

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241224001

引用格式: 王宣, 黄俊恺, 孔维恒, 等. 基于大豆过敏蛋白的植物替代蛋白产品真实性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 59-68.

WANG X, HUANG JK, KONG WH, *et al.* Study on the authenticity determination of plant-based proteins based on soybean allergens [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 59-68. (in Chinese with English abstract).

基于大豆过敏蛋白的植物替代蛋白 产品真实性研究

王宣¹, 黄俊恺¹, 孔维恒¹, 王娟强¹, 张颖颖¹, 郭文萍¹, 赵文涛^{1,2*}

(1. 中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068; 2. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-串联质谱法建立植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白的检测方法, 开展植物替代蛋白产品中过敏蛋白的定量和真实性判定研究。**方法** 大豆分离蛋白经胰蛋白酶水解后, 通过高分辨质谱采集数据并与 Uniprot 数据库匹配, 筛选出大豆特异性过敏蛋白多肽, 并采用响应面设计优化过敏蛋白提取条件, 从而构建过敏原定量方法。对市售植物替代蛋白产品进行实际样品检测, 初步得到不同植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白含量。**结果** 筛选出线性较好的 6 种大豆定量多肽, 相关系数均大于 0.995, 方法检出限为 0.182~2.080 $\mu\text{g/g}$ 、方法定量限为 0.607~6.920 $\mu\text{g/g}$, 回收率为 97.1%~126.6%, 日内精密密度为 5.17%~10.20%, 日间精密密度为 5.02%~11.70%。**结论** 本方法特异性强、灵敏度高, 可以较好地针对植物替代蛋白产品进行检测, 实现了在无同位素标记肽段的情况下对大豆过敏蛋白的准确定量。在植物替代蛋白产品的过敏蛋白检测上具有较好的应用前景, 同时可实现植物替代蛋白产品的掺假鉴别及食品标签的过敏信息判别。

关键词: 植物替代蛋白产品; 大豆过敏蛋白; 超高效液相色谱-串联质谱法; 特征多肽; 响应面优化

Study on the authenticity determination of plant-based proteins based on soybean allergens

WANG Xuan¹, HUANG Jun-Kai¹, KONG Wei-Heng¹, WANG Juan-Qiang¹,
ZHANG Ying-Ying¹, GUO Wen-Ping¹, ZHAO Wen-Tao^{1,2*}

(1. China Meat Research Center, Beijing 100068, China;

2. China Customs Science and Technology Research Center, Beijing 100026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a detection method for soybean allergens in plant-based protein products based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and conduct research on the quantification and authenticity determination of allergy protein in plant-based protein products. **Methods** After the soybean protein isolate was hydrolyzed by trypsin, the data were collected by high resolution mass spectrometry and

收稿日期: 2024-12-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1104700)

第一作者: 王宣(1997—), 女, 硕士, 助理级工程师, 主要研究方向为食品检测分析。E-mail: wangxuancas@163.com

*通信作者: 赵文涛(1985—), 男, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: yatao_5099@163.com

matched with the Uniprot database to screen out the soybean specific allergen peptides. The response surface design was adopted to optimize the extraction conditions of the allergen protein, thereby constructing the quantitative method of allergens. Actual sample tests were conducted on commercially available plant-based protein products to preliminarily obtain the content of soybean allergy proteins in different plant-based protein products. **Results** The 6 kinds of soybean quantitative peptides with good linearity and correlation coefficients above 0.995 were selected. The limits of detection and the limits of quantification of the method were 0.182–2.08 $\mu\text{g/g}$ and 0.607–6.920 $\mu\text{g/g}$. The spiked recoveries were 97.1%–126.6% and the intra-day and inter-day precisions were 5.17%–10.20% and 5.02%–11.70%. **Conclusion** This method has strong specificity and high sensitivity, and can well detect plant-based protein products, achieving accurate quantification of soybean allergens without isotope-labeled peptide segments. It has a good application prospect in the detection of allergen in plant-based protein products. Meanwhile, it can achieve the identification of adulteration in plant-based protein products and the discrimination of allergic information on food labels.

KEY WORDS: plant-based proteins; soybean allergens proteins; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; specific peptide; response surface optimization

0 引言

近年来,随着动物蛋白需求增加导致环境、供给、农兽药残留等问题的凸显,作为优质蛋白来源的植物替代蛋白,逐渐受到消费者们的关注^[1-3]。植物替代蛋白产品不仅可以满足人体所需的蛋白营养需求,还可避免环境污染及动物蛋白供给不充分等问题,具有安全、稳定、高效、可持续等特点^[4]。植物替代蛋白产品主要以大豆蛋白、花生蛋白、小麦蛋白、豌豆蛋白为原材料^[5]。其中,大豆蛋白是最主要的植物替代蛋白产品成分,具有与动物蛋白相当的营养价值、更易消化、热量更低、产量高、价格低廉等特点,常被用于生产减脂代餐等各类功能性食品。随着植物替代蛋白市场接受度的提高^[3,6],掺假问题也开始频发,有不良商家将价格更低廉的其他蛋白掺进植物替代蛋白产品中,生产大量功能性食品来牟取暴利,并且在食品标签上不正确标识或隐藏过敏原信息,严重损害了消费者的合法权益,甚至威胁到过敏人群的健康^[7]。食物过敏作为一个严重的食品健康问题,影响着全球 5%的人口,且发病率呈现逐年上涨的趋势^[8],其中大豆蛋白中的大豆球蛋白(glycinin G1-G5)和 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基及 β 亚基为主要的过敏蛋白^[9]。鸡蛋、牛奶、鱼、花生、甲壳类动物、大豆、小麦和坚果是最易过敏的食物^[10],植物替代蛋白产品中就普遍包含 3 类。但目前,针对植物替代蛋白产品中过敏蛋白定量方法的研究较少,无法对食品中过敏原进行准确定量等问题也制约着植物替代蛋白产业的发展,因此,亟待建立出一套针对植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白的定量方法,实现植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白含量的确定与真实性判定。

目前,针对蛋白类过敏原的检测技术主要包含聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[11-13]、酶联免

疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[14]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[15-17]。PCR 方法并不直接检测过敏蛋白,而是以植物内源基因为基础,通过设计特异性引物及探针进行过敏鉴别,所以无法实现对过敏蛋白的准确定量^[18]。ELISA 方法利用抗原抗体的特异性免疫反应,通过酶作用于底物后颜色反应的强弱实现定性和定量分析^[9],ZHU 等^[19]开发了一种特异性夹心 ELISA 方法用于检测预包装食品中的过敏原成分的方法,该方法以全大豆蛋白产生的多克隆抗体作为检测和捕获抗体,定量限为 0.0625~6.0 $\mu\text{g/mL}$ 。但是该方法在测定火腿肠中大豆过敏原时会出现假阳性现象,可能与其烘焙加工条件有较大关系。尽管该方法灵敏度高、特异性强,但由于美拉德反应及聚合反应产物的生成,抗体无法准确识别过敏蛋白,进而产生假阴性或定量结果偏低等现象。因此,这两种方法均无法实现对过敏蛋白的准确定量。现阶段,由于食品加工复杂程度的提高,对于食品过敏原的检测提出了更高的要求,已有研究学者将蛋白质组学与 LC-MS/MS 相结合,开发出准确度、精密度、灵敏度都更高的检测方法,并将其应用于过敏蛋白的检测且取得了较好的效果^[20]。LC-MS/MS 主要是通过质谱仪测定出经胰蛋白消化后的蛋白肽段混合物,再与相关蛋白数据库进行匹配,从而达到筛选特异性定量多肽的目的。

