

小麦中的过敏原在酱油酿造过程中的降解分析

牟 慧^{1#}, 姜小燕^{2#}, 张彦民³, 王梦莉², 魏芳丽², 高美须^{2*}

(1. 沂水县农业技术推广中心, 沂水 276400; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所/农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室, 北京 100193; 3. 山东巧媳妇食品集团有限公司, 淄博 250101)

摘要: 目的 探究低盐固态酱油酿造过程不同阶段小麦过敏原的变化。**方法** 采用实验室模拟方法酿造低盐固态酱油, 采集酿造过程中的原料小麦面粉和制曲阶段 14、27、36 和 44 h 时的样品, 发酵阶段 5、10、17、24 和 30 d, 灭菌前和灭菌后 12 个样品, 用实验室制备的小麦蛋白的多克隆抗体、免疫球蛋白 G 以及从医院获得的小麦过敏病人血清免疫球蛋白 E 对样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫印迹和酶联免疫测定不同阶段样品的免疫原性。**结果** 经制曲、发酵处理和加热灭菌处理后, 凝胶电泳图中小麦面粉中的蛋白条带逐渐减少甚至消失, 其中制曲阶段变化程度最大。小麦过敏蛋白中的主要组分麦醇溶蛋白和麦谷蛋白在制曲阶段后期免疫印迹条带逐渐消失, 在进入发酵阶段第 5 d 时已完全检测不到免疫印迹条带。酶联免疫实验结果表明, 与未处理小麦面粉样品相比, 制曲、发酵和灭菌等处理过程均会不同程度降低小麦过敏原的抗原性和过敏原性, 在进入发酵阶段的第 24 d 小麦过敏蛋白含量已低于 20 mg/kg, 致敏性基本被消除。**结论** 在实验室模拟低盐固态酱油酿造中, 小麦过敏蛋白的抗原性和过敏原性在制曲、发酵和灭菌等过程均不同程度降低, 其中制曲阶段作用最大, 成品酱油中小麦的致敏性基本被消除。

关键词: 酱油; 小麦; 过敏蛋白; 酿造过程; 降解

Degradation analysis of wheat allergens during the soy sauce brewing process

MOU Hui^{1#}, JIANG Xiao-Yan^{2#}, ZHANG Yan-Min³, WANG Meng-Li²,
WEI Fang-Li², GAO Mei-Xu^{2*}

(1. Agriculture Technology Extension Center of Yishui County, Yishui 276400, China; 2. Institute of Food Science and Technology/Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety Control in Storage and Transport Process, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China; 3. Shandong Qiao Daughter-in-law Food Group Co., Ltd., Zibo 250101, China)

ABSTRACT: Objective To explore the changes of wheat allergens in different stages of the low-salt solid soy sauce brewing process. **Methods** The low-salt solid soy sauce was brewed by a laboratory simulation method. The raw material wheat flour in the brewing process and samples in the preparation stages of 14, 27, 36 and 44 h, the fermentation stages of 5, 10, 17, 24 and 30 d, and the 12 samples before and after sterilization were collected. The

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600900)、国家农业科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2020-IFST)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600900), and the National Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2020-IFST)

#牟慧、姜小燕为共同第一作者

#MOU Hui and JIANG Xiao-Yan are Co-first Authors

*通信作者: 高美须, 副研究员, 主要研究方向为食品过敏蛋白和食品辐照。E-mail: meixugao@263.net

*Corresponding author: GAO Mei-Xu, Associate Professor, Institute of Food Science and Technology/Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety Control in Storage and Transport Process, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, No.2, Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: meixugao@263.net

samples in different stages were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for immunogenicity, using polyclonal antibody of wheat protein prepared in the laboratory, immunoglobulin G and serum immunoglobulin E of wheat allergy patients obtained from a hospital. **Results** After preparation, fermentation and heating sterilization, the protein bands in wheat flour gradually decreased or even disappeared in the gel electrophoresis picture, and the degree of change was the largest in the preparation stage. The western blot bands of gliadin and glutenin, the main components of wheat anaphylaxis proteins, gradually disappeared in the late stage of fermentation stage, and the western blot bands were completely undetectable when entering the 5th day of fermentation stage. The results of enzyme-linked immunosorbent assay showed that compared with untreated wheat flour samples, the treatment processes such as preparation, fermentation and sterilization would reduce the antigenicity and allergenicity of wheat allergens to different degrees. The content of wheat anaphylaxis protein was less than 20 mg/kg in the 24th day of fermentation stage, and the allergenicity was basically eliminated. **Conclusion** In the laboratory simulation of low-salt solid soy sauce brewing, the antigenicity and allergenicity of wheat allergenic protein decreases in different degrees during preparation, fermentation and sterilization, among which the preparation stage plays the biggest role, and the allergenicity of wheat in the finished soy sauce is basically eliminated.

