

鱼类过敏原缓释微球的制备及释放动力学的初步研究

孙 妙, 李振兴*, 曲 欣, 林 洪, 吴丽莎

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为制备一种能够缓慢释放的鱼类过敏原——小清蛋白的海藻酸钠微球, 采用离子凝胶法制备出形态完好的海藻酸钠-小清蛋白微球, 利用傅里叶红外光谱、差式扫描量热法、扫描电子显微镜等对其结构进行表征, 并初步探究微球中小清蛋白在模拟肠液 pH 环境中的释放动力学参数。测得海藻酸钠对小清蛋白的包埋率为 69.24%, 蛋白装载率为 21.06%, 微球表面粗糙并分布有大量的微小孔洞, 体外释放实验测得前 5 h 小清蛋白释放迅速, 而后逐渐达到最大值, 其释放动力学符合 Higuchi 模型和 Ritger-Peppas 模型。结果表明, 海藻酸钠可以作为包埋小清蛋白的载体并实现小清蛋白的缓慢释放, 其释放机理符合骨架溶蚀蛋白扩散机制。

关键词: 过敏原; 海藻酸钠; 缓释; 动力学

中图分类号: R 392.8; S 917.4

文献标志码: A

食物过敏的发病率越来越高, 目前尚没有安全有效的治疗手段, 如何通过食物的手段缓解过敏症状一直是食品工业界关注的热点, 其中通过过敏原缓释技术, 使得抗原持续小剂量刺激机体免疫系统, 从而使机体产生免疫耐受是一种重要的途径^[1]。

能够产生缓释效果的材料很多, 海藻酸钠(sodium alginate)以其安全、能够耐受胃液的低 pH 消化等特点, 越来越引起研究者的关注。海藻酸钠是由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古洛糖醛酸(G)所形成的不规则聚合物, 其结构中的古洛糖醛酸可交联二价或三价阳离子形成凝胶微球。微球具有 pH 敏感性, 在小肠的微碱性环境中形成的一价盐可以慢慢溶解, 包埋物质可获得比胃中高许多的释放速率。它的胶凝环境温和, 不影响包埋物质活性, 经口服海藻酸钠微球可以运送包埋物质顺利通过胃部进入肠道缓慢释放^[2-4]。

作为八大类容易引起过敏反应的食物之一, 鱼类及其制品是引起成年人过敏的主要食物, 其主要过敏原是肌浆蛋白中的小清蛋白^[5-7], 广泛存在于各种鱼类, 分子量为 10~14 ku, 等电点为 3.9~

5.5, 具有热稳定性好、抗加工能力强等特点。本实验以海藻酸钠为壁材, 小清蛋白为芯材, 制备海藻酸钠-小清蛋白微球, 对其形态结构进行表征, 并初步探讨其体外控制释放效果及释放动力学参数。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

实验材料 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 购于烟台开发区天源水产有限公司, 冰鲜品; 海藻酸钠(上海国药化学试剂有限公司); 96 孔酶标板(美国 Costar); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 青岛福林生物化学公司); 二硫苏糖醇(DTT, Solarbio 公司); 十二烷基硫酸钠(SDS, 山东爱博科技贸易公司); 大菱鲆小清蛋白兔多克隆抗体为实验室自制; 精确蛋白分子量标准(加拿大 Fermentas 公司)。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

实验仪器 DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂); FD1 型冷冻干燥机(丹麦 Heto 公司); JSM-840 扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司); DSC200PC 示差扫描量热计(德国 NETZSCH 公司); FW-4A 型粉末压片机(天津拓普仪器有限公司); iS10-Thermo