现阶段已有研究测定食品中的大豆过敏蛋白:李丽芳等^[21]开发了一种基于超高效液相色谱-串联质谱法测定大豆主要过敏原的方法,优化了蛋白提取方法。但该方法仅停留在定性阶段,缺少必要的方法学要素的考察。MONTOWSKA 等^[22]运用肽组学,非靶向筛选商业加工的畜禽肉制品的特征蛋白消化物,最终确定 Glycinin 为大豆

过敏原热稳定肽标记物, 该方法实现了深加工肉类制品中大豆过敏蛋白的准确测定。YOSHIMITSU 等^[23]开发的 LC-MS/MS 使用重组 Gly m 4 (rGly m 4) 作为校准品定量, 确定方法回收率为 128%, 定量限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 实现了对大豆加工制品中 Gly m4 的定量。

近年来, 我国逐渐加强了对食品中过敏原的重视, 在拓展检测范围和提升检测精度等方面提出了更为严苛的要求。我国于 2019 年颁布了 GB/T 38163—2019《常见过敏蛋白的测定 液相色谱-串联质谱法》, 该标准适用于检测小麦粉、燕麦粉、可可粉等固态基质食品中的常见过敏原, 但目前还鲜少有针对植物替代蛋白产品中过敏原检测的相关标准及文献。

本研究基于质谱技术在过敏原检测中准确、稳定且高效的优点, 通过高分辨质谱技术与 Uniprot 数据库相结合, 筛选出大豆的特异性过敏蛋白多肽, 通过响应面设计 (Box-Behnken) 优化过敏蛋白提取条件, 建立基于特征肽段的大豆过敏蛋白多重反应监测 (multiplex reaction monitoring, MRM) 检测方法, 并应用于市售 10 种植物替代蛋白产品, 拟建立一种植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白准确定量的检测方法, 进而实现对植物替代蛋白真实性的鉴别, 为植物替代蛋白产品的质量安全监管提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

于北京不同区域的市场、超市购入 10 种植物替代蛋白产品。

大豆分离蛋白(纯度 82.32%, 北京美添前景科技有限公司); 胰蛋白酶(测序级 IX-S, 来源于猪胰脏, 13000~20000 BAEE units/mg)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA, 生化级)(美国 Sigma 公司); 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, 生化级, 美国 Promega 公司); 甲酸、乙酸、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、尿素、氯化胆碱、甘油、盐酸[分析纯, 国药集团化学试剂(上海)有限公司]; 超纯水由 Milli-Q 超纯水净化系统制备获得。

1.2 仪器与设备

Q Exactive HF-X 超高效液相色谱四极杆静电场轨道阱高分辨质谱系统(配有电喷雾离子源)、Sorvall LYNX 4000 落地式高速离心机、Hypeisil GOLD C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm)(美国赛默飞世尔科技公司); Agilent1290-6470 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱仪、Agilent RRHD C₁₈ 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 2.1 μm)(美国 Agilent 公司); AUW220D 电子分析天平(感量 0.001 g, 日本 Shimadzu 公司); DT 1028 H 超声波清洗机(德国 Bandelin 公司); HLB 固相萃取柱(60 mg, 3cc)(美国 Waters 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 样品前处理

根据前期研究^[24-25], 样品前处理方法主要分为蛋白提取、胰蛋白酶水解、固相萃取净化 3 个步骤, 具体实验操作如下: 称取 0.5 g (± 0.001 g) 均质后的样品, 加入 10 mL 蛋白提取液(50 mmol/L Tris-HCl, 含 6 mmol/L 尿素, pH=10), 冷水浴超声 30 min, 12000 r/min 离心 10 min。

取 200 μL 上清液加入 30 μL 100 mmol/L DTT 后于 56 $^{\circ}\text{C}$ 条件下气浴振荡 1 h, 静置至室温后加入 30 μL 100 mmol/L IAA 置于暗处反应 30 min, 取出后加入 100 μL 胰蛋白酶溶液(2.5 mg/mL)酶解 3 h, 加入 15 μL 乙酸终止反应, 再加入蛋白提取液定容至 2 mL, 上述溶液待净化。

采用 3 mL 乙腈和 0.5% 乙酸溶液提前活化 HLB 固相萃取柱, 将反应液全部上样, 使用 3 mL 0.5% 乙酸淋洗, 抽干后使用 2 mL 60% 乙腈溶液(含有 0.5% 乙酸)洗脱, 洗脱液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤测定。

1.3.2 响应面实验优化

以不同料液比、酶解时间、酶与蛋白配比进行单因素实验, 考察不同因素对大豆过敏蛋白提取效果的影响, 除变量外, 实验固定蛋白提取液配比(50 mmol/L Tris-HCl, 6 mmol/L 尿素, pH=10)、DTT 100 mmol/L、IAA 100 mmol/L、振荡时间 1 h、超声时间 30 min, 分别研究料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g:mL)、酶解时间(1、3、6、9、12 h)、酶与蛋白配比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 mg:g)对过敏蛋白提取效果的影响。

根据单因素实验结果设计响应面实验, 以料液比(A)、酶解时间(B)、酶与蛋白配比(C)为实验因素, 以大豆最佳定量过敏多肽响应值作为考察指标, 进行 3 因素 3 水平的响应面实验, 其因素水平见表 1。

表 1 响应面实验因素及水平
Table 1 Test factors and levels of response surface

水平	因子		
	A: 料液比 (g:mL)	B: 酶解时间 /h	C: 酶与蛋白配比 (mg:g)
-1	1:15	1	1:30
0	1:20	3	1:40
1	1:25	6	1:50

1.3.3 超高效液相色谱-串联高分辨质谱定性分析

色谱条件: Hypeisil GOLD C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL ; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液, 洗脱梯度为 0~0.2 min, 3%~10% B; 0.2~20.0 min, 10%~40% B; 20.0~24.0 min, 40%~80% B; 24.0~26.5 min, 80% B; 26.5~27.0 min, 80%~3% B; 27.0~30.0 min, 3% B。

质谱条件: 喷雾电压 3.5 kV; 毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 离

子源雾化温度 350℃; 鞘气压力 45 arb; 辅气压力 15 arb; 扫描模式 Full MS/dd-MS²; 离子化模式为正离子; 一级全扫描分辨率 120000; 自动增益 3e⁶; 扫描范围 150~1500 m/z; 最大离子注入时间 20 ms; 二级质谱扫描分辨率 15000; 自动增益 1e⁵; 最大离子注入时间 100 ms; 分离窗口 1.6 m/z; 归一化碰撞能量为 20 V。

1.3.4 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱定量分析

色谱条件: Agilent RRHD C₁₈ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.1 μm); 柱温 40℃, 进样量 1 μL; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液, 洗脱梯度为 0~1.0 min, 10% B; 1.0~10.0 min, 10%~50% B; 10.0~13.0 min, 50%~90% B; 13.0~14.0 min, 90% B; 14.0~14.1 min, 90%~10% B; 后运行 2 min。