KEY WORDS: soy sauce; wheat; allergy protein; brewing process; degradation

0 引言

近年来随着过敏人群的逐年增加,食物过敏已成为全球性的食品安全问题。目前针对过敏没有特效的治疗药物,唯一的办法就是避免过敏食物的摄入。小麦作为世界上主要的粮食作物,小麦及其制品也是中国主要的食物来源,但也是联合国粮食及农业组织确定的八大过敏食物之一(位列第五)^[1-2]。小麦过敏反应多为迟发性过敏反应,因此有较高的患病率和漏诊率^[1]。小麦过敏可引起乳糜泻、鼻炎等多种过敏反应,对患者生活造成严重影响^[3]。小麦中有多种过敏原,小麦中的蛋白按照致敏率大小依次为 α 、 β -醇溶蛋白和低分子量麦谷蛋白亚基、 γ -醇溶蛋白、 ω -醇溶蛋白、高分子质量麦谷蛋白亚基^[4]。醇溶蛋白和麦谷蛋白是麸质蛋白的主要成分,其中麦谷蛋白在小麦蛋白总量的占比为 30%~40%,麦醇溶蛋白的占比为 40%~50%^[3]。国外对小麦过敏研究较多,据世界卫生组织国际免疫学会联合会过敏原命名分会官方网站统计,截至 2020 年 5 月 12 日,已批准食源性小麦过敏原有 15 个,分别为 Tri a 12(抑制蛋白)、Tri a 14(非特异性脂转移蛋白 1)、Tri a 17(β -淀粉酶)、Tri a 18(同工麦胚凝集素 1)、Tri a 19(ω 5-麦醇溶蛋白)、Tri a 20(γ -麦醇溶蛋白)、Tri a 25(硫氧还蛋白)、Tri a 26(高分子量麦谷蛋白)、Tri a 36(低分子量麦谷蛋白 GluB3-23)、Tri a 37(α -嘌呤硫素)、Tri a 41(线粒体 NFKB 1 泛素连接酶激活剂)、Tri a 42(cDNA 假定蛋白)、Tri a 43(cDNA 假定蛋白)、Tri a 44(胚乳转移细胞特异性 PR60 前体)、Tri a 45(延伸因子 1)^[5]。食品法典委员会 2007 无麸质定义为每公斤食品的麸质含量少于 20 mg^[6],无麸质饮食主要用于乳糜泻和麸质过敏患者的治疗。我国小麦致敏率

较国外低,可能与我国小麦品种及传统发酵菌群有关^[7]。

酱油香气浓郁味道鲜美,是深受广大消费者所喜爱的调味品。中国作为酱油的发源地,具有较为悠久的酱油生产史以及完善的酱油酿造工艺,目前我国酱油产量已居世界首位^[8]。低盐固态发酵法是酱油发酵的一种传统生产工艺,原料脱脂大豆和小麦麸皮,经蒸煮和制曲过程,采用含量低于 10%的食盐进行固态快速发酵,生产工艺低盐高温、生产周期短、适用性强。该法具有管理方便、生产成本较低、产品质量稳定等优点。我国 70%左右的酱油都采用该方法进行生产^[9]。小麦也是酱油酿造的主要原料之一。发酵能有效降低小麦制品的致敏性,研究发现乳酸菌可通过水解小麦蛋白中的水溶性蛋白和麦醇溶蛋白来降低小麦和黑麦蛋白的过敏反应^[10-11]。PHROMRAKSA 等^[12]用枯草芽孢杆菌属中的重组菌株 DB 和 SR 水解小麦醇溶蛋白来降低小麦过敏原的致敏性。廖兰等^[13]研究发现植物乳杆菌 B02012 能通过发酵有效降低小麦醇溶蛋白的免疫原性。酱油的生产过程中,一些微生物能通过发酵作用将原材料中的小麦过敏原降解,在酱油成品中检测不到小麦过敏原^[14-17]。MAKIO 等^[18]对 10 个日本品牌酱油样品采用免疫印迹和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法未检测到小麦过敏原;邵碧英等^[19]用小麦过敏原检测试剂盒对烤鳗酱油中过敏蛋白进行了检测,检测到小麦过敏原含量很低甚至没有;姜小燕等^[20]研究了十多种中国市面上的国产酱油,发现在这些成品酱油中已基本检测不到小麦过敏原。小麦过敏原在酱油酿造过程中的消除主要是微生物发酵及非酶化学反应的过程。目前国内对小麦过敏原在酱油酿造过程中的变化及降解规律还鲜有报道。本研究针对酱油酿造过程中小

麦过敏原的降解过程进行了分析研究,旨在为优化酱油酿造工艺对过敏原的降解提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料小麦面粉、大豆(北京市海淀区幸福超市); 酱油菌种(山东巧媳妇食品有限公司); 抗小麦兔多克隆抗体免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)由中国海洋大学食品安全实验室李振兴教授提供; 小麦过敏病人血清免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)来自北京协和医院小麦过敏原检测为阳性结果的血清。

