

模拟胃、肠消化日本沼虾原肌球蛋白稳定性比较

陈 娇^{1,2,3}, 华希玮^{1,2,3}, 刘 鑫^{1,2,3}, 郑双艳², 陈红兵^{1,2}, 谢彦海^{1,2*}

(¹南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室 南昌 330047

²南昌大学中德联合研究院 南昌 330047

³南昌大学食品学院 南昌 330047)

摘要 为比较成人和婴幼儿胃、肠消化对日本沼虾原肌球蛋白消化稳定性的影响差异,首先构建成人和婴幼儿体外静态消化模型,对原肌球蛋白(TM)进行体外消化。随后,用 Tricine-SDS-PAGE、RP-HPLC 和 MALDI-TOF-MS 等方法测定经体外模型模拟消化后 TM 的水解度和酸溶性肽浓度以及胃、肠消化产物的分子质量分布等。结果显示:模拟成人、婴幼儿胃消化终阶段的 TM 水解度分别为(17.99±1.41)%、(49.46±1.02)%;模拟成人、婴幼儿肠消化终阶段的 TM 水解度分别为(9.92±1.50)%、(30.68±1.04)%。模拟成人、婴幼儿胃消化终阶段的酸溶性肽质量浓度分别为(74.77±6.84)、(46.39±7.5)μg/mL;模拟成人、婴幼儿肠消化终阶段的酸溶性肽质量浓度分别为(303.99±12)、(175.93±11.53)μg/mL。模拟成人胃、肠消化终阶段时, TM 的消化片段主要集中分布于 15~30 ku 范围和 20 ku 以下,而模拟婴幼儿胃、肠最终的消化片段以大分子为主,主要在 20 ku 以上,说明成人模拟消化液的消化能力较婴幼儿模拟消化液消化能力强, TM 易被成人消化而婴幼儿对 TM 的消化不完全,可能更容易引起过敏反应的发生。成人和婴幼儿胃肠消化的差异可能是由于成人的消化系统健全,而婴幼儿胃肠功能发育不健全、消化酶量较少造成的。

关键词 成人过敏; 婴幼儿过敏; 原肌球蛋白; 体外模拟胃肠消化; 消化稳定性

文章编号 1009-7848(2025)02-0105-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.009

虾类具有口感好,营养价值高^[1]等特点,深受广大消费者的喜爱。近年来虾类产品消费量大幅上升,虾类过敏现象也随之频繁出现^[2]。据调查,美国约有 2.3% 的人群^[3]对虾过敏,欧洲有 5.4% 的人群^[4]也对虾过敏。虾类产品是引起食物过敏最常见的食物之一^[5]。我国目前报道的食物过敏患者中,海虾过敏率高达 40.3%^[3],说明虾类过敏现象在国内非常普遍,应该引起高度重视^[6]。

原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)是引起虾过敏的主要过敏原^[7]。该过敏原结构保守,性质稳定,具有耐酸、耐热处理,不易被胃蛋白酶或胰蛋白酶消化的特点^[8],常以完整或降解为肽段的形式存在于人体内^[9],可引起机体出现过敏反应^[10]。美国食品药品监督管理局(FDA)认为由于食物过敏原通常对胃肠蛋白酶消化有抵抗力,因此引入消化率作为评估蛋白质致敏性的方法之一,即模拟胃肠

消化模型中过敏原的消化稳定性对于评估其致敏性具有重大的参考价值^[11]。本试验首先建立一种操作简便、经济适用、重现性好的成人/婴幼儿胃-肠-空肠肠刷状缘酶(BBM)酶静态消化模型,然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)、高效液相色谱(RP-HPLC)和串联四极杆飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)等分析 TM 消化产物的水解度、肽含量、组分和分子质量指标,评价其胃肠消化特性,探讨食物过敏原的体外消化与潜在致敏性的关联,为明确婴幼儿与成年人食物过敏的差异性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)采自江西省鄱阳湖水域;N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、甘氨酸,上海生工公司;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、胃蛋白酶、胰蛋白酶、甘氨酸脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、三氟乙酸(TFA),美国 Sigma;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;Pierce™ Quantitative Colorimetric Pep-

收稿日期: 2024-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060584);江西省自然科学基金项目(20232BAB205084)

第一作者: 陈娇,女,硕士生

通信作者: 谢彦海 E-mail: xieyh818@ncu.edu.cn

tide Assay 试剂盒,赛默飞世尔科技公司;其它常规试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

Z36HK 高速冷冻离心机,德国 Hermle 公司;GS-800 凝胶成像系统、Mode 1860 酶联免疫检测仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;LC-20AT 高效液相色谱,日本岛津公司;6550 iFunnel Q-TOF 串联四极杆飞行时间质谱仪,安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 体外模拟成人胃、肠及 BBM 酶消化 参考 Menard 等^[12]、Brodkorb 等^[13]和 Ding 等^[14]建立的成人体外静态消化方法并稍作改进,并按照周启等^[15]的试验方法配制胃储液、肠储液和模拟消化液等试剂。

胃储液配方如下:适量 KCl、KH₂PO₄、NaHCO₃、NaCl、MgCl₂·6H₂O、(NH₄)₂CO₃ 混匀并用 HCl 将混合液 pH 值调至 3.0,低温保存。

肠储液配方如下:所加试剂同胃储液,并用 NaHCO₃ 将混合液 pH 值调至 7.0,低温保存。

模拟胃部消化方法如下:37℃中预热 1.5 mL 胃储液后,与 2 mL TM 溶液、1 μL CaCl₂ 和 0.32 mL 成人胃相酶溶液混合,并调节消化液的 pH 值至 3.0。最后置于 37℃,100 r/min 恒温摇床中消化 2 h。分别在 0,30,60,90,120 min 用 1 mol/L NaHCO₃ 将消化产物的 pH 值调至 7.0,随后 100℃水浴加热 5 min 灭酶后冷却并保存。