质谱条件: 离子源: 电喷雾离子源(electrospray ion source, ESI); 检测模式: MRM; 扫描模式: 正离子模式; 毛细管电压: 3500 V; 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 7 L/min; 鞘气温度: 300℃; 鞘气流速: 11 L/min; 雾化气压力: 45 psi。

数据分析: 采用 Design Expert 13.0 软件对蛋白提取流程的 3 个主要参数进行响应面优化。采用 Proteome Discover (PD 2.8) 软件对高分辨采集数据进行分析, PD 软件工作流程主要分为 Processing Step 和 Consensus Step, 参数设置最多漏切位点为 2, 每个多肽最大平均修饰为 3, 多肽长度为 6~20, 结合 Uniprot 蛋白数据库进行大豆过敏蛋白的匹配。

1.3.5 标准曲线的制作

称取 0.5 g (±0.001 g) 大豆分离蛋白按照 1.3.1 节前处理方法, 分别移取适量的终溶液以 60% 乙腈溶液(含有 0.5% 乙酸)稀释, 配制成 0.1、1.0、2.0、5.0、10.0 mg 大豆分离蛋白的标准溶液曲线溶液, 以质量浓度作横坐标, 筛选的大豆过敏蛋白多肽响应强度作纵坐标, 计算回归方程。

1.3.6 检测结果计算

待测样品的称样量为 m (g), 将待测样品各个多肽的

峰面积代入对应的回归方程, 得到相应蛋白的质量为 mi (mg), k 为对应过敏蛋白与大豆分离蛋白的转化系数, 待测样品中大豆过敏蛋白质量 X (μg/g) 按式(1)计算:

$$X = \frac{mi}{m} \times f \times k \quad (1)$$

式中: 大豆球蛋白 G1-1 亚基与大豆总蛋白的转化系数 k 为 0.5 μg/mg; 大豆球蛋白 G1-2 亚基与大豆总蛋白的转化系数 k 为 4.5 μg/mg; 大豆球蛋白 G2-3 亚基与大豆总蛋白的转化系数 k 为 5.7 μg/mg; 大豆球蛋白 G4 亚基与大豆总蛋白的转化系数 k 为 1.6 μg/mg; β-伴大豆球蛋白与大豆总蛋白的转化系数 k 为 0.7 μg/mg; 大豆球蛋白前体与大豆总蛋白的转化系数 k 为 0.5 μg/mg^[26]; 稀释倍数 f 为 50。

1.4 数据处理

采用 Proteome Discover (PD 2.8) 软件对高分辨采集数据进行分析, 采用 Origin 2024 绘图, 使用 IBM SPSS Statistics 27.0 进行数据分析。使用 Design Expert 13 进行响应面分析处理, 并利用 Box-Behnken 设计进行响应面优化。为减少实验误差, 采用 3 次独立重复实验。

2 结果与分析

2.1 大豆过敏蛋白特征肽段的筛选

在建立超高效液相色谱-串联质谱法测定过敏蛋白的检测方法时, 筛选出专一性强、稳定性好、灵敏度高的过敏蛋白特征肽段是至关重要的, 这将直接决定方法的准确性。

本研究将大豆分离蛋白按照上述方法进行前处理, 得到高纯度的多肽蛋白酶解液, 通过超高效液相色谱仪将酶解液喷雾到高分辨质谱仪中进行数据采集, 获取的数据导入至 Proteome Discovery (PD 2.8) 软件中, 结合 Uniprot 数据库筛选出大豆蛋白过敏蛋白多肽序列, 共获得大豆过敏蛋白多肽 19 条, 具体结果见表 2。但初步获得的过敏多肽需进一步筛选, 需考察: (1) 肽段长度, 氨基酸残基长度

表 2 筛选出的大豆过敏多肽列表

Table 2 List of peptides selected for soybean allergens

大豆过敏多肽	来源蛋白	大豆过敏多肽	来源蛋白
LSAEFGSLR	大豆球蛋白 G1	VESEGGLIQTWNSQHPELK	大豆球蛋白 G4
VLIVPQNFFVVAAR		ISTLNSLTLPALR	大豆球蛋白 G5
NLQGENEGEDKGAIIVTK		NGLHLPSYSPYPR	大豆球蛋白前体
VFDGELQEGR		LITLAIPIVKNKPGR	β-伴大豆球蛋白 α-亚基
SQSDNFEYVSFK		FIAEGHPLSLK	大豆胰蛋白酶抑制剂 3 型
LSAQYGSLR	VSDDEFNNYK		
NLQGENEEEDSGAIIVTK	大豆球蛋白 G2	DTVDGWFNIER	大豆胰蛋白酶抑制剂 1 型
EAFGVNMQIVR		DGPLEFFGFSTSAR	大豆过敏原 Gly m Bd 28K
LSAQFGSLR	大豆球蛋白 G3	ELINLATMCR	2S 种子储藏蛋白
FYLAGNQEQEFLQYQPQK			

在 6~20 较为合适; (2) 专一性, 需确定其多肽仅存在于对应物种的过敏蛋白中, 均是专属的特异多肽; (3) 稳定性, 在经过复杂的食品加工处理后仍保持稳定的状态, 不易降解或发生化学反应, 不包含漏切的酶切位点(精氨酸、赖氨酸); (4) 响应强度, 需确定多肽离子在质谱分析时具有较低的离子抑制效应, 色谱峰形尖锐对称, 离子响应强度至少大于 10^5 。

通过将高分辨质谱数据导入 Skyline 软件, 将筛选后的多肽离子转为离子对信息, 对实际样品进行多重反应监测模式扫描, 为保证结果的准确度及灵敏度, 本研究选取了响应强度较高的 6 种大豆过敏蛋白多肽, 提取离子色谱图见图 1~图 2, 本研究提及的全部大豆过敏蛋白见表 2, 提取离子色谱图见图 3。

