

## 论著

## 牡蛎致敏蛋白初步分离和酶解处理对其抗原性的影响

龙淑筠<sup>1,2,3,4</sup>, 潘剑宇<sup>1,2</sup>, 陈华<sup>1,2</sup>, 蔡冰娜<sup>1,2</sup>, 孙恢礼<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301; 3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**目的 分离获得太平洋牡蛎致敏蛋白, 考察酶解法对牡蛎致敏蛋白抗原性的影响。方法 利用硫酸铵沉淀和葡聚糖凝胶 G-75 分离牡蛎致敏蛋白, 聚丙烯酰胺电泳分析获得蛋白的分子量大小, 使用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和动物蛋白水解酶(3 000 U/g)酶解牡蛎致敏蛋白, OPA 法测定水解度, 间接竞争 ELISA 法测定酶解产物的抗原性。结果 分离到分子量约为 40 和 98 kD 的牡蛎致敏蛋白, 经木瓜蛋白酶酶解的致敏蛋白特征条带消失, 酶解产物水解度为(31.87 ± 0.309)%, 动物蛋白酶和中性蛋白酶对牡蛎致敏蛋白水解度分别为(24.13 ± 0.153)% 和(12.43 ± 0.115)%, 但致敏蛋白特征条带未完全消失; 间接竞争 ELISA 检测表明 3 种蛋白酶均能不同程度地降低牡蛎致敏蛋白的抗原性或使致敏性基本消除。结论 蛋白酶酶解法可有效水解牡蛎致敏蛋白, 从而降低其抗原性, 其中木瓜蛋白酶效果明显。

**关键词:**牡蛎致敏蛋白; 分离; 酶解; 抗原性; 食品安全; 致敏; 食物致敏; 水产品

中图分类号: R155.5; Q556<sup>+</sup>.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)04-0307-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.001

## Oyster allergenic protein preliminary separation and enzymatic activity on its antigenicity

LONG Shu-jun, PAN Jian-yu, CHEN Hua, CAI Bing-na, SUN Hui-li

(Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Guangzhou, 510301)

**Abstract: Objective** Allergenic proteins of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) were separated and the change of protein molecular weight and antigenicity after proteases treatment were studied. **Methods** Oyster allergenic protein was isolated by ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-75. The oyster allergenic protein was hydrolyzed by animal protein hydrolysis enzyme, papain, and neutrase protease, respectively. The degrees of hydrolysis were assessed by OPA and SDS-PAGE methods. The change of allergenic protein antigenicity were detected by indirect competitive ELISA. **Results** Oyster allergenic protein of 40 and 98 kD was separated and the 40 kD protein was used for further studies. The highest hydrolysis degree of (31.87 ± 0.309)% was achieved by papain and the oyster allergy protein band was disappeared in SDS-PAGE analysis. While by animal protein hydrolysis enzyme and neutral protease, the proteolytic degree of oyster allergies were (24.13 ± 0.153)% and (12.43 ± 0.115)%, respectively. The indirect competitive ELISA analysis also showed that the antigenicity of protein were obviously decreased by hydrolysis with these three proteases. **Conclusion** Antigenicity of oyster allergenic protein could be effectively reduced by papain hydrolysis.

**Key words:** Oyster allergenic protein; separation; enzyme hydrolysis; antigenicity; food safety; allergy; food allergy; aquatic product

牡蛎是我国四大经济水产之一, 蕴含丰富的蛋

白质、多肽、多糖和功能氨基酸等生理活性物质, 以及多种人体必需的维生素、矿物质, 近年诸多以牡蛎为原材料的食品、营养品与保健品研发上市<sup>[1-2]</sup>。然而鱼类、甲壳类、贝类、头足类等水产动物普遍存在致敏问题, 因食用水产动物及其制品而出现腹痛、腹泻、皮疹、哮喘等过敏症状的报道屡见不鲜。有调查表明, 24% 的亚洲儿童存在甲壳类海鲜过敏的症状, 也有统计报道称在亚洲 40% 的儿童与 33% 的成人对海鲜有不同程度的过敏症状<sup>[3]</sup>。虾与蟹等甲壳类动物及其制品是联合国粮农组织提出的八大类主要致敏食物中的重要一类<sup>[3-4]</sup>。由此可