模拟肠道消化方法如下:37℃中预热 1.10 mL 肠液后,与 2 mL 120 min 的胃消化产物溶液、8 μL CaCl₂、200 μL 成人肠相酶液和 250 μL 胆盐溶液混合,并调节消化液的 pH 值至 3.0,后续步骤同模拟胃部消化方法。

模拟 BBM 酶消化方法如下:胃肠消化液与空肠 BBM 酶液以 1:100 的体积比充分混合,置于 37℃,100 r/min 恒温摇床中消化 120 min。随后 100℃水浴加热 5 min 灭酶后冷却并保存。

1.3.2 体外模拟婴幼儿胃、肠及 BBM 酶消化 模拟胃部、肠道消化方法如下:体外模拟婴幼儿胃、肠消化与体外模拟成人胃、肠消化类似,仅将成人胃相酶液换成婴幼儿胃相酶液,成人肠相酶液换成婴幼儿肠相酶液,其它条件不变。

模拟 BBM 酶消化方法如下:将胃肠消化液和空肠 BBM 酶液以 1:1 000 的体积比充分混合,后续步骤同模拟成人 BBM 酶消化。

1.3.3 水解度的测定 体外模拟成人/婴幼儿胃、肠及 BBM 酶消化日本沼虾原肌球蛋白,其消化产物水解度采用邻苯二甲醛(OPA)法测定^[16]。取 20 μL 的 0,40,80,120,160,200 μg/mL Arg 标准溶液和 20 μL 样品依次加入 96 孔酶标板中,再分别加入 150 μL OPA 工作液,并用锡箔纸包裹进行避光反应 5 min,检测 OD_{340nm} 值。进行 3 次平行试验,并取平均值。根据式(1)和(2)计算 TM 水解度。

$$H = (h_t - h_c) \times DF \quad (1)$$

$$DH(\%) = h/h_{tot} \times 100 \quad (2)$$

式中: H 为经过校正后的吸光度差值; h_t 为水解反应后样品的吸光度值; h_c 为空白对照的吸光度值; DF 为稀释因子; DH 为样品的水解度,%; h 用等价 H 表示,mmol/g; h_{tot} 为每克纯蛋白中肽键的毫摩尔数,mmol/g,TM 的 h_{tot} 值为 7.469 mmol/g。

1.3.4 多肽浓度的测定 用 15%三氯乙酸(TCA)沉淀上述试验中体外模拟成人/婴幼儿胃、肠及 BBM 酶消化产物中的大分子蛋白质,3 000 r/min 离心 5 min,取上清。按照试剂盒说明测定上清液中的多肽含量。

1.3.5 Tricine-SDS-PAGE 鉴定 利用还原型 Tricine-SDS-PAGE 检测不同时间点的消化产物。经制胶,上样,先 30 V 电泳 1 h 后再 100 V 电泳 1.5 h。随后依次固定、漂洗、染色、脱色和成像,得到模拟胃肠消化产物的电泳图。

1.3.6 反相高效液相法(RP-HPLC)分析 采用 RP-HPLC 分析 TM 消化前、后的组分。方法如下:4.6 mm×250 mm 的 C18 柱,A、B 相溶液为洗脱流动相,自动排气后用 5% B 相平衡柱子,待基线平稳后上样,30 μL 进样体积,45℃柱温,在 0~70 min 内洗脱 5%~60%的 B 相,保持洗脱流速为 1 mL/min,检测 OD_{214nm} 值。

1.3.7 串联四极杆飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)分析 将 TM 体外消化产物用 MALDI-TOF-MS 进行全自动分析。采用线性正离子谱模式,N₂ 激光源,波长 337 nm,离子源加速电压 25 kV,脉冲宽度 3 ns,叠加 100。准确吸取 0.5 μL 样

品滴加于载体样品孔中心, 然后加入 0.5 μL 基质, 室温晾干结晶后载入仪器进行测试。

1.3.8 统计分析 采用 Graphpad 8.0 处理分析数据, 结果以均值或均值 \pm 标准偏差表示, 并以单因素方差分析法对数据进行显著性分析。

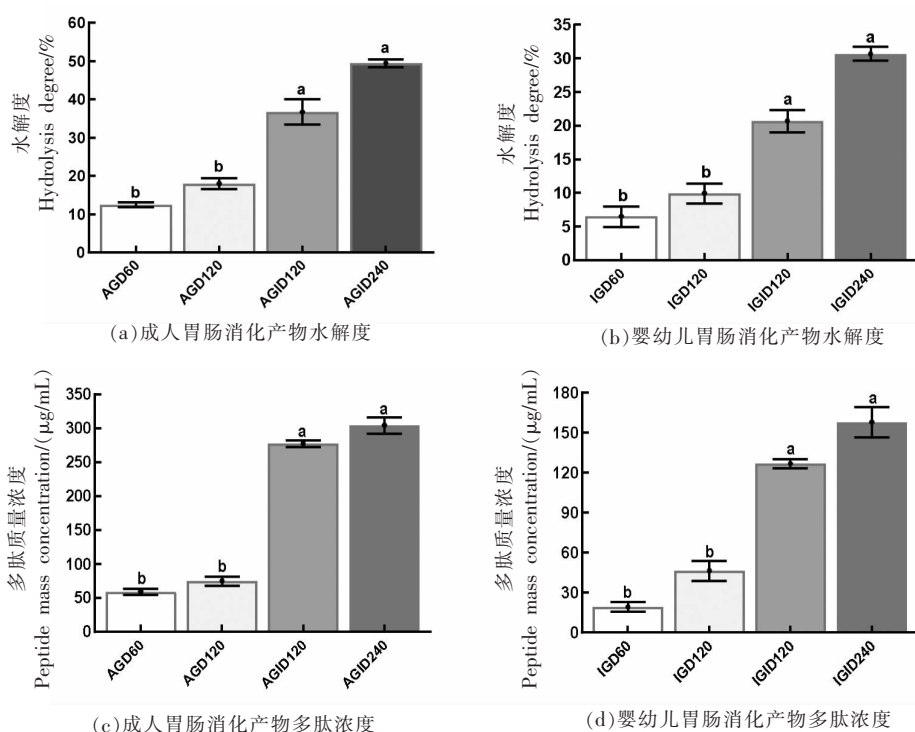
2 结果与分析

2.1 TM 水解度和多肽质量浓度

模拟成人胃、肠消化 TM 的水解度与消化时间成正相关关系, 且 TM 在肠相消化的水解度显著高于胃相消化(图 1a)。模拟婴幼儿消化 TM 的水解度变化趋势与成人类似(图 1b)。综合比较两者发现模拟成人消化各个阶段的 TM 水解度比婴幼儿更高。该结果可能是因为模拟成人消化液的