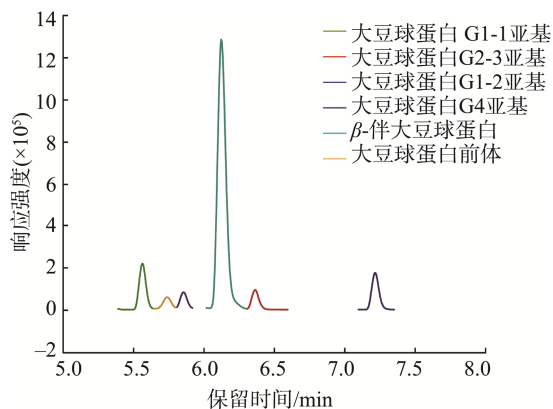


图1 大豆过敏蛋白的提取离子色谱图

Fig.1 Extracted ion chromatogram of soybean allergens

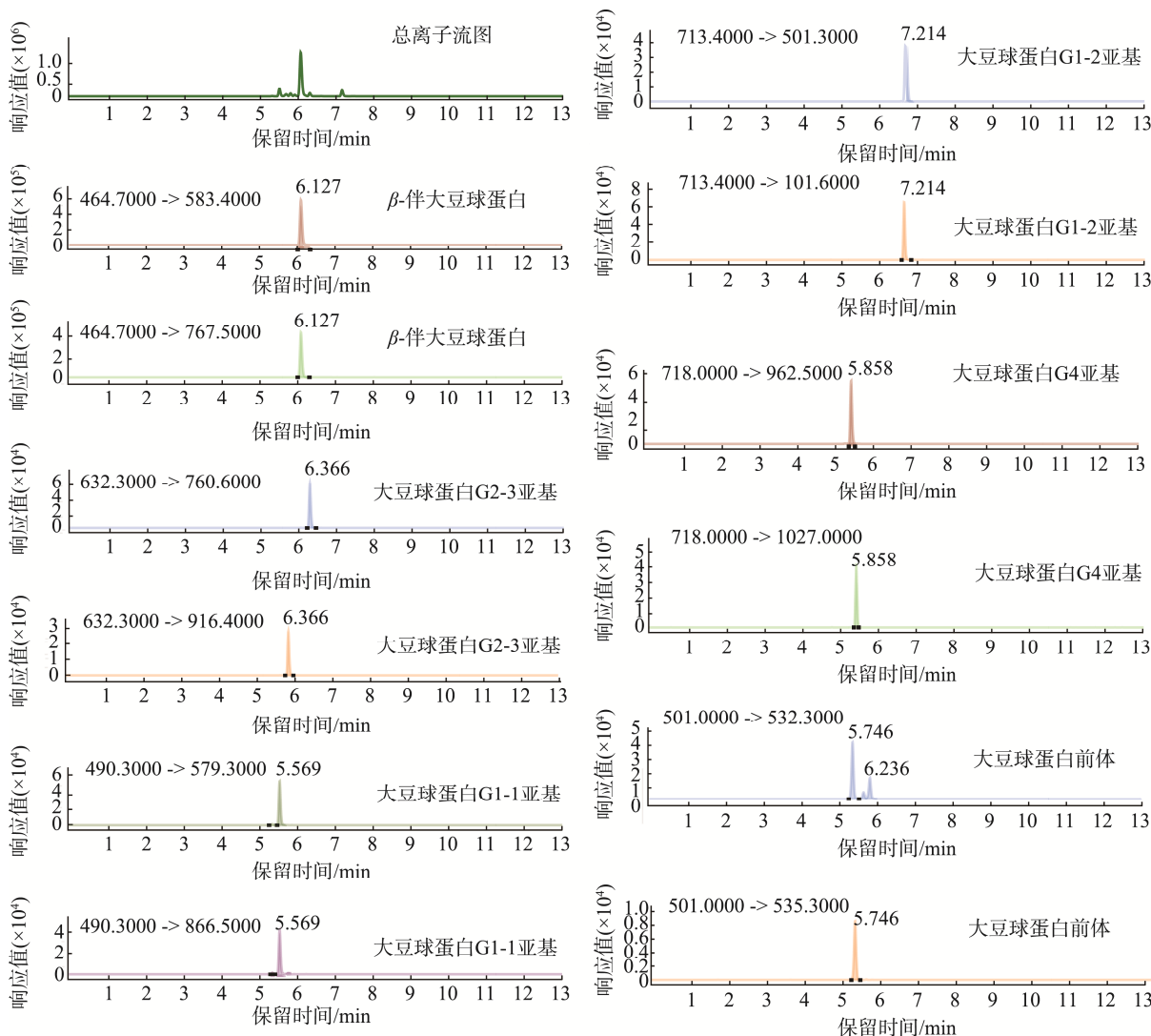


图2 优化色谱及质谱参数后6种靶标大豆过敏蛋白的提取离子色谱图

Fig.2 Extracted ion chromatogram of 6 kinds of target soybean allergens after optimizing the chromatographic and mass spectrometry parameters

