



有效运用ATP+ADP+AMP荧光检测（A3法）进行过敏原管理

龟甲万百欧凯米发株式会社 企划开发部 企划开发小组 志賀 一樹

前言

近年来，在食品生产中，除了依据原料信息制作适当的标签外，防止过敏原污染的工序管理对于过敏原管理也很重要。

例如，2014年10月14日，日本厚生劳动省颁布的《食品经营者经营管理基本方针（指引）》中明确指出“必须采取措施防止原料中未使用的过敏物质混入生产工序”。而且，国际上被广泛使用的HACCP也将过敏原视为化学危害物质之一，对其进行危害分析。此外，在ISO 22000和FSSC 22000等食品安全管理体系中，ISO/TS 22002-1:2009第10条“交叉污染的预防措施”中10.3也要求“进行过敏原管理”。因此，食品生产中过敏原的管理不仅在产品检查，甚至在工序管理中也变得非常重要。

生产过程中对过敏原进行管理，最理想的做法是不将过敏原带入工厂，若需带入时，则应在隔离的专用生产线上进行生产。但是，一般来说同一条生产线会生产多种产品，仅采取上述措施的话，过敏原管理会受到很大的限制。因此，生产过程中的清洗管理对防止过敏原污染尤为重要。

本文将以“如何在生产过程的清洗管理中有效运用ATP+ADP+AMP荧光检测（A3法）来防止过敏原污染”为观点进行介绍。

过敏原管理中的涂抹检测

消费者事务管理局指定了筛选检测（ELISA法）和确认检测（Western blot法、PCR法）作为检测食品过敏原的方法。政府机构通过这些检测来确认过敏原表现的一致性。但是，这些检测操作步骤繁琐、耗时长，不适用于确认清洗效果等快速检测的需要。并且还需要专业的技术和设备，日常实施起来比较困难。因此，在过敏原的工序管理中通常会采用各种涂抹检测法。

表1中总结了多数食品企业采取的各种涂抹检测法的特点。生产工序中的涂抹检测注重快速性和简单性。如果不能快速获得结果，则无法及时采取重新清洗等对策。此外，若检测方法复杂且操作者不能在生产现场进行，则很难将其用于工序管理中。就这一点，涂抹检测法的ELISA法若要在工序管理中使用则存在明显的缺点。

可快速、简单地识别过敏原的免疫层析法是一种有效的检测方法，但该方法存在成本高且无法数值化等问题。而且，若未对目标过敏原开发相应的免疫层析法，则有可能无法使用该方法。

虽无法识别过敏原，但可以利用ATP荧光检测和蛋白质检测法来确认食物残留。ATP荧光检测是一种利用萤火虫发光的原理（荧光素酶与ATP反应发光），并将对应发光量强度的污垢指标的ATP量转化为数值的检测方法。ATP是一种存在于所有植物、动物和微生物中的物质，当然也存在于食物中，因此可通过检测ATP来确认是否有食物残留。由于食物残渣的含量与ATP及过敏原的含量相关，ATP荧光检测虽然无法识别过敏原，但可以间接检测过敏原的含量（图1）。

但是，ATP会通过代谢、加热、酸和碱等物质分解为ADP，再分解为AMP。根据食材种类、状态或者环境因素，ATP经常会分解为ADP或AMP。因此，单纯检测ATP的话可能会导致检测灵敏度不足。因此龟甲万百欧凯米发株式会社通过将AMP转换为ATP的PPDK（丙酮酸磷酸双激酶）和将ADP转换为ATP的PK（丙酮酸激酶）两种酶的组合（图2），推出了世界上第一种同时检测ATP+ADP+AMP（A3）的方法，并于2017年4月发售了“Luci-Pac A3 Surface/Water”（照片）。使用A3法，任何人可随时随地在10秒钟左右获得检测结果，所以A3法被众多食品企业所使用。

	A3法	ELISA法	免疫层析法	蛋白质检测法
快速性	◎	×	○	○
简单性	◎	×	○	◎
数值化	○	○	×	△
识别过敏原	×	○	○	×
费用	○	×	×	◎