消化能力更强, TM 消化程度更高, 消化产物更加丰富以及消化片段更小。

模拟成人肠相消化液中肽含量显著高于胃相消化液中肽含量。消化时间越长, TM 酶解越充分, 片段越小, 对应酸溶性肽含量越高(图 1c)。体外模拟婴幼儿肠相消化液中肽含量也显著高于胃相消化液中的肽含量。该变化趋势与模拟成人消化 TM 肽含量变化相似, 而模拟婴幼儿消化 TM 各阶段的酸溶性肽含量都低于相应阶段的模拟成人消化 TM 的肽含量(图 1d)。综合水解度试验结果显示成人消化液中的 TM 酶解水平比婴幼儿酶解水平高, 因此其消化产物的水解度和肽含量也比婴幼儿消化产物高。



注: AGD60/120. 成人胃相消化 60/120 min; AGID120/240. 成人肠相消化 120/240 min; IGD60/120. 婴幼儿胃相消化 60/120 min; IGID120/240. 婴幼儿肠相消化 120/240 min; 不同小写字母表示不同组别之间的显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 体外模拟胃、肠消化 TM 水解度和多肽质量浓度

Fig.1 The hydrolysis degree and polypeptide mass concentration of tropomyosin in simulated gastric and intestinal digestion *in vitro*

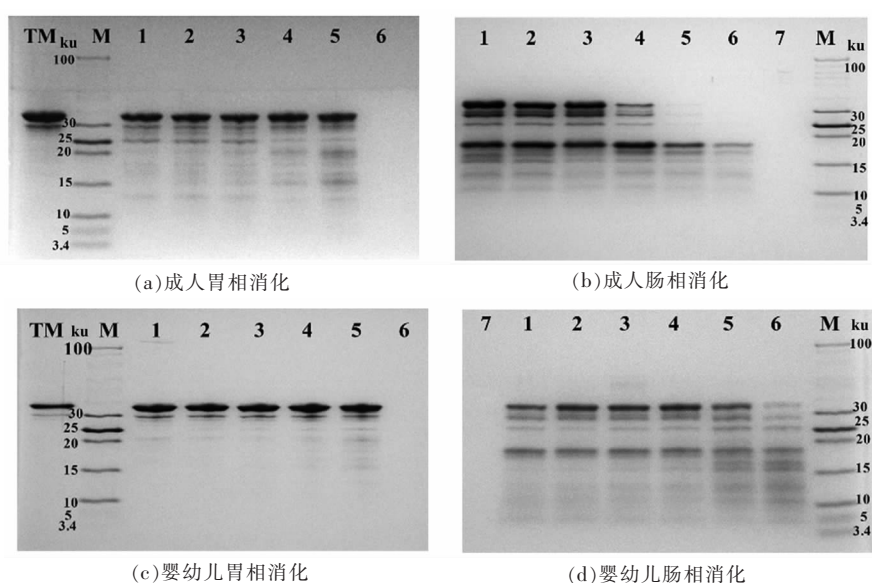
2.2 TM 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定

模拟成人胃消化试验发现 0 min 样品中出现消化片段, 可能是胃蛋白酶与 TM 接触后迅速发生了酶解^[17]。随着消化的进行, 消化片段的灰度值

升高, 即相应分子质量的消化产物含量增加, 且消化片段分布也更加丰富。消化进行到 120 min 后, 消化产物片段主要集中在 15~20 ku 和 30 ku 左右(图 2a); 模拟成人肠消化 0 min 结果与胃消化类

似,这可能是由于肠消化液中的肠蛋白酶与TM的胃消化产物接触发生了进一步的酶解作用^[17-18]。随着消化的进行,消化片段增加,其灰度加深,消化产物主要集中在15~20 ku和25~30 ku之间。此外,25~30 ku的消化片段在90 min时明显减弱,到120 min后基本消失。15~20 ku的消化产物也随着消化时间延长而逐渐减少(图2b)。模拟婴幼儿胃消化的消化片段明显比成人少且灰度值更低,说明婴幼儿胃消化程度明显低于成人,可能是由于模拟婴幼儿胃消化液的胃蛋白酶含量较成人

少(图2c)。在胃消化的基础上模拟婴幼儿肠消化过程发现TM被进一步消化成小片段肽,到240 min时30 ku的大片段基本被消化,出现大量小片段肽。与成人肠消化相比,婴幼儿肠消化240 min后仍存在较多20 ku以上的消化片段(图2d),这可能是导致婴幼儿比成人更容易对虾类过敏的物质基础之一。综合模拟成人、婴幼儿胃肠消化电泳图分析,表明体外模拟成人胃-肠-BBM酶模型完整消化TM的能力比婴幼儿高。



注:TM. 原肌球蛋白;M. Marker;a和c图中1~6泳道分别是胃消化0,30,60,90,120 min和PBS;b和d图中1~7泳道分别是肠消化0,30,60,90,120,240 min和PBS。

图2 体外模拟胃、肠消化产物的Tricine-SDS-PAGE图

Fig.2 Tricine-SDS-PAGE image of simulated gastric and intestinal digestion products *in vitro*