乙醇、盐酸、甲醇、冰醋酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钾、氯化钠等(分析纯,北京瀚城生物有限公司); 磷酸盐缓冲液干粉(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2~7.4)、Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris-HCl buffered saline, TBS, pH 7.2~7.4)、Tween 20、含 0.05%吐温 20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris-HCl buffer saline with 0.05% Tween 20, TBST)、蛋白 Marker、30%凝胶储液、辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔、HRP 标记羊抗人、Bradford 蛋白测定试剂盒、二氨基联苯胺显色试剂盒(diaminobenzidine, DAB)(北京索莱宝有限公司); 96 孔酶标板(美国 Corning 公司)。

1.2 仪器与设备

DYCN-24D 型垂直电泳槽、DYCN-24D 转印芯、WD-9405B 型水平摇床(北京六一仪器厂); 1575 型洗板机、I-mark 型酶标仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司); 5424R 离心机(德国 EPPENDORF 公司); 国辉 FC 系列冷冻干燥机(河北国辉实验仪器有限公司); TGL-16A 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器厂); DHG-9140A 电热鼓风干燥箱(上海-恒科学仪器有限公司); QUINTIX125D-1CN 电子精密天平(精度 0.1 mg, 德国赛多利斯仪器有限公司); DHP-9082 电热恒温培养箱(上海-恒科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验室模拟低盐固态酱油的制作

参照《酱油生产实用技术》^[21]的实验方法,具体步骤同王梦莉等^[22]。

取酱油制备过程中的 12 个样品,分别为小麦面粉原料样品,制曲阶段制曲 14、27、36 和 44 h 的样品,发酵阶段发酵 5、10、17、24 和 30 d 的样品,生酱油和灭菌后的熟酱油样品。所有样品冷冻干燥后备用。

1.3.2 蛋白的提取

参照 ELVIRA 等^[23]的方法进行蛋白质提取。具体步骤同王梦莉等^[22]。

1.3.3 蛋白质分子量、蛋白组分变化测定

参照常雪娇等^[24]的方法。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)法分析酱油酿造不同阶段蛋白组分的变化。Bradford 蛋白质定量法测定可溶性蛋白含量,参照 LAEMMLI^[25]的方法,采用不连续垂直凝胶电泳,浓缩胶和分离胶质量分数分别为 5%和 12%,厚度为 1 mm。上样量 15 μ L,浓度 1 mg/mL。恒压 80 V 30 min,120 V 电泳 1 h。待溴酚蓝指示剂到达分离胶底部 1 cm 时电泳结束。经剥胶、染色、脱色后拍照。

1.3.4 小麦蛋白多克隆抗体的制备与纯化

参照赵凯等^[26]方法,用提取的小麦蛋白与弗氏完全佐剂等量混合,对新西兰白兔进行首次免疫,采取皮下及肌肉多点注射,后续采用弗氏不完全佐剂与蛋白等量混合,分别间隔 4 周、3 周、3 周后进行第二次、第三次、第四次免疫,一次性采取颈动脉放血,取上清,硫酸铵沉淀透析去盐。用 Protein A 亲和层析柱对兔血清进行纯化,得到高效价、高纯度的抗小麦蛋白多克隆抗体。

1.3.5 小麦过敏原抗原性(与兔抗小麦血清结合的能力)在酱油酿造过程中的变化

(1)免疫印迹法测定

SDS-PAGE 电泳分离后,夹心法转膜。具体步骤同王梦莉等^[22],兔抗小麦蛋白多克隆抗体用封闭液 1:50 稀释,1:1000 稀释 HRP 标记羊抗兔。

(2)间接竞争 ELISA 法测定

具体步骤同王梦莉等^[22],小麦全蛋白抗原稀释为 1 μ g/mL,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用洗涤液按 1:10000 比例稀释兔多克隆抗体,1:5000 比例稀释 HRP 标记的羊抗兔。酶标仪测定 OD₄₅₀ 值,绘制曲线。过敏原抑制率公式为式(1):

$$\text{抑制率}/\%=(\text{OD}_0 - \text{OD}_x)/\text{OD}_0 \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中 OD₀ 为空白孔的吸光值,OD_x 为待测样品的吸光值。