收稿日期: 2014-05-13

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目子课题(2012BAD33B10-3); 海洋公益性行业科研专项子课题(2013418018); 国家青年科学基金项目(31101271); 省部产学研结合项目(2012B091000025); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项项目(SZHY2012-B01-004); 广东省海洋经济创新发展区域专项项目(GD2013-B03-001)

作者简介: 龙淑筠 女 硕士生 研究方向为海洋生物制品毒理与免疫研究 E-mail: longsj602@163.com

通讯作者: 孙恢礼 男 研究员 研究方向为海洋生物高值利用与绿色技术 E-mail: shl@scsio.ac.cn

见,水产动物蛋白致敏问题成为限制其在食品、保健食品和医药品等领域中广泛应用的重要原因之一,也是我国海洋动物制品产业发展亟待解决的重要限制性技术难题。

水产动物引起的致敏反应是机体的一种应激状态,属于免疫球蛋白 E(IgE)介导的 I 型变态反应<sup>[5]</sup>。相关研究显示运用辐照、加热、高压、酶解、超声等方法对致敏蛋白进行处理后,致敏性都有不同程度的下降,推测处理过程中致敏蛋白的结构发生了改变,蛋白质肽链发生解聚、交联、断裂、聚合等一系列的变化,抗原表位被破坏或者被掩盖,从而降低了与 IgE 抗体结合的能力,致敏性随之降低<sup>[6]</sup>。Shimakura<sup>[7]</sup>采用胰蛋白酶、 $\alpha$ -糜蛋白酶、Protease P 等 3 种酶对螃蟹、龙虾等致敏蛋白进行处理,ELISA 试验结果表明原肌球蛋白的致敏性部分或完全消失。董晓颖等<sup>[8]</sup>也发现碱性蛋白酶能有效降低虾致敏蛋白的致敏性。

酶处理法消除或降低水产动物蛋白的致敏性具有绿色、安全、高效、可控等特点,而且不容易损坏水产动物蛋白和多肽的营养成分或活性成分,目前国内外从酶解产物的分子量大小和血清学试验的角度来研究蛋白酶降解致敏蛋白的能力和酶解对致敏蛋白抗原性的影响。牡蛎主要致敏蛋白是分子量约为 40 和 98 kD 的原肌球蛋白<sup>[9]</sup>,而 40 kD 的原肌球蛋白分子量又与虾的原肌球蛋白分子量相近,且含量相对更高,因此被看作一类普遍致敏的蛋白。本试验对牡蛎致敏蛋白分离纯化并用酶解法对牡蛎致敏蛋白进行处理,对酶解产物分子量及抗原性进行研究,为提高牡蛎等海洋贝类在食品及保健制品等领域的应用安全性提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

生鲜牡蛎购于广州黄沙水产市场,由中国科学院南海海洋研究所喻子牛研究员鉴定为太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、酶标仪(美国 Thermo Multiskan)、冷冻干燥机、高速冷冻离心机、控温磁力搅拌器、水浴恒温震荡仪。

96 孔酶标板、Sephadex G-75 层析柱(30 cm × 20 mm)均购自科吴生物有限公司。制备多克隆抗体所用的 2 只新西兰家兔(SPF 级)购于江苏省农科院。丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液(19:1, V/V)(40%,上海生物工程有限公司)、N,N,N,N-四甲基

乙二胺(TENED)、甘氨酸(Gly)、吐温-20、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG、弗氏完全和不完全佐剂均购自美国 Sigma,预染蛋白 Marker(10 ~ 170 kD,美国 Thermo Fisher Scientific),木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和动物蛋白酶均购自广州威佳科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牡蛎致敏蛋白的提取与纯化

提取:牡蛎致敏蛋白的提取和纯化参考刘光明等<sup>[10]</sup>的方法,略作修改:新鲜牡蛎去肠肚和内脏,切碎,匀浆,加入 5 倍 20 mm/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.5),4 °C 搅拌 4 h,于 100 °C 加热 3 min,冷却后离心 15 min,取上清液。用 30% 硫酸铵盐析沉淀,离心,把沉淀至于蒸馏水中透析 3 次,每次 6 h。对透析后的蛋白进行冷冻干燥后保存于 -20 °C 备用。

