms were investigated. The combination of papain and *Aspergillus niger* acid protease (AnproA1) was the best formulation to hydrolyze *Undaria pinnatifida* proteins with high XO inhibitory activity (92.1%). The hydrolysate was then purified to identify five novel XO inhibitory peptides, including YLGY, VYW, VVSW, TVVW and KVFAW, in which VYW ( $IC_{50} = 4.3 \text{ mmol/L}$ ) and TVVW ( $IC_{50} = 2.5 \text{ mmol/L}$ ) showed high XO inhibitory activities. The tryptophan residues on VYW and TVVW formed Pi-Pi stacking and Pi-Alkyl interactions with the active center of XO and other sites, showing non-competitive and competitive inhibitor effect, respectively. XO inhibitory peptides from *Undaria pinnatifida* protein were prepared by the combination of papain and AnproA1, which would be theoretically and practically important to develop anti-hyperuricemic food ingredients.

**Keywords:** *Undaria pinnatifida* protein; *Aspergillus niger* acid protease; xanthine oxidase inhibitory peptides; inhibitory type; molecular docking

(责任编辑:叶红波)