

姚 芹,于亮亮,张素琴,等. 低盐固态发酵酱油生产过程中大豆 DNA 降解变化[J]. 江苏农业科学,2022,50(24):147-150.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.24.022

低盐固态发酵酱油生产过程中大豆 DNA 降解变化

姚 芹¹,于亮亮¹,张素琴¹,宋 浩²

(1. 苏州农业职业技术学院/江苏省食品安全快速检测工程技术研究开发中心/

江苏省高等职业教育产教深度融合实训平台,江苏苏州 215008; 2. 苏州市农业农村局,江苏苏州 215200)

摘要:为研究酱油生产过程中大豆 DNA 降解情况,为酱油生产不同阶段大豆转基因成分检测提供引物序列和检测方法,用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取大豆和蒸煮后大豆 DNA,针对内源大豆凝集素基因和外源抗草甘膦基因设计引物进行 PCR 扩增;用试剂盒提取成熟酱醅、生酱油和酱油中的 DNA,进行 PCR 扩增或巢式 PCR 扩增。结果表明,高温高压蒸料后大豆 DNA 片段长度降解到 1 500 bp 以下,发酵后的酱醅中检测不到 500 bp 左右大豆 DNA 片段。生酱油和成品酱油经大豆 DNA 提取和 PCR 扩增未见条带,用巢式 PCR 扩增可以检测到 200 bp 以下的内源基因、外源基因 DNA 片段。低盐固态发酵酱油生产过程中造成 DNA 片段长度降解的 2 个主要工艺是蒸煮和发酵,淋油过程去除了大量大豆 DNA,成品酱油可用巢式 PCR 进行转基因成分检测。

关键词:低盐固态发酵酱油;DNA 降解;不同生产工艺;外源基因检测;巢式 PCR

中图分类号:TS264.2⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)24-0147-04

我国《农业转基因生物安全管理条例》要求严格农业转基因生物流向监管,严禁改变用途。为了检测酱油酿造原料是否为转基因大豆或酱油中是否含有大豆转基因成分,为监管提供依据,目前国内一些研究者开展了酱油中大豆内源基因、外源基因成分检测方面的研究。张文志等比较了 PCR 法和实时荧光定量 PCR 法检测酱油中抗草甘膦大豆转基因多种成分的优缺点^[1]。邵碧英等采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀法提取酱油 DNA,再用 SYBR Green I 荧光 PCR 检测出了大豆 *Lectin* 基因^[2]。宋君等通过定性 PCR 法对成都市场进行酱油等大豆深加工产品外源基因检测^[3]。陈笑芸等用不同方法提取酱油中大豆 DNA,并对方法进行了比较^[4]。叶蕾等建立起了检测豆腐、豆奶粉、酱油等大豆制品中转基因成分的定性环介导等温扩增反应(LAMP)方法^[5]。

核酸是生物大分子,不同生产工序如粉碎、搅拌、混合、萃取、浸提;不同作用如酶解作用、微生物

发酵等都有可能造成 DNA 片段的降解^[6-12]。陈颖等研究发现,在豆奶等大豆制品加工过程中,大豆原料中能检测到内源基因 *Lectin* 1 883 bp 长度片段,但均质、磨浆、煮浆等工艺使 *Lectin* 基因降解至 1 000 bp 以下,最终豆奶和豆腐中 *Lectin* 基因片段降解到 200 bp 以下^[13]。Peano 等的研究表明,薄脆饼干和豆腐中只能分别检测出 391、169 bp 的 *Lectin* 基因片段^[14]。Bauer 等对豆奶和豆腐的 DNA 降解情况进行了分析,结果表明在煮沸生豆奶 10 min 时,大豆 DNA 片段从 1 417 bp 降到 1 339 bp^[15]。王卫国等研究发现,与超高压处理相比,微波处理对大豆外源基因的降解更有效^[16];梁杉等研究了转基因豆粕加工成饲料过程中外源基因调控原件的变化,发现 *CaMV35S* 启动子稳定性高于 *NOS* 终止子^[17]。蒋亦武利用少孢根霉和纳豆芽孢杆菌模拟发酵过程,发现发酵作用对内、外基因的降解不太明显,只有持续较长的时间才会发生降解^[18],但目前没有有关酱油生产过程 DNA 降解或变化的文献报道。本研究选择低盐固态发酵酱油为对象,提取酱油不同生产工艺后的大豆 DNA,利用合适引物进行 PCR 和巢式 PCR 扩增,研究低盐固态发酵酱油生产过程中大豆 DNA 降解和去除情况,以期对酱油转基因成分检测提供依据。