纯化:称取冻干蛋白 100 mg 溶于 2 ml PBS 缓冲液中,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,滤液用葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-75 层析,用蒸馏水洗脱,收集洗脱液 3.6 ml/管,流速 1.5 ml/min,于紫外分光光度计 270 nm 处进行检测,记录吸光度并做吸收曲线,各洗脱组分冷冻干燥后采用 BCA(bicinchoninic acid)测定其蛋白浓度,经聚丙烯酰胺电泳检测证实得到目标蛋白,于 -20 °C 保存备用。

#### 1.2.2 蛋白酶解

采用福林酚法<sup>[11]</sup>,分别测定动物蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶的酶活性。在相同酶活力条件下根据蛋白酶对牡蛎致敏蛋白的水解能力进行比较,过程如下:取 100 mg 按 1.2.1 方法纯化冻干的牡蛎致敏蛋白(为粗提蛋白用 Sephadex G-100 层析后所得到的致敏蛋白),用 0.01 mol/L PBS(pH = 7.4)缓冲液溶解至浓度为 10 mg/ml。按酶活性与底物反应比 3 000 U/g 的比例加入相应的酶,在最适条件下反应进行水解,样品在水浴摇床中反应 4 h,100 °C 沸水浴 15 min 使酶失活,测定酶解产物分子量和水解度,水解度(DH)测定参照 OPA 法<sup>[12]</sup>,具体如下:在 340 nm 处测定吸光度,以去离子水作参比。每个试管中分别加入 3 ml OPA;向装有 3 ml OPA 的试管中加入 400  $\mu$ l 丝氨酸标准样品,振荡混匀,精确反应 2 min 后在 340 nm 处测定吸光度,每个样品设立 3 个平行管;向装有 3 ml OPA 的试管中加入 400  $\mu$ l 去离子水,振荡混匀,精确反应 2 min 后在 340 nm 处测定吸光度,样品测定 3 次取平均值。DH 计算公式:DH = 水解的肽键数<sub>(h)</sub>/总肽键数<sub>(htot)</sub> × 100% = h/htot × 100%。

#### 1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

采用不连续凝胶垂直板电泳法检测<sup>[13]</sup>,分离胶

浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%, 调整蛋白浓度为 1 mg/ml, 蛋白质样品与样品缓冲液体积比 4:1 混合后, 煮沸, 加样量为 12  $\mu$ l, 1.5 h 电泳完毕, 考马斯亮兰 R-250 染色, 凝胶成像系统采集图片。

#### 1.2.4 酶解后的致敏蛋白免疫学效应

##### 1.2.4.1 多克隆抗体的制备<sup>[14-15]</sup>

将 0.5 mg/ml 纯化后的牡蛎致敏 a 蛋白与弗氏完全佐剂混合, 皮下多点注射于 2 只雄性新西兰大白兔, 400  $\mu$ g/次, 每隔 2 周加强免疫 1 次, 共免疫 4 次, 采血检测, 通过间接 ELISA 法确定抗血清的效价, 待效价大于 1:50 000, 进行心脏采血, 室温放置 2 h 后 3 000 r/min 离心 5 min, 制备抗血清, 取血清于 -20  $^{\circ}$ C 下保存备用。

##### 1.2.4.2 间接竞争 ELISA 法测定牡蛎致敏蛋白抑制率

用未处理的牡蛎致敏蛋白做抗原, 包被液稀释浓度为 10  $\mu$ g/ml, 每孔 100  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C 包被过夜, 次日取出, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 5% 脱脂奶粉 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 封闭过夜, 次日取出, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 50  $\mu$ l 稀释 50 倍的处理后的牡蛎致敏蛋白和 50  $\mu$ l 用洗涤液稀释一定倍数的兔多克隆抗体, 同时每个样品设立 3 个复孔对照, 不加抗原或样品的反应孔为无竞争反应体系, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100  $\mu$ l 用洗涤液稀释的酶标二抗(羊抗兔 IgG-HRP, 稀释倍数 1:800), 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100  $\mu$ l 新鲜配制的底物缓冲液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min; 每孔加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu$ l, 终止反应, 于酶标仪 450 nm 处测定 OD 值, 绘制标准曲线, 致敏蛋白抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = (1 - B/B_0) \times 100\% \\ = (\text{OD}_{\text{空白对照}} - \text{OD}_{\text{代测样品}}) / \text{OD}_{\text{空白对照}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 牡蛎致敏蛋白的初步分离