收稿日期: 2012-04-01

修回日期: 2012-08-28

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-50); 长江学者和创新团队发展计划项目

通讯作者: 李振兴, E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

傅立叶红外光谱仪(美国 NICOLET 公司); HL-2S 恒流泵(上海沪西仪器分析厂)。

1.2 小清蛋白提取、纯化与鉴定

小清蛋白提取方法为实验室前期研究成果, 参照文献[8-9]的方法并作如下改进: 取大菱鲆鱼肉, 加入 2 倍体积提取液(Tris 0.1 mol/L, Gly 0.5 mol/L, DTT 1 mmol/L), 置于 45 °C 的水浴振荡器中抽提过夜, 8 000 r/min 离心取上清, 100 °C 水浴 30 min 后, 4 000 r/min 离心取上清, 分别用饱和度 55%、90% 的硫酸铵分级沉淀, 离心收集上清液透析。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对蛋白纯度进行确定。电泳完成后采用免疫印迹试验, 对大菱鲆过敏原的免疫活性进行定性检测, 转印膜以 ECL 蛋白印迹底物孵育 1 min 后, 在凝胶成像仪中曝光 15 min 成像。鉴定完成的蛋白溶液真空冷冻干燥成蛋白粉-20 °C 保存备用。

1.3 海藻酸钠-小清蛋白微球的制备

参照文献[10]的方法并进行如下改进: 将 9 mL 小清蛋白溶液和 6 mL 5% 海藻酸钠溶液共混均匀, 得到 15 mL 海藻酸钠-小清蛋白样液(小清蛋白终浓度为 5 mg/mL)。在 25 °C 低速搅拌条件下, 利用医用 0.45 mm 注射器针头将海藻酸钠-小清蛋白混合液滴加到 100 mL 10%(w/v)氯化钙溶液中进行交联反应, 待样液滴入完全, 收集微球, 用双蒸水清洗后真空干燥至恒重。

1.4 小清蛋白包埋率、装载率的确定

制备完成后, 采用 BCA 法^[11]测定 CaCl₂ 溶液中小清蛋白含量, 计算未包埋进入微球的蛋白质量, 通过差减法得到微球中的蛋白质量。按照下式计算小清蛋白包埋率(*E*)、装载率(*L*):

$$E = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

$$L = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100\%$$

式中, *m*₀ 为海藻酸钠-小清蛋白微球总质量, *m*₁ 为海藻酸钠中添加的小清蛋白质量, *m*₂ 为 CaCl₂ 溶液中小清蛋白质量。

1.5 微球形态表征

经干燥处理后的海藻酸钠微球在 15 kV 电压下喷金后利用 JSM-840 扫描电子显微镜(SEM)成像, 观察海藻酸钠微球表面形态。

1.6 红外光谱测定结构

微球经五氧化二磷真空干燥 24 h, 经溴化钾压片后用 NICOLET iS10-Thermo 傅立叶变换红外光谱仪以分辨率 4 cm⁻¹、扫描波数范围 4 000~400 cm⁻¹ 进行红外光谱测定, 消除溴化钾背景及水蒸气、二氧化碳干扰。

1.7 微球晶体结构测定

取干燥微球约 15 mg 于坩埚密封, 在氮气保护条件下于 200PC 型示差扫描量热计测量包埋小清蛋白后海藻酸钠的骨架结构变化。升温速度为 10 °C/min, 升温范围 30~250 °C。

1.8 模拟肠液环境的体外释放实验

为了准确模拟小清蛋白在肠液中的释放规律, 本实验采用肠液 pH 为外界环境, 研究小清蛋白在模拟肠液环境中的释放行为。称取 50 mg 干燥后微球置于小三角瓶中, 添加 4 mL pH 7.4 磷酸缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS), 37 °C 下以 60 r/min 振荡水浴, 定时取出一定量浑浊液离心后上清测定蛋白含量, 同时添加等量新鲜 PBS 溶液, 以 BCA 法得各时间点累积蛋白释放量 *R*_{*i*}:

$$R_i = \frac{m_i}{m_0} \times 100\%$$

式中, *R*_{*i*} 为在 *i* 时刻微球蛋白释放率, *m*_{*i*} 为在 *i* 时刻溶液中累积蛋白量。

以常见的动力学模型对释放曲线 5 h 内结果进行拟合, 寻找描述蛋白释放的最佳模型, 包括:

零级动力学模型: $Q=at+b$

一级动力学模型: $\ln(1-Q)=at+b$

Higuchi 模型: $Q=at^{1/2}+b$

Ritger-Peppas 模型: $\ln Q=a \ln t+b$

式中, *Q* 为累积释放率, *t* 为释放时间, *a*、*b* 分别为方程的斜率与截距, 为了确定 Ritger-Peppas 模型中时间项的指数 $n(n=a)$, 释放曲线的 $Q < 0.6$ 部分才能用于计算。根据所得方程的相关系数 *R*², 讨论方程拟合的优劣顺序。

2 结果

2.1 大菱鲆过敏原提取、纯化与鉴定

过敏原提取、纯化方法为实验室前期研究成果, 本次大量提取小清蛋白粉并鉴定其纯度。图 1-a 为大菱鲆小清蛋白提取的纯化蛋白电泳图, 条带清晰, 分子量为 12 ku, 无杂质条带。图 1-b 为以兔抗

大菱鲂小清蛋白的多克隆抗体为一抗的免疫印迹图, 纯化的蛋白与抗体有显著特异性结合, 鉴定为小清蛋白。

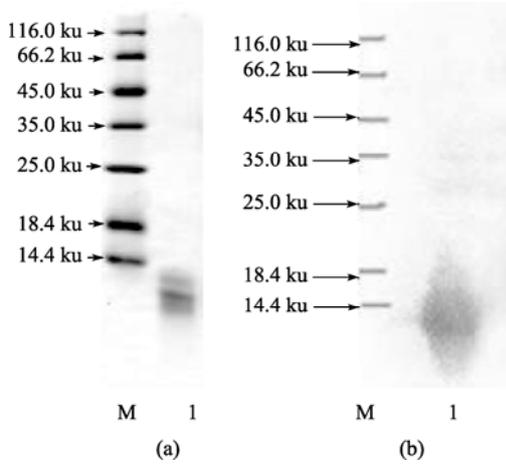


图 1 大菱鲂小清蛋白提取液的 SDS-PAGE 分析(a)和兔抗大菱鲂小清蛋白免疫印迹(b)

M. 蛋白分子量标准; 1. 大菱鲂。

Fig. 1 SDS-PAGE of parvalbumin extracts from turbot (a) and rabbit anti-turbot parvalbumin Western-blotting (b)

M. protein marker; 1. turbot.

2.2 包埋率、装载率测定

BCA 法测得以海藻酸钠包埋小清蛋白的包埋

率为 69.24%, 装载率为 21.06%, 表明海藻酸钠包埋蛋白效果良好。

2.3 形态表征

两种海藻酸钠微球整体球形良好, 平均直径均约为 700 μm, 包埋蛋白未对微球大小造成影响, 微球表面均有颗粒状物质存在, 比较观察微球表面放大图可见, 海藻酸钠-小清蛋白微球表面出现了大量微小孔洞(图 2)。

2.4 红外光谱测定

红外光谱对海藻酸钠微球、海藻酸钠-小清蛋白微球、小清蛋白的结构进行测定, 结果如图 3 所示。海藻酸钠中含有大量羟基, 游离羟基形成的峰型非常尖锐, 峰值在 3 641~3 610 cm⁻¹, 图 3-a 在 3 431 cm⁻¹ 处显示出强而宽的吸收峰, 说明海藻酸钠在成球过程中 O-H 形成氢键发生了缔合, 因为当 O-H 形成分子内或分子间氢键时, O-H 伸缩振动频率向低频移动, 且谱带变宽^[12-13], -COO 的反对称振动和对称振动的吸收峰分别位于 1 617、1 421 cm⁻¹, 前者强且宽; 图 3-c 小清蛋白谱图在 3 304 cm⁻¹ 处显示出 O-H、N-H 的强且宽的伸缩振动峰, 在 1 657、1 542 cm⁻¹ 处显示出酰胺 I 带和 II 带的振动伸缩峰, 其中 1 657 cm⁻¹ 是蛋白的特征峰; 图 3-b