收稿日期:2022-03-02

基金项目:苏州市农业农村局农村智库研究项目;江苏省高等学校大学生创新创业训练项目(编号:202212808012y);苏州农业职业技术学院青年教师科研能力提升计划(编号:19QN1002)。

作者简介:姚 芹(1981—),女,江苏如皋人,硕士,副教授,主要从事食品生物化学研究。E-mail:243027483@qq.com。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抗草甘膦转基因大豆:笔者所在实验室保存;转基因酱油:由连云港市双程酿造食品有限公司提供(该公司生产的酱油大豆原料全部为非转基因豆粕,本试验用到的酱油生产原料转基因豆粕是笔者实验室提供,委托该公司用低盐固态发酵法酿造);DNA 提取试剂盒、深加工食品 DNA 提取试剂盒,购自北京百奥莱博科技有限公司;2 × PCR Master Mix (2 × *Taq* DNA Polymerase、2 × PCR Buffer、2 × dNTPs) 购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司;D2000 DNA Ladder Marker 购自上海捷瑞生物工程有 限 公 司 ; 引 物 由 生 工 生 物 工 程 (上 海) 股 份 有 限 公 司 合 成 。 试 验 时 间 : 2 0 1 9 年 1 0 月 至 2 0 2 1 年 5 月 。 试 验 地 点 : 苏 州 农 业 职 业 技 术 学 院 食 品 科 技 学 院 。

1.2 仪器与设备

PCR 仪:Mastercycler ep,购自 Eppendorf 中国有 限 公 司 ; 凝 胶 成 像 系 统 : W D - 9 4 1 3 D 型 一 体 式 凝 胶 成 像 系 统 , 购 自 北 京 六 一 生 物 科 技 有 限 公 司 。

1.3 试验条件

1.3.1 大豆、蒸料后大豆基因组 DNA 的提取 采 用 CTAB 法提取大豆基因组 DNA。

1.3.2 生酱油、酱油预处理 参照张文志等的方法^[1]对生酱油和酱油进行预处理,预处理的目的是为了去除酱油中的焦糖色及盐等小分子物质。

1.3.3 成熟酱醅、生酱油、酱油中大豆 DNA 提取 取研碎的成熟酱醅 100 mg 或预处理好的生酱油、酱 油 样 品 , 参 照 深 加 工 食 品 DNA 提 取 试 剂 盒 (北 京 百 奥 莱 博 科 技 有 限 公 司) 操 作 说 明 提 取 大 豆 DNA 。