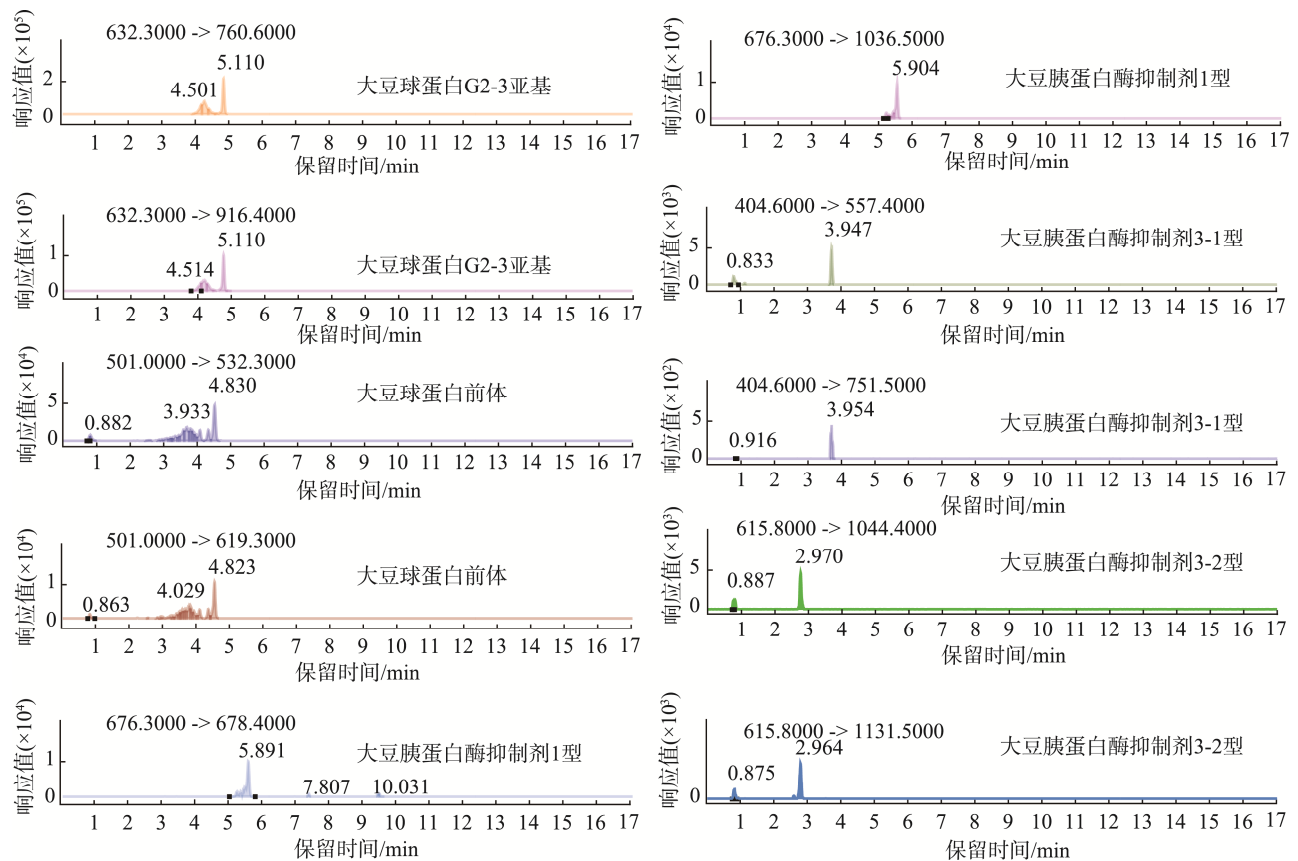


图3 本研究提及的大豆过敏蛋白提取离子色谱图

Fig.3 Extracted ion chromatogram of soybean allergens mentioned in the study

2.2 前处理方法优化

2.2.1 过敏蛋白提取缓冲液的选择

过敏蛋白的提取效果会影响特征多肽的响应强度,进而影响过敏蛋白定量的准确度及灵敏度,因此在研究过程中需最大程度地保证蛋白缓冲溶液的提取效率。本研究采用溶液内消化的蛋白质组学方法,通过 Tris-HCl 缓冲液促进细胞或组织的裂解,利用尿素使蛋白质变性,进而促进蛋白质溶解,最终达到较好的蛋白提取效果。在文献调研中发现近年来很多学者使用低共熔溶剂进行蛋白提取且取得较好效果^[27-28],但针对过敏蛋白的提取未见报道,因此本研究也对低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES)的植物过敏蛋白提取效果进行研究。具体配置的蛋白提取缓冲溶液如下:(1)氯化胆碱:尿素:水(1:1:10 mol/L);(2)氯化胆碱:乙酸:水(1:1:10 mol/L);(3)氯化胆碱:甘油:水(1:1:10 mol/L);(4) 50 mmol/L Tris-HCl; (5) 50 mmol/L Tris-HCl(含 6 mol/L 尿素)。本研究发现,加入尿素的 DES 缓冲液仅能提取少量大豆过敏蛋白且特征肽段的离子响应极低,但 Tris-HCl 缓冲溶液的提取效果普遍较好,其中最佳提取缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl(含 6 mol/L 尿素),响应较高的特征多肽分别来自大豆球蛋白 1、2、4 和 β -伴大豆球蛋白,具体结果见图 4。DES 缓冲液提取效果较差可能是因其较差的热稳定性,在高于 54 °C 时会发生相变,进而影响其化学结构

性质,而本研究在添加 DTT 减少二硫化物时需维持在 56 °C 体系中^[29]。另外,DES 缓冲液可能更适宜提取植物蛋白中的生物活性物质^[30]。因此,本研究最终采用 50 mmol/L Tris-HCl 作为最佳过敏蛋白提取缓冲液。

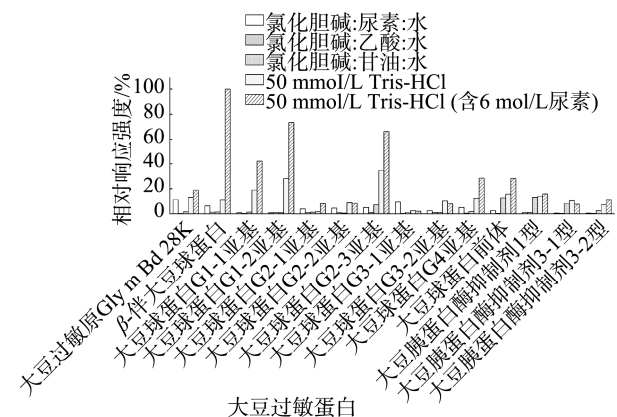


图4 不同提取缓冲液对大豆过敏蛋白的提取效果对比分析
Fig.4 Comparative analysis of soybean allergens extraction effect with different extraction solvents

2.2.2 单因素实验结果

将单因素实验得到的大豆特征多肽离子响应强度按列归一化后得到 0~1 的原始矩阵,由图 5 显示,在料液比为 1:20 (g/mL,下同)时,大豆中绝大多数特征多肽的离子

响应呈现最高, 这表明适当增加料液比可以使得样品能充分浸润于蛋白提取缓冲液中, 有利于过敏蛋白的提取。在低于 1:20 时, 大豆分离蛋白粉会出现难以充分混合的现象, 上层蛋白粉溶解后结块形成蛋白膜, 阻碍下层蛋白粉与提取液接触, 从而使得提取效率变低。随着料液比的增加, 缓冲液提取的过敏蛋白将达到饱和状态, 继续增加料液比的含量对提取效率没有显著影响。因此, 后续响应面选择料液比 1:15、1:20、1:25 进行优化。

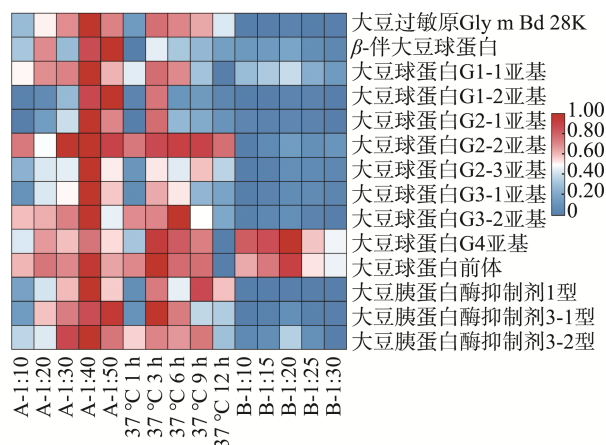


图5 单因素实验结果热图

Fig.5 Heat map of single factor experiments

胰蛋白酶的最佳酶解温度为 37 °C, 酶解时间会直接影响酶解效果, 过长或过短均会导致酶解出的过敏蛋白多肽不充分, 体系中多肽浓度偏低将影响过敏蛋白的定量结果^[31]。为研究酶解时间与过敏蛋白特征多肽响应强度间的关系, 本研究考察了不同酶解时间(1、3、6、9、12 h)对大豆蛋白提取效果的影响, 结果如图 5 所示, 大豆分离蛋白在酶解 1~12 h 的过程中, 特征多肽均可以被检出, 但不同特征肽段之间的响应差异较大。在酶解 1 h 时, 绝大多数的特征肽段响应较低, 在酶解时间达到 3 h 时达到最高, 尽管有少部分肽段在酶解 6~9 h 后响应强度变高, 但提取溶剂对其提取效率偏低。考虑到时间成本及提取效果, 本研究选取酶解时间 3、6、9 h 进行响应面优化。

胰蛋白酶与大豆分离蛋白粉的配比也是优化酶解条件的重要参数, 随着配比的增大, 胰蛋白酶将无法酶解过多的底物, 导致特征多肽的响应变差^[32-33]。如图 5 所示, 在酶与蛋白配比为 1:40 (mg:g, 下同)时, 选取的大豆过敏蛋白特征肽段均达到最佳的响应强度, 热图中显示, 归一化值均达到 0.80 以上, 在配比为 1:10~1:30 时, 绝大多数特征肽段响应强度归一化值在 0.60 左右。综合考虑, 本研究选取酶与蛋白的配比 1:30、1:40、1:50 进行响应面优化。

2.2.3 响应面实验结果

根据 2.2.2 实验结果, 利用 Box-Behnken 设计进行响应面优化, 本研究共设计 17 组实验, 其中包含中心组实验 5 组, 以 β -伴大豆球蛋白的最佳定量离子对响应值为结果。

依据 Design Expert 13 软件对所得的 17 组实验结果进行线性回归拟合分析, 所得到的二次回归方程为 $Y=1.051 \times 10^6 - 4.829 \times 10^5 A - 3.446 \times 10^5 B - 20639.1 C + 21854.1 D + 1.397 \times 10^5 AC + 1.334 \times 10^5 BC + 1.003 \times 10^5 A^2 + 1.959 \times 10^5 B^2 + 1.674 \times 10^5 C^2$, 显著性分析见表 3。