2.3 消化产物组分分析

体外模拟成人胃、肠消化产物和未消化产物的RP-HPLC色谱结果如图3所示。TM未消化时的出峰时间在53 min左右,且基本呈单峰,这说明完整的TM极性较大,纯度较高。随着模拟成人胃消化的进行,峰值降低且峰形变宽,结合Tricine-SDS-PAGE结果分析得出:绝大多数的TM在胃消化液中未被消化,仅少部分TM被消化成小片段分子,这些片段的色谱峰出现在20 min左右。模拟成人肠消化60,120,240 min的色谱峰与胃消化阶段相比发生了显著改变,其中完整的TM最高色谱峰消失,40 min以内色谱峰数量以及峰面积占比同时增加,且TM在56 min左右出现

新的组分峰。

体外模拟婴幼儿胃、肠消化产物和未消化产物的RP-HPLC色谱结果如图4所示。模拟婴幼儿胃消化60 min和120 min时的色谱峰峰形相似,TM在53 min左右的峰值下降且峰形变宽,而婴幼儿胃消化产物在20 min左右不存在明显的吸收峰。模拟婴幼儿肠消化产物中TM最高特征峰消失,而40 min以内色谱峰数量增加,56 min出现新的组分峰。比较成人和婴幼儿肠消化产物色谱结果发现,婴幼儿肠消化产物在40 min以内的色谱峰峰值明显小于成人,这可能是由于同一消化时间内婴幼儿肠消化TM程度远远小于成人,该结果与Tricine-SDS-PAGE结果相符合。

2.4 消化酶对 TM 消化产物分子质量的影响

2.4.1 胃相消化对 TM 15~30 ku 和 10~15 ku 消化产物分子质量的影响 SDS-PAGE 电泳分析体外模拟胃消化 TM 终产物的消化片段主要集中在 15~30 ku 和 10~15 ku 范围,因此本试验选择用质

谱仪分析这 2 个范围内胃消化产物的分子质量变化^[9]。对 15~30 ku 范围内的胃消化产物分析显示,成人胃消化产物主要集中在 15~20 ku, 吸收峰数量多,20.8 ku 左右吸收峰峰值最高。此外,在 23.7,25.0,26.8,28.8 ku 位置也出现了明显的吸收

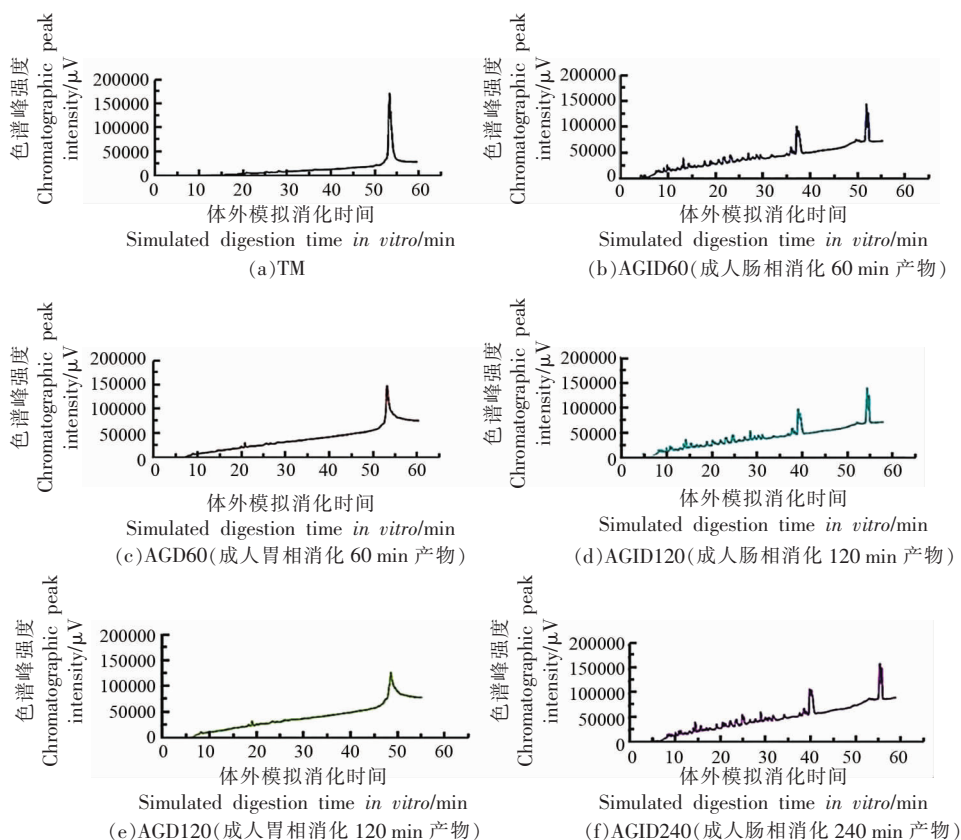
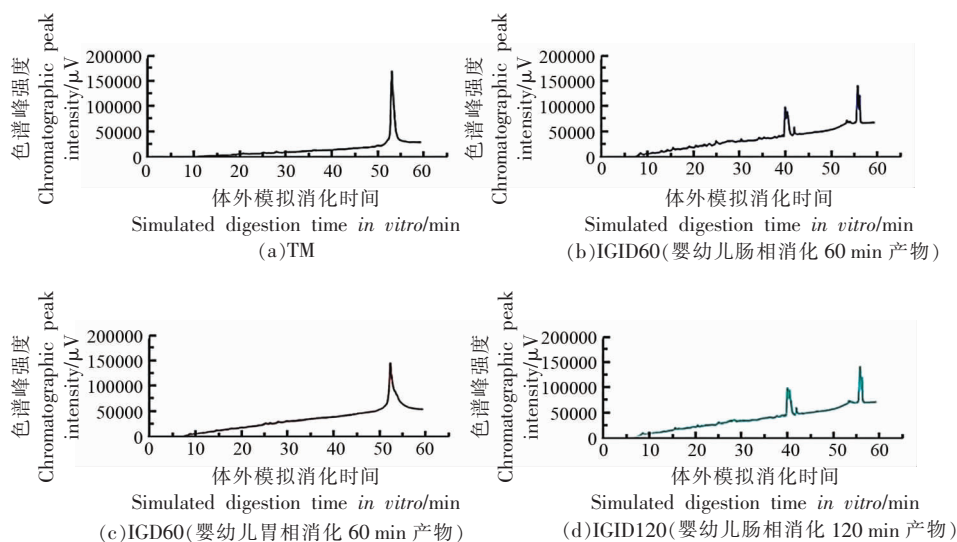