表1 各种涂抹检测法的特点

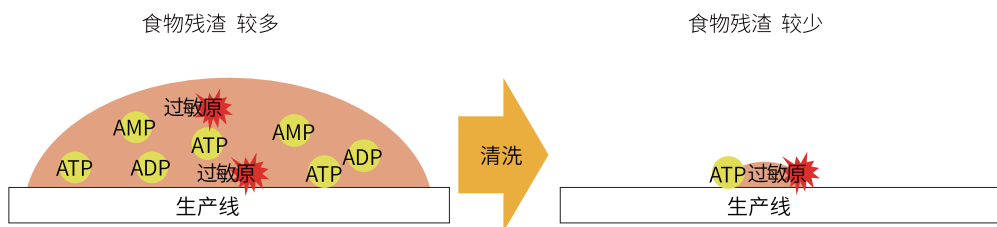
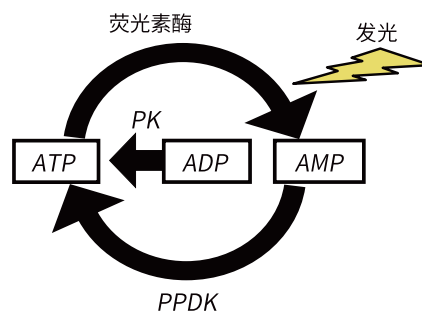


图1 食物残渣中的ATP、ADP、AMP与过敏原的相关性。如果食物残渣很少，则ATP、ADP、AMP和过敏原的含量都较低。



照片 检测仪Lumitester PD-30（左）和LuciPac A3 Surface/Water



PK: 将ADP转换成ATP的酶
PPDK: 将AMP还原成ATP的酶

图2 ATP循环转换法及A3法的原理

通过A3法检测过敏原食材

首先跟大家说明一下使用A3法对过敏原食材的检测水平。

将各种食材用10倍的水均质后制备成溶液(食材含量=1/10的稀释样品)，再分别用水进行10倍梯度稀释，然后添加0.1mL样本溶液至LuciPac A3 Surface附带的棉棒上进行检测。检测1/10稀释样品时，棉棒上包含1mg的食材。

表2是必须标记在包装上的7种致敏物的数据。A3法的检测值是约1mg食材的检测结果。本检测取3个以上10倍梯度稀释的样品数据来制作标准曲线，然后根据标准曲线计算出检测值为100RLU的食材含量。在A3法中，100RLU是作为管理标准之一的基准值。即使每100RLU的食材量很少，也可以灵敏地检测出过敏原。

由于ATP、ADP和AMP的含量会因食材而异，因此，1mg的检测值也会因食材而有所不同。例如，检测花生含量1mg的样品稀释液时，检测值为235,073RLU，由系列稀释计算出每100RLU的食材量为0.42μg。需要注意的是，该数值为食材总量，而不是过敏原的含量。

表3归纳了20种致敏物的标准数据。在实际的食品生产线中，很少会使用单一的食材，而是使用多种食材来生产产品。多种食材来源的ATP、ADP和AMP残留在生产线上，若检测结果为100RLU，则预测残留量低于表2和表3中所示的食材量。但是，由于ATP、ADP和AMP的含量会因食材的个体差异或状况等各种因素而发生变化，因此，该检测结果仅供参考。

与蛋白质涂抹检测法的比较

利用蛋白质显色反应的蛋白质涂抹检测法，是一种简单且性价比高的多种残留过敏原检测方法。对此，笔者使用A3法与市售蛋白质涂抹检测法对牛奶、花生和虾的过敏原检测值进行了比较。

采用与上述相同的方法，将牛奶、花生和虾分别用10倍的水均质后制备成溶液，再进行10倍梯度稀释，然后分别添加0.1mL溶液到A3法和蛋白质涂抹检测法的棉棒上进行检测。蛋白质涂抹检测法使用了三家不同公司的产品。