经过硫酸铵沉淀和葡聚糖凝胶分离后, 用 PBS 溶解所得蛋白冻干样品进行聚丙烯酰胺电泳, 分别如图 1 和 2 所示, 30% 硫酸铵沉淀的粗提蛋白, 经 G-75 分离洗脱收集到 a、b 共 2 个洗脱峰, 对应电泳的 a 和 b 蛋白条带, 两种蛋白均含有分子量为 40 kD 的致敏蛋白, 但 b 蛋白中除了含有分子量为 40 kD 的蛋白, 还含有分子量约 98、105 kD 等大蛋白, 且蛋白组分比 a 蛋白复杂。

### 2.2 蛋白酶解

比较 3 种蛋白酶对牡蛎致敏蛋白的酶解效果。在相同的酶活力作用下, 木瓜蛋白酶水解度最大, 其次是

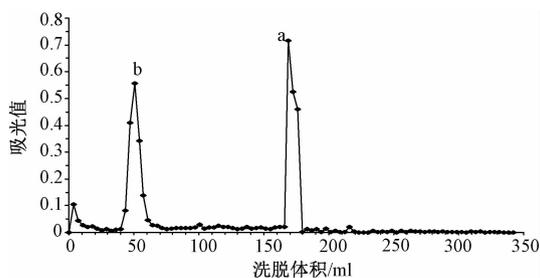
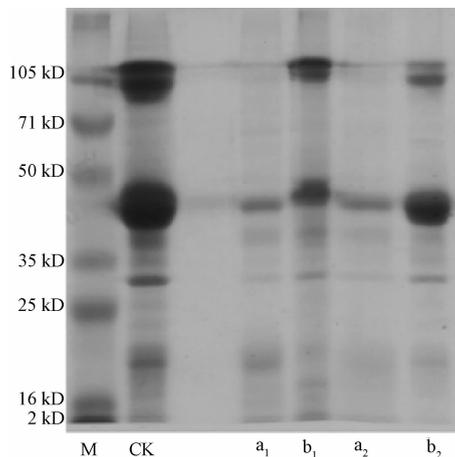


图 1 牡蛎粗提致敏蛋白纯化

Figure 1 Purification of oyster allergenic protein



注: M: Marker; CK: 粗提蛋白; a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>: 洗脱峰 a; b<sub>1</sub>、b<sub>2</sub>: 洗脱峰 b

图 2 牡蛎致敏蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of oyster allergenic protein

动物蛋白酶, 中性蛋白酶水解度最低, 见表 1。

表 1 3 种蛋白酶酶解牡蛎致敏蛋白的条件与水解度

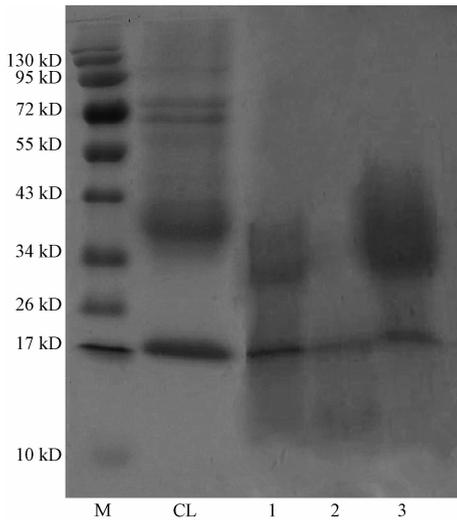
Table 1 Optimal reaction conditions of three proteases and hydrolysis