1.3.6 小麦过敏原蛋白过敏原性(与人血清结合的能力)在酱油酿造过程中的变化

免疫印迹法测定步骤同 1.3.5 (1),一抗人血清稀释 200 倍,二抗稀释 1000 倍。

间接竞争 ELISA 法测定步骤同 1.3.5 (2),一抗人血清稀释 2000 倍,二抗稀释 5000 倍,抑制率公式同式(1)。

1.4 数据处理

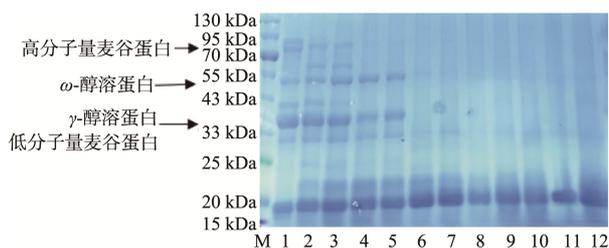
每个样品重复 3 次,采用 SPSS 22.0 进行数据分析,Excel 2016 统计分析软件绘图。

2 结果与分析

2.1 实验室模拟酱油制备过程中蛋白组分变化规律分析

实验室模拟酱油制备不同阶段的蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳情况如图 1 所示,所用蛋白 Marker 两大类^[3],其中醇溶蛋白包括 α -、 β -、 γ -醇溶蛋白(30~45 kDa)和 ω -醇溶蛋白(45~75 kDa),麦谷蛋白包括高分子量麦谷蛋白(88 kDa)和低分子量麦谷蛋白(40 kDa)。由图 1 可知,这两大类蛋白

主要存在于原料和制曲阶段,随着制曲的进行,两类主要过敏蛋白逐渐降解,进入发酵阶段后已基本观察不到电泳条带存在。在制曲 36 h 时,高分子量麦谷蛋白(88 kDa)在制曲 14 h 时消失, ω -醇溶蛋白(65 kDa)在制曲阶段 36 h 时消失。在整个制曲阶段,30~45 kDa 的 α -、 β -、 γ -醇溶蛋白逐渐消失,在进入发酵阶段后的第 5 d 已基本检测不到条带。此处的蛋白条带包含大豆球蛋白的酸性亚基,其蛋白降解趋势与王梦莉等^[22]一致。低分子量麦谷蛋白(40 kDa)在制曲阶段 27 h 时逐渐分解,36 h 消失。从制曲阶段开始,在 20~25 kDa 处出现条带,并且颜色不断加深,应该是过敏原大分子(包括小麦蛋白和大豆蛋白)降解产生的一些片段。进入发酵阶段,小分子致敏片段也开始逐渐降解直至消失。制曲阶段 27 h 时仍存在于 70~95 kDa 处的蛋白条带为 β -伴大豆球蛋白的 α' 亚基;小于 20 kDa 处的条带推测是小麦的小分子蛋白、大豆蛋白的碱性亚基及蛋白降解的小分子混合物,在制曲阶段颜色逐渐加深,进入发酵阶段后颜色先变浅,在生熟酱油中颜色有所增加。



注: M: 蛋白 Marker; 1: 原料小麦粉; 2~5: 制曲阶段 14、27、36、44 h; 6~10: 发酵阶段 5、10、17、24、30 d; 11: 生酱油; 12: 经灭菌处理的熟酱油, 下同。

图 1 实验室模拟酱油制备过程中蛋白 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE diagram of proteins during laboratory simulation of soy sauce brewing process

2.2 实验室模拟酱油制备过程中小麦致敏原抗原性变化分析

实验室模拟酱油制备过程中小麦致敏原抗原性结果如图 2 所示。从图 2 中可知,小麦致敏蛋白的免疫结合能力在酱油酿造过程中逐渐下降。制曲阶段 14 h 时,免疫印迹条带已检测不到高分子量麦谷蛋白(88 kDa),与 SDS-PAGE 结果一致。 ω -醇溶蛋白(45~75 kDa)和 α -、 β -、 γ -醇溶蛋白(30~45 kDa)以及低分子量麦谷蛋白(40 kDa)条带在制曲阶段一直存在,略有减弱,进入发酵阶段后 5 d 时,这些蛋白的免疫印迹条带消失。与图 1 相比有延迟。制曲 27 h 时,在 20~25 kDa 出现免疫印迹条带,并在进入发酵 10 d 才消失,推测为蛋白分子降解产生的抗原表位,仍具有免疫原性。随着反应进行,抗原表位也逐渐分解,失去免疫原性。酿造过程一直存在的 20 kDa 左右的蛋白免

疫印迹条带,与 SDS-PAGE 图一致,制曲阶段颜色加深,发酵阶段后期颜色逐渐变浅。应该是降解产生的抗原表位及小分子量的小麦蛋白混合物,仍有免疫原性。

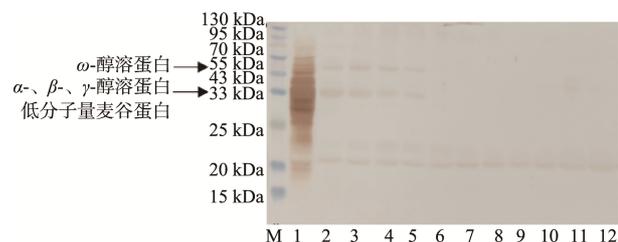


图 2 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原的 IgG 结合能力免疫印迹图

Fig.2 Western-blot pattern of IgG-binding activity of wheat allergen from laboratory simulation of soy sauce brewing process