由表 3 可知, 模型 F 为 5.62, P 为 $0.0165 < 0.05$, 具有显著差异, 表明该模型具有较好的准确性及精确性。决定系数 R^2 为 0.8784, 说明该模型的预测值与实际值拟合良好。失拟值 P 为 $0.4273 > 0.05$, 差异不显著, 表明该响应面模型误差较小。因此, 该模型适用于本研究数据的分析与参数的优化。因素 A 与 B 的 $P < 0.01$, 具有极显著差异, 表明料液比及酶解时间对过敏蛋白的提取有显著影响。3D 响应面图能够直观地反应 3 个实验因素(料液比、酶解时间、酶与蛋白配比)对 β -伴大豆球蛋白特征多肽响应的影响。曲面的陡峭程度反映了实验因素对特征多肽的影响程度, 如图 6 所示, 具有极显著差异的料液比与酶解时间单因素, 相互作用较弱。软件优化的最佳参数为: 料液比 1:21.415 g:mL、酶解时间 3.086 h、酶与蛋白配比为 1:44.43 mg:g。考虑到实验的可操作性和简便性, 稍微改动后的参数为料液比 1:20、酶解时间 3 h、酶与蛋白配比为 1:44。通过实验验证, 优化后的 β -伴大豆球蛋白特征多肽的响应值达到 2.78×10^6 。

表 3 回归方程系数显著性分析

Table 3 Significance analysis of regression equation coefficients

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	3.239×10^{12}	9	3.599×10^{11}	5.62	0.0165	*
A	1.830×10^{12}	1	1.830×10^{12}	28.58	0.0011	**
B	9.500×10^{11}	1	9.500×10^{11}	14.84	0.0063	**
C	3.342×10^9	1	3.342×10^9	0.0522	0.8258	
AB	1.949×10^9	1	1.949×10^9	0.0304	0.8664	
AC	7.812×10^{10}	1	7.812×10^{10}	1.22	0.3059	
BC	7.265×10^{10}	1	7.265×10^{10}	1.13	0.3221	
A^2	4.232×10^{10}	1	4.232×10^{10}	0.6610	0.4430	
B^2	1.458×10^{11}	1	1.458×10^{11}	2.28	0.1750	
C^2	1.180×10^{11}	1	1.180×10^{11}	1.84	0.2167	
残差	4.482×10^{11}	7	6.403×10^{10}			
失拟值	2.088×10^{11}	3	6.959×10^{10}	1.16	0.4273	
净误差	2.394×10^{11}	4	5.985×10^{10}			
总离差	3.687×10^{12}	16				

注: **表示 $P < 0.01$ 差异极显著; *表示 $0.01 < P < 0.05$ 差异显著。

2.3 方法学验证

目前各国均未统一过敏原的标准品, 因此本研究采用大豆分离蛋白粉作为标准物质, 通过凯氏定氮法测定其纯度为 82.32%。称取 0.5 g 大豆分离蛋白粉按 1.3.1 节方法进行前处理, 以大豆分离蛋白质量为横坐标, 筛选出的特征多肽响应为纵坐标, 分别进行线性拟合, 排除响应值较低及相关系数低于 0.995 的特征多肽, 所得的线性方程见表 4。其中最佳定量特征肽段来自 β -伴大豆球蛋白, 多肽

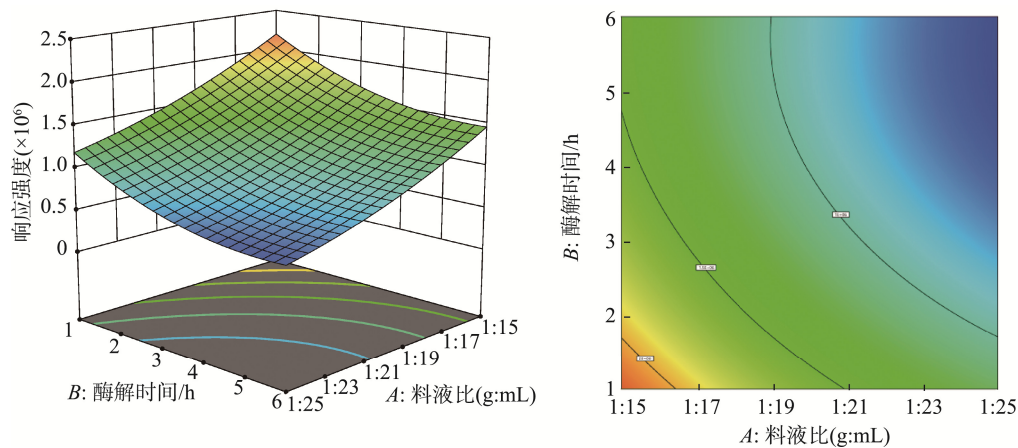


图6 A、B因素间交互作用对过敏蛋白提取效果的影响

Fig.6 Effects of interaction of A, B factors on the extraction effect of soybean allergens

表 4 线性关系系数大于 0.995 的多肽列表

Table 4 List of peptides with linearity correlation coefficients greater than 0.995

过敏蛋白	线性方程	相关系数(r^2)	多肽序列
大豆球蛋白 G1-1 亚基	$Y=2491.84X-2775.07$	0.9994	LSAEFGSLR
大豆球蛋白 G1-2 亚基	$Y=2485.58X-5839.61$	0.9968	VLIVPQN FVVAAR
大豆球蛋白 G2-3 亚基	$Y=2031.28X-2795.60$	0.9982	EAFGVNMQIVR
大豆球蛋白 G4 亚基	$Y=2226.63X-4088.42$	0.9981	VESEGGLIQTWNSQHP ELK
大豆球蛋白前体	$Y=2029.58X-1937.36$	0.9992	NGLHLPSYSPYPR
β -伴大豆球蛋白	$Y=27913.4X-5968.64$	0.9999	LITLAIPV NK PGR

序列为 LITLAIPV NK PGR, 其响应强度比其他特征多肽大一个数量级。

向不含大豆蛋白的植物替代蛋白产品中加入质量浓度为 50、100、200 mg/g 的大豆分离蛋白粉后按 1.3.1 节方法进行前处理, 对选取的 6 条肽段进行检测, 根据线性方程得到的实际浓度与理论浓度计算回收率, 得到的加标回收实验结果见表 5, 实际样品不同加标水平的总离子流图见图 7。筛选得到的 6 条特征肽段回收均小于 130%, 相对标准偏差小于 15%, 作为定量肽段来说具有较好的准确性。在加标浓度为 50 mg/g 时, 回收率均偏高。对实际样品进行日内及日间精密测定, 同一试样连续检测 3 d, 平行测定 3 次, 日内精密测定为 5.17%~10.20%, 日间精密测定为 5.02%~11.70%。结果表明该方法具有较好的回收率与精密性。方法检出限及定量限通过对标准曲线中最低质量浓度的大豆分离蛋白进行前处理, 以定量离子信噪比的 3 倍及 10 倍进行计算, 得出大豆球蛋白 G1-1 亚基与 β -伴大豆球蛋白的检出限均是 0.182 $\mu\text{g/g}$, 定量限均是 0.607 $\mu\text{g/g}$; 大豆球蛋白 G1-2 亚基的检出限是 1.640 $\mu\text{g/g}$, 定量限是 5.470 $\mu\text{g/g}$; 大豆球蛋白 G2-3 亚基的检出限是 2.080 $\mu\text{g/g}$, 定量限是 6.920 $\mu\text{g/g}$; 大豆球蛋白 G4 亚基的检出限是 0.583 $\mu\text{g/g}$, 定量限是 1.940 $\mu\text{g/g}$; 大豆球蛋白前体的检出限是 0.255 $\mu\text{g/g}$, 定量限是 0.850 $\mu\text{g/g}$ 。结果表明该方法具有较好的灵敏性, 可满足植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白的检测要求。