图 3 体外模拟成人胃、肠消化产物的 RP-HPLC 色谱图

Fig.3 RP-HPLC chromatogram of simulated adult gastrointestinal digestion products *in vitro*



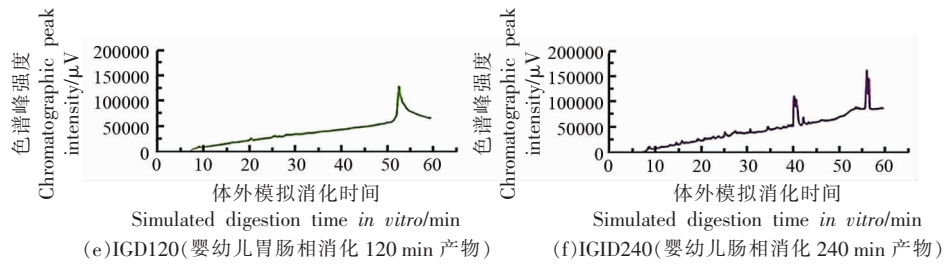


图4 体外模拟婴幼儿胃、肠消化产物的RP-HPLC色谱图

Fig.4 RP-HPLC chromatogram of simulated infants gastrointestinal digestion products *in vitro*

峰(图5a)。婴幼儿胃消化产物谱图也主要集中在15~20 ku范围,吸收峰较多,肽段数量多,而肽段得分布不如成人的广泛,这说明了模拟婴幼儿胃消化对TM的消化能力较成人更弱(图5b)。对10~15 ku范围内胃消化产物分析显示,成人胃消

化产物片段相比婴幼儿更丰富。其中成人消化产物在10.1,11.1,12.5,13.5,14.4 ku均有分布(图5c),而婴幼儿则集中在10,13.2~14.3 ku范围,并且相应的峰强度也较成人高(图5d)。

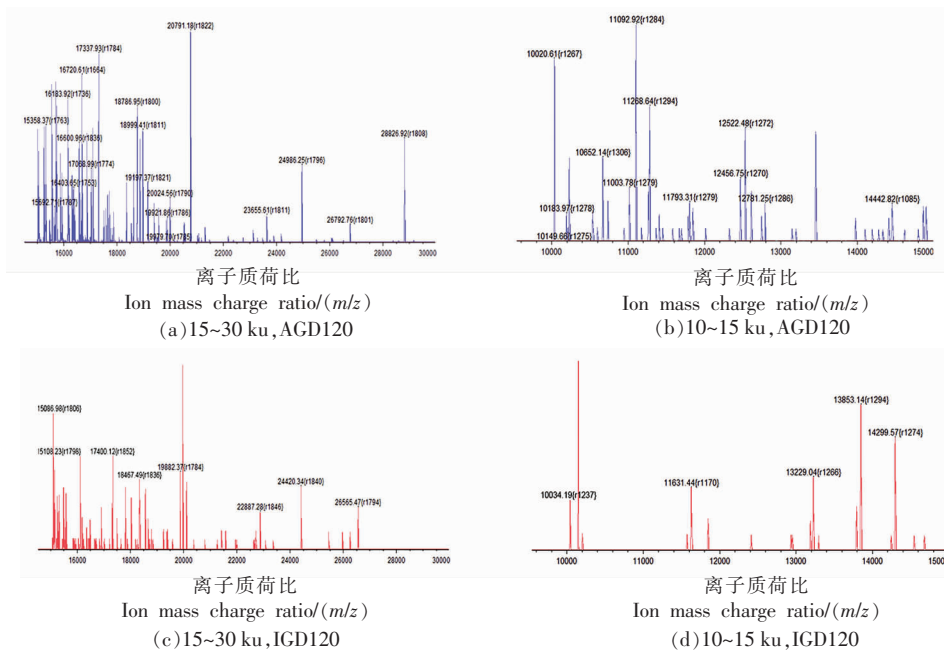


图5 15~30 ku和10~15 ku的胃相模拟消化物质谱图

Fig.5 Mass spectra of gastric phase simulated digestion products at 15~30 ku and 10~15 ku

2.4.2 肠相消化对TM 10~20 ku和0.5~3.5 ku消化产物分子质量的影响 SDS-PAGE电泳分析体外模拟肠消化TM终产物的消化片段主要集中在10~20 ku和0.5~3.5 ku,因此本试验选择用质谱仪分析这2个范围内肠消化产物的分子质量变化^[9]。在10~20 ku范围内肠消化产物分析显示,成人肠消化产物在120 min时的消化片段主要集中

在10~20 ku,且消化的相对强度较高,而在在240 min时,该范围内的质谱峰数量相比120 min时减少(图6a和6b)。婴幼儿肠消化片段相对强度较成人更大,且随着消化的进行,消化片段增加,尤其是16~18 ku的消化片段显著增加(图6c和6d)。在0.5~3.5 ku范围内对肠消化产物的分析显示,成人和婴幼儿肠消化120 min的产物均有许多片

段集中在 0.5~1.0 ku 范围。然而,在 240 min 时开始出现显著差异,其中成人肠消化产物在该范围内质谱峰数量增加,相对强度增强(图 6e 和 6f),