1.3.4 PCR 引物信息 试验中所用 PCR 引物信息 见表 1。

表 1 引物信息

引物名称	序列 (5'→3')	扩增片段大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>Lectin-1</i> (<i>L1</i>)	F:CAATGCCATCGTATCGTGTC;R:GCGATCGAGTACTGAGAGTGG	1 883	60
<i>CP4EPSPS-1</i> (<i>C1</i>)	F:GGCGAGGACGTCATCAATAC;R:TCGATCCCCGATCTAGTAACA	1 512	55
<i>Lectin-2</i> (<i>L2</i>)	F:CTTCGCCGCTTCCTTCAAC;R:GAGTCCCGTGGCAGCAGAG	475	65
<i>CP4EPSPS-2</i> (<i>C2</i>)	F:CCTTCATGTTTCGGCGGTCTCG;R:GCGTCATGATCGGCTCGATG	493	56
<i>Lectin-3</i> (<i>L3</i>)	F:TCAAAGTTGAAAACCCAGAA;R:TGTTTGTGGCTTAGTGTCAA	396	45
<i>CP4EPSPS-3</i> (<i>C3</i>)	F:GCACAATCCCACTATCCTT;R:GCTGAAATCCTAAAGGAACA	300	51
<i>Lectin-4</i> (<i>L4</i>)	F:GCCCTCTACTCCACCCCATCC;R:GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG	118	62
<i>CP4EPSPS-4</i> (<i>C4</i>)	F:CGACATCGAAGTCATCAACC;R:TTCTTCCAGACCGTTTCATCA	190	55

1.3.5 大豆、蒸料后大豆、成熟酱醅中大豆 DNA PCR 扩增 25 μL 反应体系:2 × PCR Mix 12.5 μL, 上游、下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 1.0 μL,ddH₂O 10.5 μL。扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变 性 30 s,退火温度见表 1,退火时间均为 30 s,72 ℃ 延伸 45 s;72 ℃ 终延伸 7 min。

1.3.6 生酱油中大豆 DNA PCR 扩增 25 μL 反应 体系:2 × PCR Mix 12.5 μL,上游、下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 4.0 μL,ddH₂O 7.5 μL,扩增程序 同“1.3.5”节。

1.3.7 生酱油、酱油中大豆 DNA 巢式 PCR 扩增 *Lectin* 基因第 1 轮扩增:25 μL 反应体系,2 × PCR Mix 12.5 μL,*Lectin-3*F、*Lectin-3*R 为上游、下游 引物,各 0.5 μL,DNA 模板 4.0 μL,ddH₂O 7.5 μL。*Lectin* 基因第 2 轮扩增:取 1.0 μL 第 1 轮 PCR 产物 为模板,*Lectin-4*F、*Lectin-4*R 为上游、下游引物,

各 0.5 μL,2 × PCR Mix 12.5 μL,ddH₂O 10.5 μL。 扩增程序同“1.3.5”节。

CP4EPSPS 基因第 1 轮扩增:25 μL 反应体系, 2 × PCR Mix 12.5 μL,*CP4EPSPS-3*F、*CP4EPSPS-3*R 为上游、下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 4.0 μL, ddH₂O 7.5 μL。*CP4EPSPS* 基因第 2 轮扩增:取 1.0 μL 第 1 轮 PCR 产物为模板,*CP4EPSPS-4*F、 *CP4EPSPS-4*R 为上游、下游引物各 0.5 μL,2 × PCR Mix 12.5 μL,ddH₂O 10.5 μL。扩增程序同“1.3.5”节。

2 结果与分析

2.1 蒸料后大豆 DNA PCR 扩增结果

发酵前原料的预处理包括破碎、润水、蒸料等 步骤,目的是使得大豆中蛋白质变性。蒸料后原料 中检测不到大豆较长的 DNA 片段(1 883、1 512 bp) (图 1)。蒸料过程压强为 0.18 MPa,温度是

125 ℃, 保压时间为 5 min。真核生物中 DNA 和蛋白质紧密结合形成染色质, 蛋白质空间结构解体或变化会导致 DNA 片段的降解。大豆原料预处理中机械剪切力、高温高压等综合因素造成了大豆中蛋白质变性从而较长 DNA 片段发生降解, 这与 Tian 等的结论^[19-20]一致。