表 5 大豆过敏蛋白的加标回收率($n=3$)Table 5 Recovery results of spiked soybean allergens ($n=3$)

过敏蛋白	加标浓度 (mg/g)	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)
大豆球蛋白 G1-1 亚基	50	117.4	4.7	490.3	579.3*/866.5
	100	105.4	2.7		
	200	101.9	1.0		
大豆球蛋白 G1-2 亚基	50	126.6	3.7	713.4	1001.6*/501.3
	100	113.0	6.5		
	200	99.5	6.7		
大豆球蛋白 G2-3 亚基	50	116.9	4.0	632.2	760.6*/916.4
	100	101.5	8.1		
	200	99.0	4.3		
大豆球蛋白 G4 亚基	50	124.2	5.2	718.0	962.5*/1027.0
	100	109.9	11.7		
	200	102.7	7.0		
大豆球蛋 白前体	50	117.8	7.5	501.0	532.3*/535.3
	100	107.3	7.4		
	200	97.1	3.5		
β -伴大豆 球蛋白	50	106.0	9.9	464.7	583.4*/767.5
	100	102.4	4.1		
	200	104.7	6.4		

注: *为定量离子。

2.4 植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白含量测定

为了验证方法的适用性, 从北京超市随机抽取 10 种植物替代蛋白产品, 样品外包装未全部标识大豆过敏原信息, 结果如表 6 所示, 10 种样品均有大豆过敏蛋白检出,

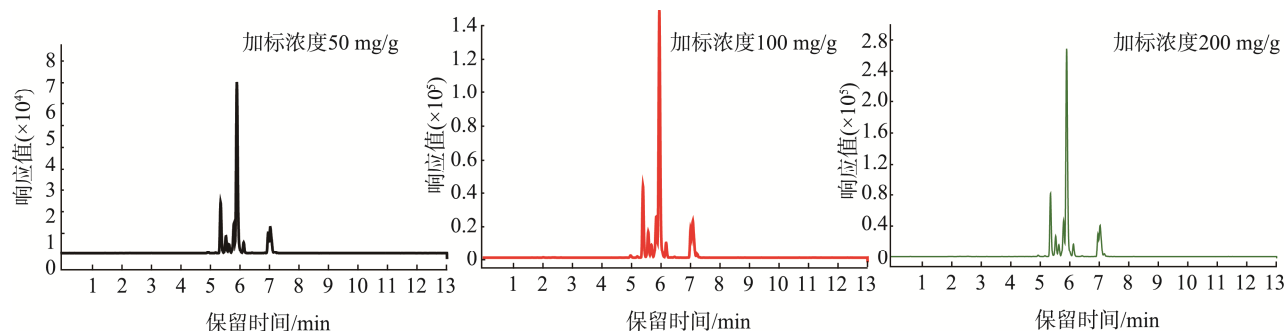


图7 实际样品不同加标水平的总离子流图

Fig.7 Total ion chromatogram of actual samples at different spiking levels

表 6 10 种植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白含量测定结果

Table 6 Determination results of soybean allergens in 10 kinds of plant-based meat products

样品编号	样品类型	过敏原信息 (大豆)	含量/($\mu\text{g/g}$)					
			大豆球蛋白 G1-1 亚基	大豆球蛋白 G1-2 亚基	大豆球蛋白 G2-3 亚基	大豆球蛋白 G4 亚基	大豆球蛋白 前体	β -伴大豆 球蛋白
YP-1	热狗棒	标识	8.41 \pm 0.01	116.00 \pm 0.01	124.00 \pm 0.04	39.90 \pm 0.02	9.39 \pm 0.10	2.09 \pm 0.06
YP-2	福袋	标识	9.48 \pm 0.01	123.00 \pm 0.01	333.00 \pm 0.07	108.00 \pm 0.01	28.10 \pm 0.03	5.89 \pm 0.07
YP-3	豆腐-口味 1	标识	20.50 \pm 0.06	128.00 \pm 0.04	399.00 \pm 0.03	71.90 \pm 0.01	18.70 \pm 0.09	11.50 \pm 0.04
YP-4	豆腐-口味 2	标识	25.20 \pm 0.08	175.00 \pm 0.04	434.00 \pm 0.03	51.90 \pm 0.03	13.00 \pm 0.07	13.90 \pm 0.02
YP-5	烤素肉	标识	12.80 \pm 0.06	178.00 \pm 0.02	464.00 \pm 0.07	36.00 \pm 0.01	14.30 \pm 0.06	5.95 \pm 0.09
YP-6	鱼豆腐	未标识	22.10 \pm 0.20	310.00 \pm 0.01	265.00 \pm 0.09	54.00 \pm 0.07	14.50 \pm 0.05	10.90 \pm 0.07
YP-7	素肉枣	标识	6.84 \pm 0.01	111.00 \pm 0.01	103.00 \pm 0.01	37.10 \pm 0.01	9.00 \pm 0.01	1.53 \pm 0.02
YP-8	素肉肠	标识	9.26 \pm 0.06	119.00 \pm 0.01	142.00 \pm 0.05	40.60 \pm 0.03	9.77 \pm 0.02	3.24 \pm 0.01
YP-9	素肉条	标识	43.03 \pm 0.01	188.00 \pm 0.05	255.00 \pm 0.11	65.90 \pm 0.07	26.4 \pm 0.04	27.90 \pm 0.12
YP-10	素肉粒	标识	26.09 \pm 0.02	117.00 \pm 0.02	216.00 \pm 0.10	48.00 \pm 0.07	26.1 \pm 0.09	24.00 \pm 0.04

其中大豆蛋白作为首要原材料的实际样品中过敏蛋白含量也相对较高,大豆球蛋白 G2-3 亚基含量相对其他过敏蛋白丰富,其次是大豆球蛋白 G1-2 亚基,其中过敏蛋白含量最低的是 β -伴大豆球蛋白。

3 结 论

本研究采用 Proteome Discovery 与 Skyline 等生物信息学软件与 Uniprot 数据库相结合,完成了大豆过敏蛋白肽段的匹配,通过高分辨质谱技术筛选出用于表征大豆的特异性过敏蛋白肽段,针对不同肽段分别优化其三重四级杆串联质谱检测参数,全面、有效、准确的定量大豆蛋白中两种主要过敏原:大豆球蛋白以及 β -伴大豆球蛋白,并通过响应面设计优化过敏蛋白的提取条件。该方法已成功应用于市售常见植物替代蛋白产品的过敏原检测及真实性鉴别中,有效弥补了在无同位素标记肽段的情况下对大豆过敏蛋白的准确定量,为植物替代蛋白产品中大豆过敏蛋白的检测、食物标签中过敏信息的判别提供技术支持和保障,同时可区分未添加大豆蛋白的植物替代蛋白,实现了植物替代蛋白的掺假鉴别。