而婴幼儿则出现更丰富的肽段,同时 1.1,1.3,1.9 ku 的丰度增加,这说明更大分子质量的蛋白质被肠蛋白酶酶解成该范围内的短肽(图 6g 和 6h)。

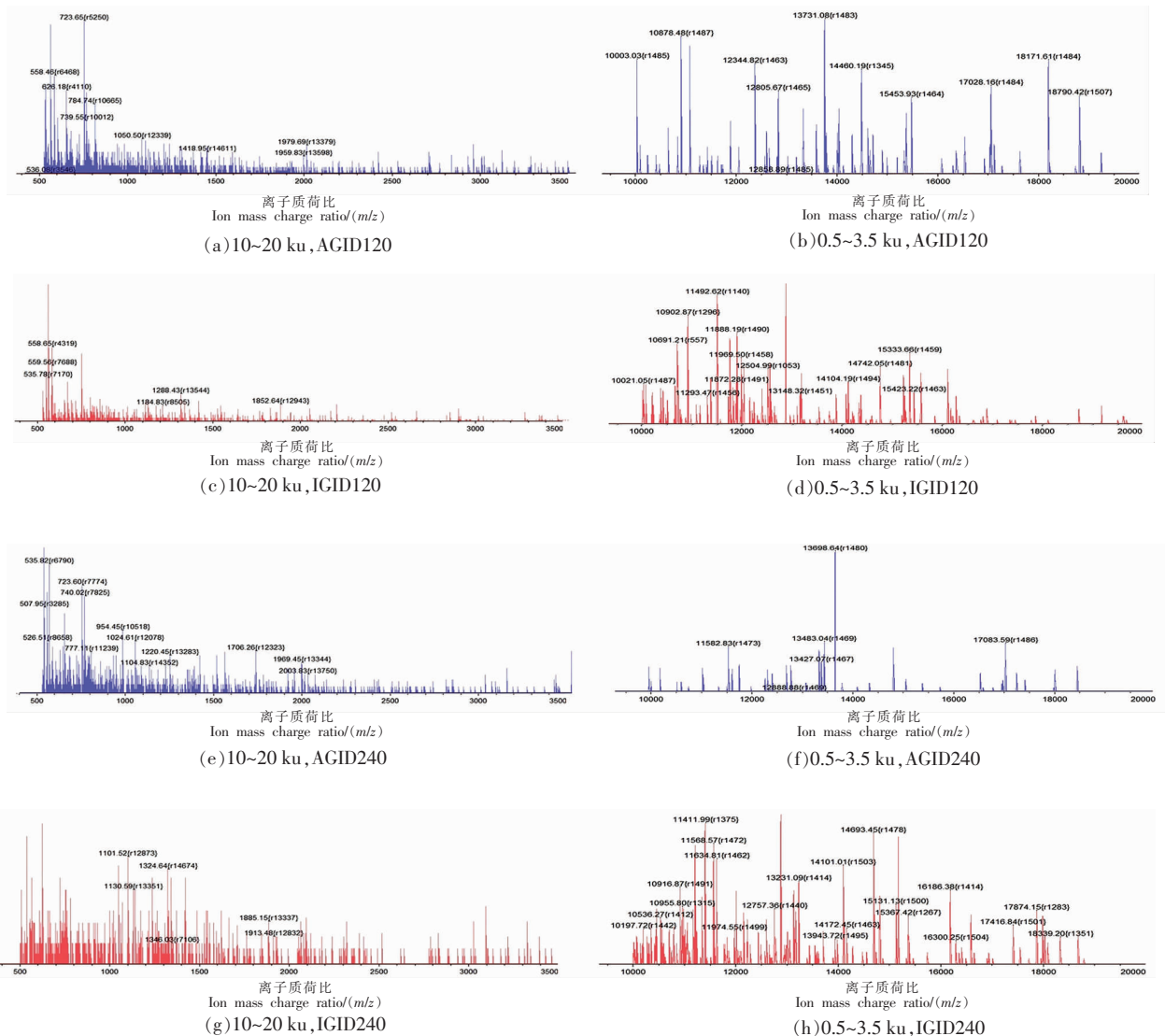


图 6 10~20 ku 和 0.5~3.5 ku 的肠相模拟消化产物质谱图

Fig.6 Mass spectra of intestinal phase simulated digestion products at 10~20 ku and 0.5~3.5 ku

3 讨论

TM 是甲壳类动物中的主要致敏成分,约有 284 个氨基酸残基组成^[20],分子质量为 34~38 ku,仅作为二聚体发挥功能。TM 具有耐高温,热稳定性较强,不易被胃蛋白酶或胰蛋白酶消化的特点^[21]。纪乃茹^[22]的研究表明 pH 值、消化酶的种类都会影响 TM 的构像,随着溶液中 pH 值的降低,

TM 易发生聚集,形成其它结构的副产物;且消化酶种类不同,TM 的消化稳定性也不相同^[14]。

在本试验中,模拟成人、婴幼儿胃消化 120 min 时 TM 水解度分别为 (17.99±1.41)%,(9.92±1.50)%,低于王学丽等^[23]的研究结果,这可能是两个试验过程中 pH 值不一样造成的^[24]。BBM 酶作为小肠黏膜分泌的肽酶,其在小分子蛋白质和多

肽的水解中发挥了至关重要作用,因而本试验将BBM酶纳入胃肠消化体系对TM的消化稳定性的研究^[13,25-26]。建立了一种以日本沼虾TM为消化对象,体外静态模拟成人、婴幼儿的消化模型。