根据蛋白质涂抹检测法，1mg牛奶、0.1mg虾和花生的检测结果均为阳性。另一方面，根据A3法，1mg牛奶的检测值为400RLU，0.001mg虾和花生的检测值中，虾在2,000RLU以上，花生在200RLU以上(表4~表6)。

由此可见，在这些食材中，A3法能比蛋白涂抹检测更灵敏地检测出含过敏原的食材。

生产线中A3法的有效运用

在Saitama Kikkoman Co.,Ltd.(龟甲万欧凯米发(株)同集团下的兄弟公司)的协助下，笔者获得了A3法实际运用于生产线中的数据统计表。Saitama Kikkoman Co.,Ltd.主要生产“家常菜”系列(日式家常菜的调味酱料)等软罐头产品。拥有约100名员工，产能约为每天100,000份。

食材	每1 mg食材的检测值 (RLU)	每100RLU的食材量 (μg)
鸡蛋	1,674	59.6
牛奶	425	247.9
小麦	524	191.1
花生	235,073	0.42
虾*	274,581	0.04
荞麦	11,127	9.0
螃蟹	17,173	5.8

※ 每0.1mg食材量的检测值

表2 7种致敏物的A3法检测数据

食材	每1mg食材的检测值 (RLU)	每100RLU的食材量 (μg)
三文鱼籽	9,228	10.8
青花鱼	493,078	0.20
鲑鱼	588,697	0.17
墨鱼※1	138,864	0.07
鲍鱼※1	233,280	0.04
黄豆	134,412	0.74
核桃	5,519	17.9
腰果	1,274,530	0.78
芝麻	232,716	0.43
山药	116,612	0.86
鸡肉	8,122	12.9
猪肉	7,816	13.3
牛肉	5,083	19.7
猕猴桃	30,806	3.26
香蕉	35,223	2.86
橙子	2,105	47.3
桃子	7,478	13.3
苹果	29,297	3.41
松茸	125,122	0.81
明胶※2	141	454.8

※1 每0.1mg食材的检测值 ※2 每0.5mg食材的检测值

表3 20种致敏物的A3法检测数据

使用牛奶、小麦和大豆为原料的“家常菜”系列——“德国风味马铃薯”的生产工序由4个步骤组成:加热混合→装袋→杀菌消毒→枕式包装(图3)。

本文将通过ELISA法为大家介绍在加热混合过程中使用的调配罐和灌装机清洗前后残留的牛奶过敏原用A3法评估的数据。

(1) 采样点

检测点设定为调配罐入口、调配罐内壁、调配罐的搅拌器叶片等调配罐四周，食材装入调配罐时使用的刮刀和网筛以及灌装机的仓斗、注料嘴和包装容器。分别在各检测点清洗前、温水清洗后及最终清洗后进行3次检测。

(2) A3法及牛奶过敏原含量的检测

使用LuciPac A3 Surface来检测牛奶过敏原含量，首先使用Pro-media ST-25 PBS (Elmex Co.,Ltd.) 附带的棉

食材量 (mg)	A3法检测值	蛋白涂抹检测法		
		A公司	B公司	C公司
1	439	+	±	—
0.1	52	—	—	—
0.01	14	—	—	—

表4 以牛奶为检测对象，比较A3法和蛋白质涂抹检测法

食材量 (mg)	A3法检测值	蛋白涂抹检测法		
		A公司	B公司	C公司
1	超标	++	+	+++
0.1	289,803	—	—	+
0.01	32,149	—	—	—
0.001	2,806	—	—	—
0.0001	347	—	—	—

表5 以虾为检测对象，比较A3法和蛋白质涂抹检测法

食材量 (mg)	A3法检测值	蛋白质涂抹检测法		
		A公司	B公司	C公司
1	235,073	++	+	+++
0.1	25,641	—	—	±
0.01	2,476	—	—	—
0.001	294	—	—	—

表6 以花生为检测对象，比较A3法和蛋白质涂抹检测法

棒涂抹检测点，并浸入到5mL PBS中进行提取。PBS溶液中的牛奶过敏原含量则使用FASTKIT ELISA ver.II (牛奶) (NH Foods Ltd.制造) 进行检测。