本研究下一步拟将补充其余两种主要的过敏蛋白: Gly m Bd 30K、Gly m Bd 28K, 筛选其离子对信息,最终建立植物替代蛋白产品中大豆主要过敏原的定性定量检测方

法,并将该方法的研究思路应用于常见植物蛋白过敏原(花生、小麦、豌豆)中,构建普适性的过敏原检测方法,弥补植物替代蛋白中常见过敏蛋白检测技术的空缺,为植物替代蛋白产品的质量安全监管提供技术保障。

参考文献

- [1] SIM SYJ, SRV A, CHIANG JH, *et al.* Plant proteins for future foods: A roadmap [J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1967.
- [2] QIN P, WANG T, LUO Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development [J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2022, 7: 100265.
- [3] SIEGRIST M, MICHEL F, HARTMANN C. The shift from meat to plant-based proteins: Consumers and public policy [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2024, 58: 101182.
- [4] THAKUR S, PANDEY AK, VERMA K, *et al.* Plant-based protein as an alternative to animal proteins: A review of sources, extraction methods and applications [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2024, 59(1): 488–497.
- [5] 王玉翔, 郑召君, 刘元法. 植物蛋白纤维制备技术及其在食品领域的应用[J]. *食品科学*, 2023, 44(17): 286–304.
WANG YX, ZHENG ZJ, LIU YF. Preparation of plant protein fiber and its application in the food field: A review of recent research [J]. *Food Science*, 2023, 44(17): 286–304.
- [6] ONWEZEN MC, BOUWMAN EP, REINDERS MJ, *et al.* A systematic

- review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat [J]. *Appetite*, 2021, 159: 105058.
- [7] MALILA Y, OWOLABI IO, CHOTANAPHUTI T, *et al.* Current challenges of alternative proteins as future foods [J]. *Npj Science of Food*, 2024, 8(1): 53.
- [8] LOH W, TANG MLK. The epidemiology of food allergy in the global context [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(9). DOI: 10.3390/ijerph15092043
- [9] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展 [J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 319–328.
NING YW, YANG Z, MA MG, *et al.* Progress in common food allergens and technologies for their detection [J]. *Food Science*, 2021, 42(15): 319–328.
- [10] MONACI L, DE-ANGELIS E, MONTEMURRO N, *et al.* Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 106: 21–36.
- [11] COSTA J, AMARAL JS, GRAZINA L, *et al.* Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing [J]. *Food Science*, 2017, 221: 1843–1850.
- [12] 丁亮, 付琳, 吴秀莲, 等. 基于蛋白质和 DNA 的食品过敏原检测技术的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(7): 157–160.
DING L, FU L, WU XL, *et al.* Recent advance of detection technology of food allergens based on protein and DNA [J]. *China Brewing*, 2017, 36(7): 157–160.
- [13] VILLA C, COSTA J, MAFRA I. Detection and quantification of milk ingredients as hidden allergens in meat products by a novel specific real-time PCR method [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12). DOI: 10.3390/biom9120804
- [14] JIN J, GAN K, ZHAO L, *et al.* Peach allergen Pru p 1 content is generally low in fruit but with large variation in different varieties [J]. *Clinical and Translational Allergy*, 2021, 11(3): e12034.
- [15] PLANQUE M, ARNOULD T, DIEU M, *et al.* Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for detecting ten allergens in complex and incurred foodstuffs [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1530: 138–151.
- [16] KORTE R, OBERLEITNER D, BROCKMEYER J. Determination of food allergens by LC-MS: Impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification [J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 196: 131–140.
- [17] STELLA R, SETTE G, MORESSA A, *et al.* LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products [J]. *Food Chemistry*, 2020, 331: 127276.
- [18] 王雅清, 倪皓洁, 李华韬, 等. 食物过敏原检测技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 264–270.
WANG YQ, NI HJ, LI HT, *et al.* Research advance in detection technology for food allergen [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 264–270.
- [19] ZHU L, LI S, SUN L, *et al.* Development and validation of a specific sandwich ELISA for determination of soybean allergens and its application in processed foods [J]. *Process Biochemistry*, 2022, 117: 134–141.
- [20] 宁亚维, 刘苗, 范素芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食品中鸡蛋过敏原卵白蛋白 [J]. *食品科学*, 2018, 39(20): 332–336.
NING YW, LIU Z, FAN SF, *et al.* Detection of egg allergen ovalbumin in food by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2018, 39(20): 332–336.
- [21] 李丽芳, 黄文胜, 张九凯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测大豆主要过敏原蛋白 [J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 316–324.
LI LF, HUANG WS, ZHANG JK, *et al.* Determination of major soybean allergens by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2020, 41(24): 316–324.
- [22] MONTOWSKA M, FORNAL E. Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 87: 310–317.
- [23] YOSHIMITSU M, KIYOTA K, KAJIMURA K, *et al.* Development of an LC-MS/MS-based analytical method for quantification of soybean allergen Gly m 4 in soybean grains and processed foods [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 25–33.
- [24] ZHANG Y, LIU M, WANG S, *et al.* Identification and quantification of fox meat in meat products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131336.
- [25] ZHANG M, LI Y, ZHANG Y, *et al.* Rapid LC-MS/MS method for the detection of seven animal species in meat products [J]. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131075.
- [26] HOUSTON NL, LEE DG, STEVENSON SE, *et al.* Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(2): 763–773.
- [27] PATRA A, ARUN-PRASATH V, PANDISELVAM R. Deep eutectic solvent: An emerging trend for extraction of plant proteins [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2023, 389: 122887.
- [28] TANG J, YAO D, XIA S, *et al.* Recent progress in plantbased proteins: From extraction and modification methods to applications in the food industry [J]. *Food Chemistry: X*, 2024, 23: 101540.
- [29] YAP PG, GAN CY. Exploration of potential application of low phytotoxic alkaline deep eutectic solvent (DES) in protein extraction and bioactive applications [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2024, 409: 125521.
- [30] ALSHAMMARI OAO, ALMULGABSAGHER GAA, RYDER KS, *et al.* Effect of solute polarity on extraction efficiency using deep eutectic solvents [J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(14): 5097–5105.
- [31] MANSURI MS, BATHLA S, LAM TT, *et al.* Optimal conditions for carrying out trypsin digestions on complex proteomes: From bulk samples to single cells [J]. *Journal of Proteomics*, 2024, 297: 105109.
- [32] HUSTOFT HK, MALERØD H, WILSON SR, *et al.* A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics [C]. *Integrative Proteomics*, 2012.
- [33] 李湘, 彭地纬, 熊华, 等. 胰蛋白酶有限酶解米渣蛋白的机理及动力学模型研究 [J]. *食品科学*, 2010, 30(21): 166–171.
LI X, PENG DW, XIONG H, *et al.* Mechanism and kinetic model for limited trypsin digestion of protein in rice dregs [J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 166–171.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)