Poquet等^[27]对婴幼儿和成年人的胃肠生理条件进行了归纳总结,两者主要差异表现在pH值、胃蛋白酶浓度以及胆汁盐浓度3个方面。Dupont等^[28]研究了卵白蛋白和牛奶蛋白在成人和婴幼儿消化液中的消化情况,研究表明,婴幼儿对蛋白的消化能力弱,且消化速度较慢。本试验采用Dupont等^[28]的消化方法对TM进行消化,结果发现其消化片段、水解度和肽浓度都随着消化时间的延长而逐渐升高。体外模拟成人胃消化阶段的消化片段、水解度、肽浓度指标显著高于婴幼儿,两者变化趋势与Dupont等^[28]的研究结果一致。本试验模拟成人和婴幼儿胃消化产物水解度的差异可能是成人和婴幼儿胃消化酶活力的不同造成^[29]。体外模拟肠消化是在胃相消化的基础上进行再消化,包括胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶的模拟小肠消化以及含有BBM酶的小肠黏膜肽酶消化^[26,30]。李慧慧等^[30]的研究表明,在相同的肠消化时间内,成人和婴幼儿对蛋白质消化水平不一,成人相较于婴幼儿肠消化的更彻底。这种现象的出现存在多种可能性,一方面可能是成人胃消化产物中暴露出更多的肠蛋白酶酶切位,有利于肠蛋白酶继续加速酶解;另一方面是成人的肠蛋白酶含量高,相对酶活力更高,有利于TM消化产物的酶解。综上所述:TM能被体外模拟胃肠道消化酶消化成不同大小的肽段,其中TM更易被成人胃肠消化,而婴幼儿对TM的消化能力较弱,该结果与Dupont等^[28]的试验结果一致。

4 结论

日本沼虾TM的水解度和肽浓度都随体外模拟胃肠消化时间的延长而升高,其中由于成人模拟消化液的消化能力更强,蛋白酶酶量较多,TM消化程度更高,因此其消化各个阶段的蛋白质水解度和肽浓度与婴幼儿相比更高。由于BBM酶可以将小肠消化后的肽段进一步降解成小片段,因此增加BBM酶的消化有利于TM的降解。总而言之:体外模拟胃-肠-BBM酶消化试验表明日本沼

虾TM比较耐婴幼儿消化、易被成人消化,且体外消化有利于降低虾中TM的消化稳定性。因此,本试验为水产品的致敏性研究提供了科学依据,有助于虾类过敏患者安全膳食管理,具有潜在的经济和社会效益。

参 考 文 献

- [1] 胡志和. 虾类过敏原及消减方法研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 319-323.
HU Z H. Research progress on shrimp allergens and reduction methods[J]. Food Science, 2013, 34(1): 319-323.
- [2] RUETHERS T, TAKI A C, JOHNSTON E B, et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens[J]. Mol Immunol, 2018, 100: 28-57.
- [3] 韩建勋. 高静压处理对虾原肌球蛋白致敏性及结构变化规律研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
HAN J X. Study on the sensitization and structural changes of shrimp tropomyosin under high static pressure treatment[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.
- [4] BURNEY P, SUMMERS C, CHINN S, et al. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: A EuroPrevall analysis[J]. Allergy, 2010, 65(9): 1182-1188.
- [5] LEE C H, WU C C, TYAN Y C, et al. Identification of pyruvate kinase as a novel allergen in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by specific-IgE present in patients with shrimp allergy[J]. Food Chemistry, 2018, 258: 359-365.
- [6] 李振兴, 林洪, 李明华, 等. 不同虾类的过敏原及其过敏原性[J]. 水产学报, 2006(2): 281-284.
LI Z X, LIN H, LI M H, et al. Allergens of different shrimp and their allergenicity[J]. Journal of Fisheries, 2006(2): 281-284.
- [7] COSTA J, VILLA C, VERHOECKX K, et al. Are Physicochemical properties shaping the allergenic potency of animal allergens? [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2022, 62(1): 1-36.
- [8] KHORA S S. Seafood-associated shellfish allergy: A comprehensive review[J]. Immunol Invest, 2016, 45(6): 504-530.