通过 Western blot 对过敏原进行定性分析后,还需要对过敏原的含量变化进行定量分析,因此还需要进行 ELISA 实验。图 3 为在酱油酿造过程中采用 ELISA 法检测的小麦过敏原抗原性抑制率变化情况。在实验室模拟酱油酿造过程中,小麦过敏原进入制曲阶段 14 h 时下降明显,27 h 之后基本稳定,进入发酵阶段抑制率略有增加,发酵 10 d 后又逐渐下降。这里与免疫印迹图中的变化趋势并不完全一致,原因推测是蛋白空间构象发生变化,大分子过敏原分解成了多个小分子片段,暴露出了更多的抗原表位,免疫反应增加,随着反应进行,抗原表位逐渐破坏,分解为小分子片段,反应减弱。图 2 中 20~25 kDa 处的条带颜色在制曲阶段后期和发酵初期逐渐加深则可印证推测。由图 3 的反应趋势可以看出,制曲阶段抑制率下降最为明显,其次是发酵和灭菌阶段。灭菌处理也能降低小麦抗原性,灭菌后,熟酱油中小麦过敏原性较生酱油下降了 10.76%。由此可知,在酱油酿造过程中,小麦过敏原蛋白的抗原性逐渐降低,其中制曲阶段起到关键作用。

从免疫印迹图和 ELISA 定量分析中可以看出,致敏率最低的高分子量麦谷蛋白(88 kDa)和 55~70 kDa 的醇溶蛋白在进入制曲阶段初期,条带就消失,说明其最早降解,是使样品抑制率下降的重要原因, α -、 β -、 γ -醇溶蛋白(30~45 kDa)以及低分子量麦谷蛋白(40 kDa)在制曲阶段虽然逐渐减弱,但 20~25 kDa 处蛋白分解产生的抗原表位使得样品过敏原性在制曲阶段后期并未明显下降。直到进入发酵阶段后期,醇溶蛋白和麦谷蛋白分子均被降解,使样品抑制率又逐渐下降。

2.3 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原过敏原性变化

通过免疫印迹反应对酿造过程的小麦过敏原 IgE 结合能力进一步研究,由图 4 可知,在酿造过程中,主要对血清产生免疫反应的是 45~75 kDa 的醇溶蛋白,其在制曲阶段

14 h 时条带变浅, 27 h 时又增强后减弱。在进入发酵阶段的第 5 d 时, 已经检测不到过敏蛋白免疫印迹条带存在。

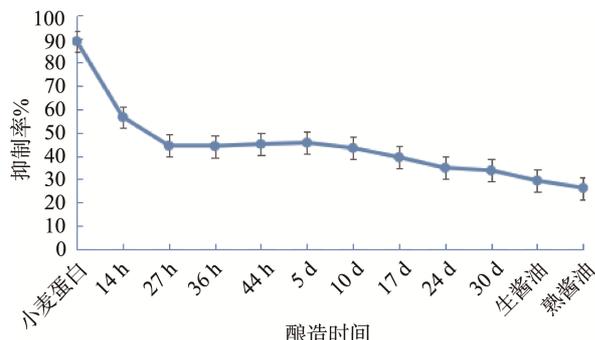


图 3 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原抗原性变化
Fig.3 Antigenic changes in wheat allergens during laboratory simulation of soy sauce brewing

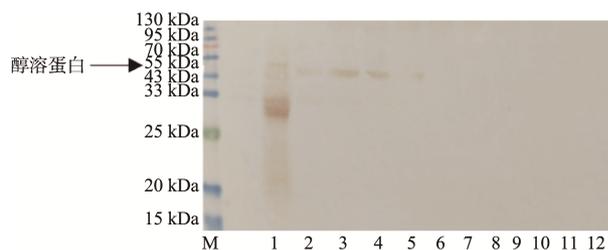


图 4 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原的 IgE 结合能力免疫印迹图

Fig.4 Western-blot pattern of IgE-binding activity of wheat allergen from laboratory simulation of soy sauce brewing process

通过间接竞争 ELISA 法对酿造中小麦过敏原的 IgE 结合能力作了进一步研究。由图 5 可知, 在酿造过程中, 小麦过敏蛋白的过敏原性逐渐降低。进入制曲阶段后逐渐减弱, 制曲 36 h 后和发酵阶段初期抑制率略增加, 发酵后期又略减弱直到酱油酿造结束抑制率无明显变化。该变化与免疫印迹结果较一致。由此可知, 制曲和发酵处理均使小麦过敏原性不同程度下降, 根据图 5 中的下降趋势, 制曲的作用最大。制曲阶段和生酱油灭菌后的抑制率略升高(无明显差异)的原因应该是小麦过敏蛋白降解过程中暴露出一些过敏表位能与人血清结合有关。