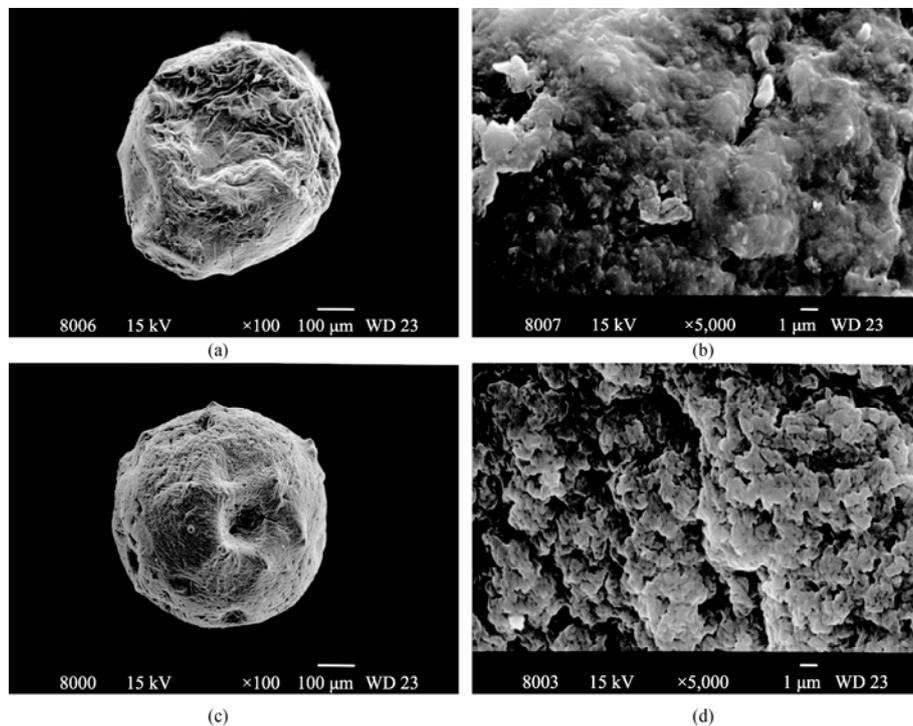


图 2 海藻酸钠微球扫描电镜图

海藻酸钠微球:a. 整体; b. 表面。海藻酸钠-小清蛋白微球:c. 整体; d. 表面。

Fig. 2 SEM micrograms of alginate beads

Alginate beads :a. entirety ; b. surface. Alginate-parvalbumin beads :c. entirety ; d. surface.

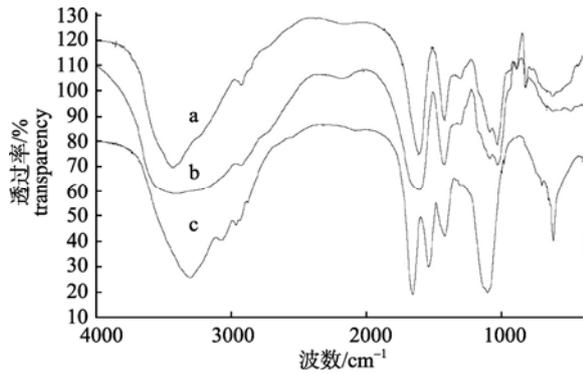


图 3 海藻酸钠微球红外光谱图

a. 海藻酸钠微球; b. 海藻酸钠-小清蛋白微球; c. 小清蛋白。

Fig. 3 FTIR spectra of alginate beads

a. alginate beads; b. alginate-parvalbumin beads; c. parvalbumin.

海藻酸钠-小清蛋白微球谱图显示位于 $3\ 430\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰由于海藻酸钠 O-H、蛋白 N-H 伸缩振动峰的重叠而使此处的峰更强且宽, $1\ 617\ \text{cm}^{-1}$ 处峰明显变宽且强, 这是海藻酸钠-COO 反对称振动与蛋白酰胺 I 带振动共同作用的结果, 但没有 $1\ 542\ \text{cm}^{-1}$ 处小清蛋白酰胺 II 带的振动伸缩峰。