蛋白酶	pH	温度/ $^{\circ}$ C	时间/h	料水比	水解度/%
动物蛋白酶	7	55	4	1:6	24.13 $\pm$ 0.153 ** $\Delta$
木瓜蛋白酶	7	50	4	1:6	31.87 $\pm$ 0.309 ●●
中性蛋白酶	7	55	4	1:6	12.43 $\pm$ 0.115

注: \*\*为动物蛋白酶组与木瓜蛋白酶组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );  $\Delta$   $\Delta$  为动物蛋白酶组与中性蛋白酶组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); ●●为木瓜蛋白酶组与中性蛋白酶组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )

酶解前后牡蛎蛋白的电泳分析显示(见图 3), 木瓜蛋白酶酶解后, 40 kD 分子量处条带基本消失, 而动物蛋白酶和中性蛋白酶仍有 40 kD 条带, 其中中性蛋白酶效果最差, 条带仍然较明显。此外, 从木瓜蛋白酶酶解产物电泳图可见, 该酶对 40 kD 以上分子量蛋白的酶解效果同样明显, 酶解后形成 17 kD 分子量以下肽成分。

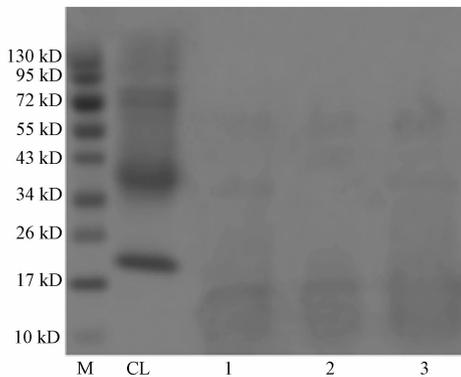
考察木瓜蛋白酶处理时间对酶解效果的影响(见图 4), 结果显示 2 h 酶解处理即可使 40 kD 的蛋白条带消失, 显示木瓜蛋白酶在较短的时间内即可较好的水解牡蛎致敏蛋白。



注: M: Marker; CL: 牡蛎致敏蛋白; 1. 动物蛋白水解酶; 2. 木瓜蛋白酶; 3. 中性蛋白酶

图3 3种蛋白酶降解致敏蛋白效果电泳图

Figure 3 Electrophoresis of five kinds of protease hydrolysis results



注: M: Marker; CL: 牡蛎致敏蛋白; 1~3: 0.2, 0.4, 0.6 h, 加酶量 3 000 U/g

图4 木瓜蛋白酶降解致敏蛋白效果电泳图

Figure 4 Optimization of alcalase hydrolysis conditions

综上所述,木瓜蛋白酶对牡蛎致敏蛋白水解效果最好,蛋白分解最彻底,水解度最大,而动物蛋白酶次之,中性蛋白酶对其水解效果最差。

### 2.3 牡蛎致敏蛋白酶解产物的免疫学效应

通过测定分离得到的蛋白分子量大小和制备多克隆抗体,表明分离得到具有致敏性的牡蛎蛋白。用动物蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶对牡蛎致敏蛋白进行酶解,得到木瓜蛋白酶、动物蛋白水解酶和中性蛋白酶的致敏蛋白抑制率依次增高的结果,该结果表明木瓜蛋白酶酶解产物基本不与多克隆抗体血清中的特异性抗体竞争性结合,抗原性大大降低;动物蛋白酶和中性蛋白酶酶解产物部分与多克隆血清中的特异性抗体竞争性结合,表明其抗原性有所降低,但脱敏效果不如木瓜蛋白酶。

表2 间接竞争 ELISA 法检测牡蛎致敏蛋白酶解产物的免疫学效应

Table 2 Detection of oyster allergy immunology effect by indirect competitive ELISA

蛋白酶	致敏蛋白抑制率/%
动物蛋白水解酶	15.23 ± 0.650 * * △ △
木瓜蛋白酶	2.0 ± 0.557 ● ●
中性蛋白酶	18.67 ± 0.603

注: \*\*为动物蛋白酶组与木瓜蛋白酶组相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); △ △ 为动物蛋白酶组与中性蛋白酶组相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); ● ● 为木瓜蛋白酶组与中性蛋白酶组相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )

### 3 讨论

本试验通过硫酸铵沉淀法和葡聚糖凝胶 (Sephadex G-75) 分离了含有分子量约为 40 与 98 kD 的牡蛎致敏蛋白,与文献报道<sup>[9]</sup>基本相符,并发现木瓜蛋白酶能有效酶解牡蛎致敏蛋白中的大蛋白分子,间接竞争酶联免疫检测进一步表明其酶解产物抗原性基本消除,说明木瓜蛋白酶能使致敏蛋白的肽键发生断裂,生成分子量更小的多肽或氨基酸,从而可能影响牡蛎致敏蛋白的致敏性。木瓜蛋白酶是一种含巯基 (-SH) 肽链内切酶,具有蛋白酶和酯酶的活性,对动植物蛋白、多肽、酯、酰胺等有较强的水解能力;而动物蛋白酶和中性蛋白酶有一定分解牡蛎致敏蛋白的能力,但效果不明显。动物蛋白水解酶为混合性蛋白酶 (主要为胰蛋白酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶),水解牡蛎致敏蛋白的专一性和针对性不如木瓜蛋白酶;而中性蛋白酶虽为专一性酶,对牡蛎致敏蛋白的水解度为 12.4%,与酶解鸡全蛋清和玉米蛋白的水解度相当<sup>[16-17]</sup>,可能是由于中性蛋白酶是外切酶,不能有效水解蛋白质结构内部的肽键,这也与蛋白质本身的结构与构象有关。

水产动物类原肌球蛋白普遍由于其耐热、耐酸、抗胃蛋白酶水解等特性,因此性质比较稳定,在体内不容易被消化水解,而且其本身为大蛋白分子,容易刺激机体免疫系统发生免疫应答产生大量特异性 IgE 抗体,当此类蛋白再次进入体内,便与特异性 IgE 结合促使肥大细胞释放组胺等物质而发生过敏反应。根据国内外研究<sup>[8-9]</sup>发现,酶解能有效水解水产动物类原肌球蛋白使其降解为小分子肽以及破坏致敏蛋白的抗原线性表位,从而使其抗原性下降,致敏性大大降低或者消失。本研究测定木瓜蛋白酶、动物蛋白水解酶以及中性蛋白酶对牡蛎致敏蛋白的水解度,从水解度的大小反映该酶水解牡蛎致敏蛋白的能力以及水解程度,通过 ELISA 试验说明木瓜蛋白酶酶解产物基本不与多克隆抗体血清中的特异性抗体竞争性结合,抗原性大大降低;动物蛋白酶和中性蛋白酶酶解产物部分与多克

隆血清中的特异性抗体竞争性结合,表明其抗原性有所降低,但脱敏效果不如木瓜蛋白酶。

通过对酶解产物各组分分子量大小的检测和血清学试验的角度能证明酶解产物抗原性的变化,但酶解产物致敏性是否降低或消除,还应进一步结合动物、病理切片或细胞因子检测等多项指标,这需要探索动物过敏模型的建立与对多项指标的<sup>[18-19]</sup>综合量化评估。

陈宝宏等<sup>[20]</sup>报道木瓜蛋白酶能分解大米中的致敏原,同时也能改善大米的食用品质。酶处理降低致敏性的机理分为两大类:一是通过对致敏蛋白的限制性水解从而破坏致敏蛋白表面的抗原表位或者水解蛋白质的肽键使蛋白质部分降解成小肽或氨基酸来消除或降低致敏性;二是酶交联使蛋白质内部多肽链之间或蛋白质分子之间形成共价键,使原先暴露在表面的过敏原表位包埋入蛋白质分子内部而消除其致敏性,但蛋白质交联形成大蛋白,也有可能增加其致敏性<sup>[21]</sup>。目前广泛用于水解生物蛋白的食品级蛋白酶通常分三大类,一类是胃蛋白酶、胰蛋白酶等动物性蛋白酶;二类是菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶等植物性蛋白酶;第三类是碱性蛋白酶、中性蛋白酶等微生物蛋白酶。本研究发现木瓜蛋白酶是对牡蛎致敏蛋白酶解效果最好并能较好破坏其抗原性的蛋白酶,但是究竟哪一类蛋白酶或者复合酶将稳定、高效地应用推广到水产动物脱敏产业化生产中,还需进一步研究。