2.4 间接竞争 ELISA 测定低盐固态酱油酿造过程中的小麦过敏原含量变化情况

通过间接竞争 ELISA 法对酱油酿造过程中小麦过敏原的浓度变化进行了研究。由表 1 可知, 在兔血清测定的抗原性方面, 小麦过敏原的含量在酿造过程中呈下降趋势。在发酵 24 d 以后测得的小麦过敏原含量已小于 20 mg/kg, 可以视为无麸质食品。在人血清测定的抗原性方面, 仅在原料小麦中检测到小麦过敏原存在, 酿造过程中已检测不到。

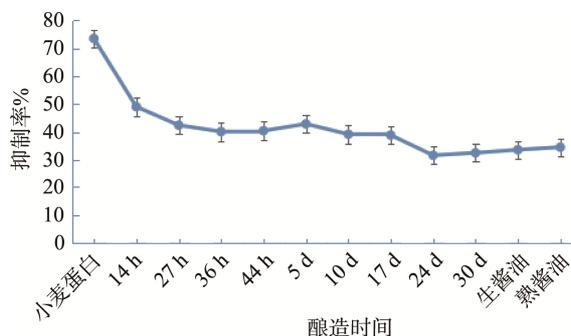


图 5 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原过敏原性变化
Fig.5 Allergenic changes in wheat allergens during laboratory simulation of soy sauce brewing

表 1 实验室模拟酱油制备过程中小麦过敏原含量变化情况(mg/kg)

Table 1 Changes of wheat allergen content in laboratory simulation of soy sauce brewing (mg/kg)

| 酿造时间 | 小麦过敏原含量 (兔血清) | 小麦过敏原含量 (人血清) |
|------|---------------|---------------|
| 小麦 | 375.96±10.87 | 68.80±1.45 |
| 14 h | 170.35±6.12 | <0 |
| 27 h | 84.74±2.98 | <0 |
| 36 h | 83.57±2.83 | <0 |
| 44 h | 89.42±3.02 | <0 |
| 5 d | 93.63±3.44 | <0 |
| 10 d | 77.65±1.67 | <0 |
| 17 d | 50.05±1.38 | <0 |
| 24 d | 18.47±0.63 | <0 |
| 30 d | 10.59±0.29 | <0 |
| 生酱油 | <0 | <0 |
| 熟酱油 | <0 | <0 |

3 讨论与结论

本研究采用了凝胶电泳、免疫印迹以及酶联免疫 3 种方法检测酱油制备过程中小麦过敏蛋白的变化。一般来说, 免疫印迹法比凝胶电泳法结果更灵敏。本研究中凝胶电泳法和免疫印迹法均在进入发酵第 5 d 时检测不到小麦中的醇溶蛋白, 可以认为小麦过敏蛋白在发酵第 5 d 基本降解。ELISA 是一种用酶标抗体进行抗原-抗体反应, 以酶作用底物后的显色深浅来反应待测样品中抗原或抗体的含量^[27], ELISA 实验结果表明在发酵 5 d 后仍能检测到免疫反应的发生, 并且抑制率较制曲阶段反而有所升高, 在进入发酵阶段的后期才逐渐下降。过敏反应的发生主要是由于过敏原的抗原表位与抗体结合造成的, AMOGH 等^[28]对小麦过敏原 B 细胞表位进行了计算研究, 共预测 59 个线性表位和 8 个构象表位。毛炜翔^[29]预测了 α -醇溶蛋白中的 5 个抗原

表位区段。本研究可以推断制曲阶段随着反应进行,小麦过敏蛋白结构发生变化,暴露出了新的抗原表位,仍然有由 5~15 个氨基酸残基组成的表位可以发生免疫反应^[30],甚至之前降解的醇溶蛋白又暴露出了新的抗原表位,使得免疫反应有所升高。进入发酵阶段 5 d 时反应达到最大值,随后抗原表位逐渐被破坏,抑制率也逐渐下降。直到发酵到第 24 d,其含量低于食品法典委员会认可的 20 mg/kg,可以认为到发酵第 24 d,抗原表位也逐渐降解。