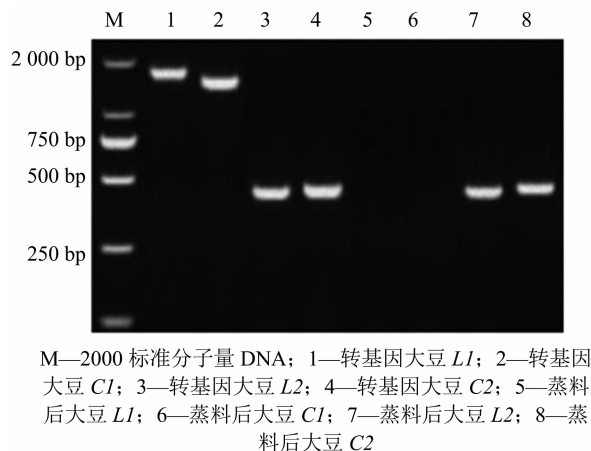
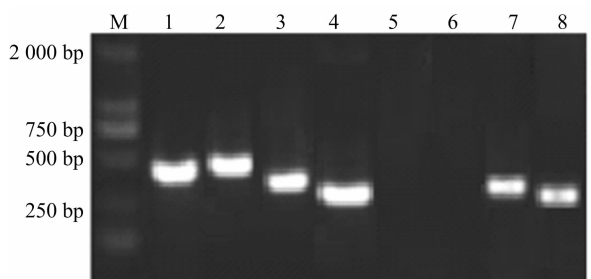


图1 蒸料后大豆 DNA PCR 扩增电泳

2.2 成熟酱醅中大豆 DNA PCR 扩增结果

成熟酱醅是酱油生产原料经过制曲、发酵后的产物。酱油发酵过程起作用的微生物有酵母菌和制曲、发酵过程中自然落入的有益微生物, 这些微生物产生的核酸酶对 DNA 有降解作用。Pan 等发现, miso(日本豆面酱)的制作过程经过 120 d 的发酵后, 无法检测到 35 S 启动子, 且 DNA 片段降解到 200 bp 以下^[21]。从图 2 可以看出, 成熟酱醅中内外源基因 475、495 bp 左右的 DNA 片段已经降解, 但仍能检测到 396、300 bp 左右的 DNA 片段。这是由于低盐固态酱油发酵时间较短, 为 15~20 d, 故发酵后酱醅中仍能检测到 400 bp 左右的 DNA 片段, 这与蒋亦武提出的大豆 DNA 片段的降解程度与发酵时间长短有关的结论^[18]是一致的。



M—2000 标准分子量 DNA; 1—转基因大豆 L2; 2—转基因大豆 C2; 3—转基因大豆 L3; 4—转基因大豆 C3; 5—成熟酱醅 L2; 6—成熟酱醅 C2; 7—成熟酱醅 L3; 8—成熟酱醅 C3

图2 成熟酱醅中大豆 DNA PCR 扩增电泳

2.3 生酱油中大豆 DNA PCR 和巢式 PCR 扩增结果

笔者曾探索过利用不同文献中 DNA 提取方法提取生酱油中大豆 DNA 并进行 PCR 扩增, 但都未见扩增条带, 与张文志等的研究结果^[1]不符, 这可能是由于本研究选取了低盐固态发酵酱油作为研究对象, 发酵后的酱醅为固态, 利用浸泡和过滤的方法淋油时, 浸出过程相对分子量小的物质如氨基酸、葡萄糖等容易浸出, 但大部分核酸残留在酱渣而没有转入到生酱油中, 导致生酱油中 DNA 浓度很低, 微量 DNA 作为模板普通 PCR 无法扩增^[1-3]。巢式 PCR 可以用来解决模板 DNA 量少普通 PCR 无法扩增检测的问题, 经常用于农产品或食品转基因成分检测^[22-25]。本研究经过巢式 PCR 反应内外源基因, 分别扩增出 118、190 bp 的片段(图 3)。巢式 PCR 第 2 轮扩增的模板是第 1 轮扩增的产物, 第 2 轮扩增后琼脂糖凝胶电泳能检测出清晰条带, 说明第 1 轮扩增有产物, 证明生酱油中仍然存在 390、300 bp 左右的内外源基因片段, 总体来说淋油的过程不会造成大豆 DNA 片段长度的降解, 但会造成生酱油中大豆 DNA 量降低。