2.5 热力学分析

微球在 $200\ \text{°C}$ 之前均无明显放热峰, 此过程主要为海藻酸钠内结合水的失去^[14], 在 $210\ \text{°C}$ 时则呈现一较强放热峰(图 4), 该过程为海藻酸钠裂解成为较为稳定的中间产物, 对应海藻酸钠骨架的断裂, 相邻羟基以水分子的形式脱去^[15]。海藻酸钠-小清蛋白微球的 T_g 较空白海藻酸钠发生了右偏移, 表明小清蛋白分散于海藻酸钠基质中, 影响了海藻酸钠的骨架结构, 分子链内旋转位阻增加, 柔顺性降低, 因而 T_g 升高。

2.6 模拟肠液环境的体外释放实验

微球在前 5 h 小清蛋白释放迅速, 5 h 后蛋白释

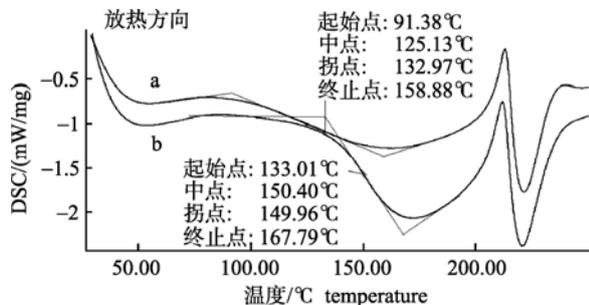


图 4 海藻酸钠微球 DSC 图谱

a. 海藻酸钠微球; b. 海藻酸钠-小清蛋白微球。

Fig. 4 DSC thermograms of alginate beads

a. alginate beads; b. alginate-parvalbumin beads.

放缓慢并逐步接近释放最大值, 蛋白在 24 h 内基本释放完毕, 最大释放率为 61%(图 5)。表明海藻酸钠微球包埋蛋白有一定的缓释效果, 但蛋白释放并不均匀, 前 5 h 蛋白释放过于迅速, 5 h 后的释放量较少, 且有部分蛋白未释放。

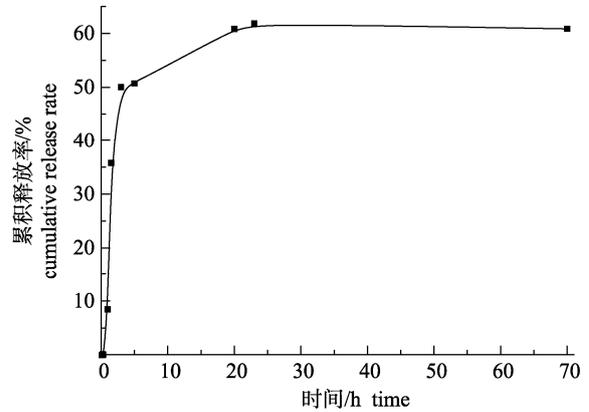


图 5 海藻酸钠-小清蛋白微球蛋白释放曲线

Fig. 5 Protein release curve of alginate-parvalbumin beads

以零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 释放方程及 Ritger-Peppas 方程对 5 h 内的释放曲线进行线性拟合(表 1), Higuchi 方程与 Ritger-Peppas 方程拟合结果明显优于其他动力学方程。Higuchi 方程拟合结果优良说明小清蛋白是以蛋白扩散机制从微球中释放; 对于圆球型制剂, Ritger-Peppas 模型指出, 时间项 t 的指数的意义当 $n > 0.85$ 时, 释放机制为骨架溶蚀^[16], 本实验中时间项的指数为 2.026, 同时观察发现释放实验进行不久, 微球即发生严重的溶蚀崩解现象, 到释放率测定完毕时微球骨架已全部溶蚀。

表 1 海藻酸钠-小清蛋白微球释放曲线动力学方程拟合结果

Tab. 1 Kinetics equation curve fitting of protein release from alginate-parvalbumin beads

	a	b	R^2
零级动力学方程	0.121 5	0.009 262	0.834 1
一级动力学方程	-0.194 4	0.028 79	0.898 0
Higuchi 释放方程	0.317 3	-0.134 5	0.942 5
Ritger-Peppas 方程	2.026	-2.979	0.9384