本实验室前期对酱油酿造过程中大豆过敏蛋白的变化情况已研究出基本规律,发现大豆过敏原的免疫原性在酱油制备的 4 个阶段都有不同程度降低,而且成品酱油中仍残留大豆球蛋白的过敏原。本研究结果发现小麦过敏蛋白和大豆过敏蛋白的降解过程类似,制曲阶段对小麦过敏原的降解作用也最明显^[22],但后期和成品酱油中均检测不到小麦过敏蛋白。实验室前期对 14 种市售国产酱油进行了大豆和小麦过敏原检测,发现部分酱油含有大豆过敏蛋白,并且蛋白多少和酿造过程采用的工艺以及酱油的等级有关,而所有样品中的小麦过敏原含量极低甚至检测不到^[21]。这可能与原料处理有关,大豆整颗蒸煮,而小麦则以面粉的形式进入制曲阶段,用量也比大豆少很多,使得小麦中蛋白的降解反应发生的更早也更加彻底。

制曲是生产优质酱油的关键工序。有研究通过依赖培养和非依赖培养的方法对酱油酿造过程中的制曲阶段进行了研究,鉴定出 20 种细菌和 6 种真菌。这些菌群在酱油酿造中产生酶对淀粉进行糖化,分解蛋白质,产生氨基酸^[31]。因此本研究中在制曲阶段小麦过敏原的降解较发酵阶段明显。此外,菌种对酱油风味有很大的影响,微生物发酵能够降解小麦过敏原,而不同菌种对小麦过敏原的降解作用不同,因此可以对不同菌种或菌种组合对小麦过敏原的降解速率的影响进行研究。

本研究发现实验室制备低盐固态酱油过程中,经过制曲、发酵和灭菌等过程,小麦过敏原的抗原性和过敏原性均不同程度降低,在进入发酵阶段的第 5 d 小麦过敏蛋白被降解,第 24 d 小麦过敏蛋白的表位片段被降解,成品酱油中小麦的致敏性基本被消除。本研究对酱油酿造过程中小麦过敏原含量的变化进行了探究,为酱油的生产及小麦过敏原降解研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 甄宇江. 食物致敏原与食品安全[M]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [2] ZHEN YJ. Food allergy in food safety [M]. Beijing: China Standards Press, 2011.
- [3] WANG T, QIN GX, SUN ZW, *et al.* Advances of research on glycinin and β -conglycinin: A review of two major soybean allergenic proteins [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2014, 54(7): 850–862.
- [4] 孟良玉, 黄晓杰, 徐方旭, 等. 小麦致敏蛋白的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(4): 147–151.
- [5] MENG LY, HUANG XJ, XU FX, *et al.* Progress of researches on allergens from wheat [J]. *Food Ferment Ind*, 2012, 38(4): 147–151.
- [6] 李玺, 薛文通. 小麦致敏蛋白及其过敏病症研究进展[J]. *食品科技*, 2016, 41(8): 147–152.
- [7] LI X, XUE WT. Research progress of wheat allergens and allergy symptoms [J]. *Food Sci Technol*, 2016, 41(8): 147–152.
- [8] WHO/IUIS allergen nomenclature home page [DB/OL]. <http://www.allergen.org/search.php> [2022-09-22].
- [9] 付文慧, 饶欢, 田阳, 等. 无麸质食品现状及品质改良研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(1): 9–11.
- [10] FU WH, RAO H, TIAN Y, *et al.* Research progress of gluten-free foods and quality improvement [J]. *Cere Oils*, 2020, 33(1): 9–11.
- [11] 李玺, 田阳, 唐杰, 等. 酵母菌和植物乳杆菌发酵对小麦过敏原性的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 235–239, 312.
- [12] LI X, TIAN Y, TANG J, *et al.* The influence of fermentation on wheat allergy by yeast and *Lactobacillus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(2): 235–239, 312.
- [13] 张婧, 邵懿, 陈潇, 等. 国内外酱油法规标准对比及分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(1): 93–98.
- [14] ZHANG J, SHAO Y, CHEN X, *et al.* Comparison and analysis of domestic and international soy sauce standards [J]. *Chin J Food Hyg*, 2020, 32(1): 93–98.
- [15] FENG Y, CAI Y, SUN-WATERHOUSE D, *et al.* Approaches of aroma extraction dilution analysis (AEDA) for headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry (HS-SPME-GC-O): Altering sample amount, diluting the sample or adjusting split ratio? [J]. *Food Chem*, 2015, 187(15): 44–52.
- [16] RIZZELLO CG, ANGELIS MD, CODA R, *et al.* Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy [J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 223(3): 405–411.
- [17] ILONA S, KATARZYNA, PIASECKA J, *et al.* Selection of lactic acid bacteria strains for the hydrolysis of allergenic proteins of wheat flour [J]. *Soc Chem Ind*, 2016, 96(11): 3897–3905.
- [18] PHROMRAKSA P, NAGANO H, BOONMARS T, *et al.* Identification of proteolytic bacteria from thaitraditional fermented foods and their allergenic reducing potentials [J]. *J Food Sci*, 2008, (4): 189–195.
- [19] 廖兰, 文晓艳, 陈林萍, 等. 植物乳杆菌 B02012 对酸面团小麦蛋白结构和免疫特性的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(17): 22–29.
- [20] LIAO L, WEN XY, CHEN LP, *et al.* Impacts of *Lactobacillus plantarum* B02012 on gluten structure and immunoreactivity in sourdough [J]. *Food Sci*, 2019, 40(17): 22–29.
- [21] KOBAYASHI M, HASHIMOTO Y, TANIUCHI S, *et al.* Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(6): 821.
- [22] TSUJI H, OKADA N, YAMANISHI R, *et al.* Measurement of Gly m Bd 30K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Agric Chem Soc Japan*, 1995, 59(1): 150–151.
- [23] OGAWA A, SAMOTO M, TAKAHASHI K, *et al.* Soybean allergens and hypoallergenic soybean products [J]. *J Nutr Sci Vitam*, 2000, 46(6): 271–279.