(3) 结果

图4表示了A3法的检测值与ELISA法检测的牛奶过敏原含量之间的关系。

从清洗前到温水清洗，再到最终清洗(碱性清洗+二次温水清洗)的过程中，牛奶过敏原含量和A3法的检测值不断降低，最终清洗后牛奶过敏原含量降低至0.1μg以下。

此时，A3法的检测值均小于100RLU。如果基准值控制在100RLU，最终清洗后的残留过敏原为0.1μg，则表明生产过程中的过敏原管理已达标。综上，利用A3法确认生产线的清洗度对过敏原管理也是有效果的。

将A3法引入清洗管理时存在两个问题:如何设定检测点以及基准值。

关于检测点的设定，最理想的情况是先将所有可能混入过敏原的地方都设为检测对象。特别是在分步清洗时，只要对清洗过程进行一次监控，就能把握难以清洗或简单清洗无法降低检测值的地方。此类场所应重点管理。

根据文中的数据，调配罐内壁用温水清洗后的检测值低于100RLU，但灌装机注料嘴用温水清洗后的检测值高于10,000RLU。拆卸注料嘴并进行最终清洗后，检测值降为



图3 Saitama Kikkoman Co.,Ltd.的外观及“家常菜”系列的主要生产工序

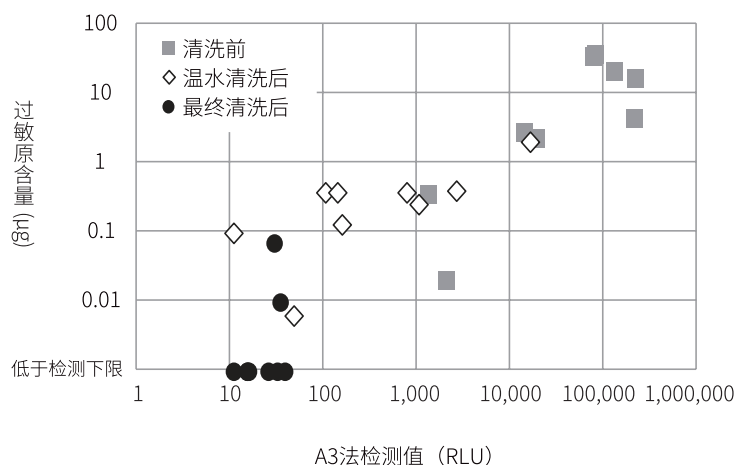


图4 A3法检测值与ELISA法检测出的牛奶过敏原含量的关系

35RLU, 即可确认注料嘴已清洗干净。

另外, 关于基准值的设定, 检测值低于100RLU, 即可认为清洗已达标。但实际上, 建议大家最好通过ELISA或其他检测方法进行验证后再设定基准值。

结语

在过敏原管理中, 本文从如何有效运用A3法角度出发, 介绍了A3法可以检测的食材量以及实际生产线中清洗前后的数据。

A3法虽然无法识别出过敏原, 但可以简单且快速地以高灵敏度检测出食物残渣, 并将清洗程度数据化。因此, 为防止过敏原混入, A3法作为日常清洗效果的确认工具是非常有效的。

当场可把检测结果数据化, 对清洗不足而言, 除了可尽早采取重新清洗等措施, 还能有效提高员工的卫生意识。实际上, 很多生产现场都在使用A3法来提高员工的卫生意识。

建立过敏原的管理体制, 确立安全且高效的食品生产工序, 对于很多食品生产企业来说都是一项重要的课题。衷心希望本文及A3法能有助于食品生产企业解决这类课题。

kikkoman

龟甲万百欧凯米发株式会社
(Kikkoman Biochemifa Company)

地址: 日本东京都港区西新桥2-1-1

Tel: +81-3-5521-5481 Fax: +81-3-5521-5498

E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

URL: https://biochemifa.kikkoman.co.jp/c/