随着酶水解技术在营养食品与生物制品加工中的发展应用,致敏蛋白结构域及其在体内代谢过程中的变化,酶解机理、酶的结构功能修饰与酶切位点选择性的深入研究,以及近年来新功能蛋白酶的开发与利用,尤其是近年来极端环境的海洋微生物酶的不断发现与功能鉴定,将可能为酶水解法在水产动物食品或生物制品脱敏加工中的推广应用奠定理论基础,同时为研发水产类致敏原检测、诊断试剂与检测方法的创新提供理论参考。

## 参考文献

[ 1 ] CAI B N, PAN J Y, WU Y T, et al. Immune functional impacts of oyster peptide-based enteral nutrition formula (OPENF) on mice: a pilot study[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology,

2013,31(4): 813-820

[ 2 ] Lopata A L, Lehner S B. New insight into seafood allergy [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol,2009,9(3):270-277.

[ 3 ] Moneret-Vautrin D A. Epidemiology de l'allergie alimentaire et prévalence relative des trophallergènes [J]. Cahiers de Nutrition et de Diététique,2001,36(4):247-252.

[ 4 ] SCHäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy [J]. Allergy,2001,56(12):1172-1179.

[ 5 ] 李振兴. 虾 (*Penaeus Vannamei*) 过敏原免疫活性的研究 [D]. 青岛:中国海洋大学,2006.

[ 6 ] 郑礼娜,林洪,刘一璇,等. 不同热加工方式对刀额新对虾过敏原活性的影响 [J]. 水产学报,2011,26(3):466-471.

[ 7 ] Shimakura K, Tonomura Y, Hamada Y, et al. Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion [J]. Food Chemistry,2005,91(2):247-253.

[ 8 ] 董晓颖,高美须,潘家荣,等. 不同处理方法对虾过敏蛋白分子量及抗原性的影响 [J]. 核农学报,2010,24(3):548-554.

[ 9 ] Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, et al. Tropomyosin, the major oyster crassostrea gigas allergen and its IgE-binding epitope [J]. Journal of Food Science,2008,63(1):631

[ 10 ] 张凌晶,蔡秋风,刘光明,等. 太平洋牡蛎肌肉蛋白的模拟胃肠液消化研究 [J]. 集美大学学报:自然科学版,2011,16(2):81-86.

[ 11 ] 中华人民共和国轻工业部. QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法 [S]. 1993.

[ 12 ] 孟雅潇. 乳蛋白酶解肽苦味脱除工艺研究 [D]. 北京:中国农业科学院,2008

[ 13 ] 王辉. 耐热蛋白酶对 UHT 乳品质影响规律的研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008

[ 14 ] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南 [M]. 北京:北京科学出版社,1992:888-897

[ 15 ] 郭鑫. 动物免疫学实验教程 [M]. 北京:中国农业大学出版社,2007:22-25.

[ 16 ] 李和平,隋继学,张雪,等. 中性蛋白酶水解鸡全蛋清制备活性肽工艺条件优 [J]. 食品科技,2009,34(8):186-189.

[ 17 ] 何莉萍,刘良忠. 中性蛋白酶和碱性蛋白酶对玉米蛋白水解作用的研究 [J]. 食品科学,2008,29(3):152-157.

[ 18 ] 孙拿拿,张倩男,王珊,等. BN 大鼠经口致敏动物模型研究 [J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):214-217.

[ 19 ] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. BN 大鼠食物过敏动物模型的实验研究 [J]. 中国食品卫生志,2005,17(2):103-105.

[ 20 ] 陈宝宏,朱永义. 木瓜蛋白酶分解大米过敏原的研究 [J]. 粮食与饲料工业,2004(3):9-11.

[ 21 ] 张铁群,李振兴,林洪,等. 果糖和木糖在美拉德反应中对虾类过敏原活性影响的研究 [J]. 食品科学,2009,30(9):11-14.