- [17] CAO W, WATSON D, BAKKE M, *et al.* Detection of gluten during the fermentation process to produce soy sauce [J]. *J Food Protect*, 2017, 80(5): 799–808.
- [18] MAKIO K, YUICHIRO H, SHOICHIRO T, *et al.* Degradation of wheat allergen in soy sauce brewing [J]. *Mol Med Rep*, 2004, 13(6): 821–827.
- [19] 邵碧英, 傅碧忠, 郑晶. 烤鳗酱油中大豆、小麦过敏原的 ELISA 检测[J]. 中国酿造, 2011, (30): 69–72.
- SHAO BY, FU BZ, ZHENG J. Detection of soy allergen and wheat allergen in roast eel sauces by ELISA [J]. *China Brew*, 2011, (30): 69–72.
- [20] 姜小燕, 高美须, 王梦莉, 等. 市售国产酱油中大豆、小麦过敏原分析[J]. 中国酿造, 2021, 40(1): 49–53.
- JIANG XY, GAO MX, WANG ML, *et al.* Analysis of soybean and wheat allergens in domestic commercial soy sauce [J]. *China Chew*, 2021, 40(1): 49–53.
- [21] 李幼筠. 酱油生产实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- LI YJ. Practical technology of soy sauce production [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [22] 王梦莉, 高美须, 姜小燕. 大豆过敏原在低盐固态酱油酿造过程中的降解规律[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 197–202.
- WANG ML, GAO MX, JIANG XY. Degradation of soybean allergens during the process of low-salt solid soy sauce [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(24): 197–202.
- [23] ELVIRA G, MIGUEL V, BEN O. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(19): 5882–5887.
- [24] 常雪娇, 李坤, 张英, 等. 晒干处理对花生过敏原蛋白潜在致敏性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 49–54.
- CHANG XJ, LI K, ZHANG Y, *et al.* Effect of sun-drying on potential allergenicity of peanut allergens [J]. *Food Sci*, 2018, 39(3): 49–54.
- [25] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [26] 赵凯, 贾彦博, 王啸, 等. 小麦球蛋白单克隆和多克隆抗体制备及建立酶联免疫吸附法快速检测技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4154–4158.
- ZHAO K, JIA YB, WANG X, *et al.* Study on monoclonal antibody and polyclonal antibody preparation and establishment of ELISA detection method of wheat globulin [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(10): 4154–4158.
- [27] HE SF, LI X, CHEN HB. A novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay with covalently bound monoclonal antibody and gold probe for sensitive and rapid detection of bovine β -lacto globulin [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(16): 3693–3703.
- [28] AMOGH J, NEELABH, MEENAKSHI S. A computational study of B-cell epitopes of wheat allergens and identification of its IgE binding residues [J]. *Int J Inf Technol*, 2021. DOI: 10.1007/s41870-020-00575-w
- [29] 毛炜翔. 小麦过敏原-醇溶蛋白编码基因的分子克隆的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- MAO WX. Molecular cloning of α -gliadin gene from wheat allergen [D]. Nanchang: Nanchang University, 2008.
- [30] 赵鑫, 高美须, 王志东, 等. 模拟肠液对 Pen a1 及其抗原表位免疫原性的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 29–34.
- ZHAO X, GAO MX, WANG ZD, *et al.* Effect of simulated intestinal fluid on immunogenicity of Pen a1 and its epitopes [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(10): 29–34.
- [31] YAN YA, QIAN YL, JI FD, *et al.* Microbial composition during Chinese soy sauce koji-making based on culture dependent and independent methods [J]. *Food Microbiol*, 2013, 34(1): 189–195.

(责任编辑: 张晓寒 黄周梅)

作者简介



牟 慧, 硕士, 农艺师, 主要研究方向为农业技术和食品过敏原。
E-mail: mx1829rz@163.com



姜小燕, 硕士, 主要研究方向为食品过敏原。
E-mail: 2919157059@qq.com



高美须, 副研究员, 主要研究方向为食品过敏蛋白和食品辐照。
E-mail: meixugao@263.net