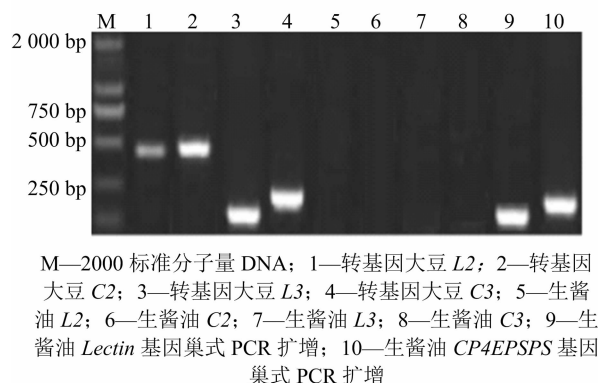


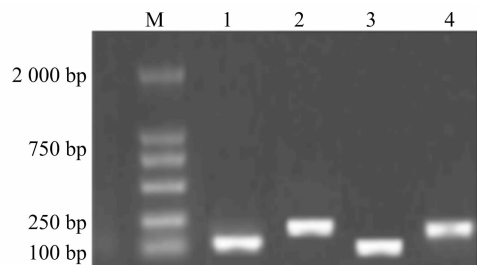
图3 生酱油中大豆 DNA PCR 扩增电泳

2.4 酱油中大豆 DNA 巢式 PCR 扩增结果

生酱油经过 80~90 ℃, 保持 20 min 加热灭菌后成为成品酱油。较低的灭菌温度没有造成成品酱油 390、300 bp 左右的内外源基因片段降解, 巢式 PCR 反应内外源基因能分别扩增出 118、190 bp 的片段(图 4), 可以用于成品酱油的转基因成分检测。

酱油属于深加工调味品, 要经历蒸料、发酵、浸淋、加热灭菌、配兑等一系列复杂的工艺过程, 本研究经过适当的 DNA 提取过程后仍然可以用 PCR 或巢式 PCR 对成品进行转基因成分检测, 其中有一个很重要的原因是, 为了调味和防腐整个酱油酿造过

程都要保持比较高的盐浓度,成品酱油中氯化钠的含量不低于 15 g/100 mL,DNA 在高盐溶液中溶解度大,这也是即使经历了深加工过程,但不需要利用实时荧光定量 PCR 等敏感度更高的检测手段也能对酱油中转基因成分进行检测的原因。



M—2000 标准分子量 DNA; 1—转基因大豆 *L3*; 2—转基因大豆 *C3*; 3—酱油 *Lectin* 基因巢式 PCR 扩增; 4—酱油 *CP4EPSPS* 基因巢式 PCR 扩增

图4 酱油中大豆 DNA PCR 扩增电泳

3 结论

本研究探究了低盐固态发酵酱油生产过程中大豆 DNA 的变化情况,结果表明,酱油生产经历蒸料、发酵工艺后,大豆 DNA 片段长度发生降解,最终成品酱油内源基因、外源基因 DNA 片段长度均降至 500 bp 以下。低盐固态发酵酱油由于浸出工艺的特点导致生酱油和酱油中大豆 DNA 含量极微,普通 PCR 无法扩增,但巢式 PCR 可以检测到内外源基因片段。本研究结果可为酱油生产不同阶段转基因成分检测提供引物和 PCR、巢式 PCR 检测依据。

参考文献:

- [1] 张文志,鲁 绯,闫 红. 酱油中抗草甘膦大豆转基因多种成分的检测:实时荧光定量 PCR 和传统 PCR 的比较[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):372-376.
- [2] 邵碧英,王德峰,傅碧忠,等. 酱油、烤鳗酱油 DNA 提取及原料成分的荧光 PCR 检测[J]. 食品科学,2009,30(22):240-243.
- [3] 宋 君,牛 蓓,王 东,等. 成都市场大豆酱油 rDNA 成分分析[J]. 西南农业学报,2010,23(6):2158-2160.
- [4] 陈笑芸,汪小福,周 育,等. 转基因大豆深加工食品 DNA 鉴定技术研究[J]. 中国食品学报,2013,13(4):156-162.
- [5] 叶 蕾,沈会平,闫 鹤,等. 实时浊度 LAMP 法检测豆制品中转基因成分[J]. 食品与发酵工业,2012,38(8):150-156.
- [6] 刘艳艳,董书光,耿加亮,等. 阿胶加工工艺过程中 DNA 降解规律研究[J]. 药学研究,2016,35(9):501-507.
- [7] 赵文秀,潘海云,王锡昌,等. 用于分子溯源的鱼糜 DNA 随加工过程的质量变化分析[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):767-772.
- [8] 黄娅琳. 高温烹饪对动物肌肉组织 DNA 降解的影响[J]. 四川动物,2012,31(2):222-225.
- [9] 王卫国,过世东. GM 饲料 DNA 在加工和畜禽消化道中的降解:转基因饲料安全性评价[J]. 粮食与饲料工业,2004(10):38-40.
- [10] 李星鑫,付一帆,周 宇,等. 不同热力灭菌条件对锦橙汁品质的影响及其 DNA 稳定性分析[J]. 食品科学,2012,33(5):109-113.
- [11] Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products[J]. European Food Research and Technology,2002,214(1):3-26.
- [12] Yamaguchi H, Sasaki K, Umetsu H, et al. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan[J]. Food Control,2003,14(3):201-206.
- [13] 陈 颖,王 媛,徐宝梁,等. 食品加工工艺对大豆内源基因降解变化规律的影响[J]. 中国粮油学报,2005,20(4):60-64.
- [14] Peano C, Samson M C, Palmieri L, et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(23):6962-6968.
- [15] Bauer T, Weller P, Hammes W P, et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food[J]. European Food Research and Technology,2003,217(4):338-343.
- [16] 王卫国,朱占齐,吴兴泉. 微波、超高压处理对转基因大豆外源基因降解的影响[J]. 中国粮油学报,2015,30(2):20-25.
- [17] 梁 杉,梁 宁,蒋继志,等. 转基因豆粕调控元件在饲料加工中降解变化的初步研究[J]. 华北农学报,2009,24(2):201-205.
- [18] 蒋亦武. 转基因大豆发酵制品在发酵过程中内、外源基因变化规律的研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [19] Tian F, Guan Q F, Wang X M, et al. Influence of different processing treatments on the detectability of nucleic acid and protein targets in transgenic soybean meal[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2014,172(7):3686-3700.
- [20] Bergerová E, Goddállová Z, Siekel P. Combined effects of temperature, pressure and low pH on the amplification of DNA of plant derived foods[J]. Czech Journal of Food Sciences,2011,29(4):337-345.
- [21] Pan T M, Shih T W. Detection of genetically modified soybeans in miso by polymerase chain reaction and nested polymerase chain reaction[J]. Journal of Food and Drug Analysis,2020,11(2):154-158.
- [22] 闫 伟,李葱葱,夏 蔚,等. 应用单管巢式和半巢式 PCR 检测转基因玉米 MON89034[J]. 玉米科学,2016,24(4):56-60.
- [23] 闫 伟,徐桢惠,龙丽坤,等. 应用单管半巢式 PCR 技术筛查转基因食品[J]. 食品科学,2015,36(2):194-197.
- [24] 彭新凯,宋涛平,谭 舸,等. 巢式 PCR 和 SYBR Green I 实时 PCR 检测转基因大豆方法的研究[J]. 中国农学通报,2012,28(15):233-237.
- [25] 敖金霞,高学军,于艳波,等. 转基因大豆、玉米、水稻深加工产品的五重巢式 PCR 技术检测[J]. 中国农业大学学报,2010,15(2):93-99.