3 讨论

本研究针对鱼类这一容易引起过敏反应的食物, 提取纯化其过敏原——小清蛋白, 经鉴定后以

海藻酸钠作为壁材包埋小清蛋白,包埋率与装载率与喻海琼等^[17]、Pecquet等^[18]相比有增加,这表明海藻酸钠在包埋蛋白效率方面有明显优势,但与BSA^[19]等大分子蛋白相比,分子量较小的小清蛋白包埋率、装载率较低。

本研究用SEM对微球表面微观结构进行观察,包埋蛋白后的微球大小没有受到影响,原因是微球均由注射器针头中挤压出来,其直径取决于针头孔径的大小。而其表面颗粒状物质则是钙离子与水溶性的海藻酸钠反应时,优先与海藻酸钠中古洛糖醛酸以平面二维方式交联产生“蛋格结构”^[12],从而使其表面产生了颗粒状突起。比较明显的变化在于其表大量的微小孔洞,这是蛋白的存在打乱了海藻酸钠的长链排列结构而产生的,孔洞的存在能够促进骨架的溶解,并实现小清蛋白的缓慢释放^[20]。

红外光谱与热力学分析证实,小清蛋白已被包埋进入海藻酸钠微球中,但对红外图谱的分析得到小清蛋白在被包埋进入海藻酸钠内部时与海藻酸钠间可能存在疏水作用力,导致蛋白的空间结构发生改变。这与Leonard等^[19]研究海藻酸钠疏水区域与蛋白质亲水区域间的作用力时得出的结论相符,对微球进行热力学分析也证明小清蛋白在进入海藻酸钠微球时对微球的骨架结构产生了一定影响,小清蛋白在模拟肠液中释放时部分蛋白与微球骨架存在的作用力使其未释放于模拟肠液中,这是小清蛋白蛋白释放率较低的原因。

从刘光明等^[21]的研究可知,小清蛋白在肠液环境中较好的稳定性,环境不会对其免疫原性有影响,因此释放出的蛋白可刺激肠道免疫系统产生特异性免疫应答。体外模拟肠液释放海藻酸钠微球中的芯材可以有效地检验微球的缓释效果,为研究海藻酸钠对小清蛋白的释放机制,进行动力学方程模拟,本研究未添加胰酶,进一步实验可研究微球在完全模拟肠液环境中的释放效果,为释放效果的调节提供理论基础。

本研究证实海藻酸钠对小清蛋白具有一定的缓释作用,但有突释现象,这是因为海藻酸钠亲水性强,凝胶孔径较大,在肠液环境中微球释放速度较快^[22],进一步的实验可调节实验条件以减缓蛋白释放速率,通过添加壳聚糖^[23]、聚赖氨酸等阳离子聚电解质加强海藻酸钠微球的稳固性或对海藻

酸钠进行疏水改性^[24]等手段,实现海藻酸钠包埋率的增加及释放速度的进一步减缓。

动力学拟合推断出小清蛋白在模拟肠液中以骨架溶蚀蛋白扩散行为从微球中释放,但值得注意的是模型方程的释放拟合均不理想,这与张杰^[25]在研究蛋白类药物在海藻酸钠微胶囊中体外释放得到的结论相符,进一步实验可对方程进行改进以得到更好的动力学拟合效果。

参考文献:

- [1] Green T, Burks A. Oral food desensitization[J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2010, 10(6): 391-397.
- [2] 陈云, 罗丽花, 周紫燕, 等. 海藻酸钠/大豆蛋白共混凝胶微球的结构[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2006, 52(4): 396-400.
- [3] Zhang Y, Jia X, Wang L, *et al.* Preparation of ca-alginate microparticles and its application for phenylketonuria oral therapy[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011, 50(7): 4106-4112.
- [4] Zhang Y, Wei W, Lv P, *et al.* Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 77(1): 11-19.
- [5] Beale J E, Jeebhay M F, Lopata A L. Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax*[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(15): 2985-2993.
- [6] Arif S H, Jabeen M, Hasnain A. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2007, 31(1): 121-137.
- [7] Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, *et al.* Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy[J]. *Journal of Immunology*, 2002, 168(9): 4576-4584.
- [8] 吴致静, 李振兴, 金科, 等. 青岛地区常见鱼类过敏原的鉴定及其交叉反应研究[J]. *水产学报*, 2011, 35(10): 1532-1539.
- [9] Van Do T, Hordvik I, Endresen C, *et al.* Characterization of parvalbumin, the major allergen in alaska pollack, and comparison with codfish allergen m[J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(3): 345-353.
- [10] Li S, Wang X, Zhang X, *et al.* Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits[J]. *Journal of Controlled Release*, 2002, 84(3): 87-98.