- [9] ZHANG Z Y, ZHANG X F, CHEN W, et al. Conformation stability, *in vitro* digestibility and allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Exopalaemon modestus*) as affected by high intensity ultrasound[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 997–1009.
- [10] FANG L, LI G M, GU R Z, et al. Influence of thermal treatment on the characteristics of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(14): 5322–5328.
- [11] 向钱, 张馨, 王伟, 等. 食物蛋白质消化稳定性和热稳定性研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(1): 53–56.
- XIANG Q, ZHANG X, WANG W, et al. Study on digestive stability and thermal stability of food protein[J]. Health Research, 2009, 38(1): 53–56.
- [12] MENARD O, BOURLIEU C, DE OLIVEIRA S C, et al. A first step towards a consensus static *in vitro* model for simulating full-term infant digestion [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 338–345.
- [13] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991–1014.
- [14] DING R, ZHANG M H, ZHU Q M, et al. Curcumin loaded Zein-alginate nanogels with ‘core-shell’ structure: Formation, characterization and simulated digestion[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 251: 126201.
- [15] 周启, 杨帆, 傅斯琪, 等. 市售婴幼儿乳粉中乳清蛋白的胃肠消化稳定性及其抗原性评估[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 45–51.
- ZHOU Q, YANG F, FU S Q, et al. Evaluation of antigenicity changes of whey protein in commercially available infant milk powder after simulated gastrointestinal digestion *in vitro* [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(4): 45–51.
- [16] EL S N, KARAKAYA S, SIMSEK S, et al. *In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides[J]. Food & Function, 2015, 6(7): 2322–2330.
- [17] 王静, 李春, 曲国强, 等. OPO 结构脂在模拟婴儿胃肠道消化环境中脂肪酸的释放特性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 39–47.
- WANG J, LI C, QU G Q, et al. The release characteristics of OPO structural lipids in the simulated gastrointestinal digestive environment of infants [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 39–47.
- [18] 卢玲, 翁晨, 邓泽元, 等. 乳脂肪聚集对其消化吸收及脂质代谢的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(6): 140–146.
- LU L, WENG C, DENG Z Y, et al. Effects of milk fat accumulation on its digestion, absorption and lipid metabolism[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(6): 140–146.
- [19] 钱兢菁, 郑淋, 赵谋明. 酪蛋白体外消化过程中 DPP-IV 抑制活性的变化规律及其机制分析[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 186–193.
- QIAN K J, ZHENG L, ZHAO M M. Analysis of the changing patterns and mechanisms of DPP-IV inhibitory activity during *in vitro* digestion of casein [J]. Food Science, 2020, 41(15): 186–193.
- [20] BAI T L, HAN X Y, LI M S, et al. Effects of the Maillard reaction on the epitopes and immunoreactivity of tropomyosin, a major allergen in *Chlamys nobilis*[J]. Food & Function, 2021, 12(11): 5096–5108.
- [21] 林娜, 马德蓉, 刘志东, 等. 南极磷虾主要过敏原的分离纯化及性质研究[J]. 水产学报, 2022, 46(3): 445–456.
- LI N, MA D R, LIU Z D, et al. Isolation, purification and properties of major allergens from *Euphausia superba*[J]. Journal of Fisheries, 2022, 46(3): 445–456.
- [22] 纪乃茹. 皱纹盘鲍原肌球蛋白的结构特性与致敏性消减研究[D]. 厦门: 集美大学, 2022.
- JI N R. Study on the structural properties and allergenicity reduction of tropomyosin from *Haliotis*[D]. Xiamen: Jimei University, 2022.
- [23] 王学丽, 李娅茹, 王梦梦, 等. 体外模拟胃液消化对虾中主要过敏原原肌球蛋白抗原表位的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(19): 2319–2325.
- WANG X L, LI Y R, WANG M M, et al. Effects of simulated gastric juice digestion in shrimp on tropomyosin epitopes of major allergens [J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(19): 2319–2325.
- [24] 游义娇. 小麦面饅的制备及静态模拟消化对麸质蛋白的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- YOU Y J. Preparation of wheat flour naan and effect of static simulated digestion on gluten protein [D].

- Nanchang: Nanchang University, 2017.
- [25] 王靖舒, 佟平, 陈红兵, 等. 鸡蛋卵转铁蛋白过敏原的体外模拟消化特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 17-29.
- WANG J S, TONG P, CHEN H B, et al. *In vitro* simulated digestion characteristics of egg ovotransferrin allergen[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 17-29.
- [26] PICARIELLO G, FERRANTI P, ADDEO F. Use of brush border membrane vesicles to simulate the human intestinal digestion[J]. Food Research International, 2016, 88: 327-335.
- [27] POQUET L, WOOSTER T J. Infant digestion physiology and the relevance of *in vitro* biochemical models to test infant formula lipid digestion [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 60(8): 1876-1895.
- [28] DUPONT D, MANDALARI G, MOLLE D, et al. Comparative resistance of food proteins to adult and infant *in vitro* digestion models[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(6): 767-780.
- [29] 杨帆. 体外静态模拟胃肠消化牛乳蛋白及转运吸收产物致敏性的评估[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- YANG F. Simulating static gastrointestinal digestion of milk protein *in vitro* and allergenicity evaluation of transported milk digestive peptides[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [30] 李慧慧, 佟平, 武涌, 等. 卵转铁蛋白消化稳定性及消化产物致敏性分析[J]. 食品科技, 2019, 44(7): 67-74.
- LI H H, TONG P, WU Y, et al. Analysis of digestive stability of ovotransferrin and allergenicity of digestion products[J]. Food Technology, 2019, 44(7): 67-74.

Comparison of Stability of *Macrobrachium nipponense* Tropomyosin in Simulated Gastrointestinal Digestion

CEHN Jiao^{1,2,3}, HUA Xiwei^{1,2,3}, LIU Xin^{1,2,3}, ZHENG Shuangyan², CHEN Hongbing^{1,2}, XIE Yanhai^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047

²Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047

³College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract In order to compare the effects of gastric and intestinal digestion on the digestive stability of *Macrobrachium nipponense* in adults and infants, static digestion models of adult and infants were constructed to digest tropomyosin (TM) *in vitro*. Then, Tricine-SDS-PAGE, RP-HPLC and MALDI-TOF-MS were used to determine the degree of hydrolysis of TM, the concentration of acid-soluble peptide and the molecular weight distribution of digestive products in stomach and intestine after the simulated digestion *in vitro*. The results showed that the hydrolysis degree of TM in the final stage of gastric digestion in simulated adults and infants was (17.99±1.41)% and (49.46±1.02)%, respectively. The degrees of TM hydrolysis in the final stage of intestinal digestion in simulated adults and infants were (9.92±1.50)% and (30.68±1.04)%, respectively. The mass concentrations of acid-soluble peptides at the final stage of gastric digestion in simulated adults and infants were (74.77±6.84) μg/mL and (46.39±7.5) μg/mL, respectively. The mass concentrations of acid-soluble peptides at the final stage of intestinal digestion in simulated adults and infants were (303.99±12) μg/mL and (175.93±11.53) μg/mL, respectively. In the final stage of simulated adult stomach and intestine digestion, the digestive fragments of TM were mainly distributed in the range of 15-30 ku and below 20 ku, while the final digestive fragments of simulated infant stomach and intestine were mainly macromolecules, mainly above 20 ku, indicating that the digestive capacity of adult simulated digestive fluid was stronger than that of infant simulated digestive fluid. TM was easily digested by adults, while infants and young children had incomplete digestion of TM, which might be more likely to cause allergic reactions. The difference in gastrointestinal digestion between adults and infants might be due to the fact that adults had a sound digestive system, while infants had less developed gastrointestinal function and low amount of digestive enzymes

Keywords adult allergy; infant allergy; tropomyosin; simulated gastrointestinal digestion *in vitro*; digestive stability