- [11] Bainor A, Chang L, Mcquade T J, *et al.* Bicinchoninic acid (bca) assay in low volume[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 410(2): 310–312.
- [12] 崔园园, 陈红, 周丰, 等. 海藻酸钠-胰蛋白酶微球的制备及药物释放性能[J]. *复合材料学报*, 2011, 28(2): 117–122.
- [13] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 325–328.
- [14] Said A A, Hassan R M. Thermal decomposition of some divalent metal alginate gel compounds[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1993, 39(3): 393–397.
- [15] 席国喜, 田圣军, 成庆堂, 等. 海藻酸钠的热分解研究[J]. *化学世界*, 2000, 41(5): 254–258.
- [16] Ritger P L, Peppas N A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices[J]. *Journal of Controlled Release*, 1987, 5(1): 37–42.
- [17] 喻海琼, 刘志刚, 国华, 等. 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗舌下含服对哮喘小鼠的治疗作用[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(1): 4–9.
- [18] Pecquet S, Leo E, Fritsché R, *et al.* Oral tolerance elicited in mice by β -lactoglobulin entrapped in biodegradable microspheres[J]. *Vaccine*, 2000, 18(13): 1196–1202.
- [19] Leonard M, De Boisseson M R, Hubert P, *et al.* Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 98(3): 395–405.
- [20] Yao B, Xiong C, *et al.* Hydrophobic modification of sodium alginate and its application in drug controlled release[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33(4): 457–463.
- [21] 刘光明, 黄园园, 蔡秋凤, 等. 淡水鱼类主要过敏原的模拟肠胃液消化[J]. *水产学报*, 2010, 34(07): 1136–1142.
- [22] Liang H, Hong M, Ho R, *et al.* Novel method using a temperature-sensitive polymer (methylcellulose) to thermally gel aqueous alginate as a pH-sensitive hydrogel[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1917–1925.
- [23] 张旭, 顾志鹏, 徐源廷, 等. 氧化海藻酸钠交联壳聚糖载药复合体系的制备及其药物缓释初步研究[J]. *功能材料*, 2011, 42(5): 894–896.
- [24] 熊诚, 倪才华, 李志勇. 海藻酸钠的疏水改性及在药物控释中的应用[J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(5): 638–641.
- [25] 张杰. 蛋白类药物海藻酸盐微胶囊的制备及体外释放行为的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2007.

Study on fish allergen microcapsules and controlled-release kinetics

SUN Miao, LI Zhen-xing*, QU Xin, LIN Hong, WU Li-sha

(Food Safety Laboratory, College of Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The aim is to prepare a kind of sodium alginate microcapsules which could slowly release fish allergens. The spherical alginate microcapsules were prepared by the ionotropic gelation method and the microcapsules were formed by adding sodium alginate into aqueous solution containing calcium chloride. The prepared microcapsules were characterized by FTIR, DSC and SEM methods. The releasing mechanism of parvalbumin from the microcapsules was established based on equation fitting of release kinetics model. Parvalbumin could be embedded into alginate microcapsules. The entrapment efficiency was 69.24% while the loading ratio was 21.06%. The surface of microcapsules which had plenty of tiny holes was rough. The result of protein release *in vitro* showed that parvalbumin released rapidly in the first 5 hours, and then gradually achieved maximum. The release kinetics model suited Higuchi equation and Ritger-Peppas equation well. Fish allergen could be entrapped by sodium alginate, meanwhile allergen controlled-release was achieved. The mechanism fits with skeleton erosion in addition to protein diffusion mechanism.

Key words: allergen; sodium alginate; controlled-release; kinetics

Corresponding author: LI Zhen-xing. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn