

超声处理对食物过敏原影响的研究进展

Recent studies on the effect of ultrasonic treatment on food allergens

舒二连 钮冰 陈沁

SHU Er-lian NIU Bing CHEN Qin

(上海大学生命科学学院, 上海 200444)

(College of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

摘要: 研究介绍了食物过敏原及其致敏机理, 综述了花生、大豆、牛奶、虾、鸡蛋和猕猴桃的主要过敏原在超声处理上的研究进展, 并展望了超声处理在降低食物致敏性的研究方向。

关键词: 超声处理; 食物过敏; 过敏原; 致敏性; 蛋白质

Abstract: This review introduced the food allergens and their sensitization mechanism, and summarized the research progress of peanut, soybean, milk, shrimp, egg and kiwifruit allergens in ultrasound treatment. Moreover, the research direction of ultrasound treatment in reducing food sensitization was also prospected.

Keywords: ultrasound treatment; food allergies; allergens; allergenicity; protein

食物过敏是一种由食物蛋白抗原引起的常见过敏反应, 它是一种特异性的免疫反应, 常常会产生一系列危害人体消化、皮肤、呼吸甚至是心血管系统的症状, 但是食物不耐受和各类中毒反应并不包含在内。

食物过敏的发病率存在地区差异。在美国, 有关流行病学调查^[1]表明: 食物过敏的发病率逐年上升, 其中约有 8% 的儿童和 4% 的成人有食物过敏症状, 儿童的发病率普遍高于成人, 且部分地区的食物过敏患病率已经达到 10%。在中国, 一项包含 31 个城市在内的数据调查^[2]显示, 14 岁以下儿童有 5.83% 的人食物过敏, 其中学龄前儿童(3~5 岁)患病率最高, 达到 6.65%, 食物过敏患病率在不同城市及不同年龄段儿童中有着显著差异, 青岛食物过敏的患病率最高为 9.11%, 拉萨最低为 2.33%。

目前, 消费者只能通过避免或减少接触和消费含过敏原的食品, 从而避免食物过敏。现有研究^[3-5]表明, 常见的加工方式能有效降低食物致敏性, 但食物本身的风

味无法得到保证。而超声处理作为一种非热加工方式, 可通过改变过敏蛋白的结构来降低食物致敏性, 且对食物的感官特性和营养特性破坏较少。研究拟介绍几种食物的主要过敏原, 并回顾总结超声处理对其致敏性的影响, 以期降低食物致敏性的相关研究提供参考和理论依据。

1 食物过敏原及致敏机理

食物过敏原是易过敏人群摄入后引起过敏反应的物质, 该类物质是天然存在或者人为添加到普通食物中的。食物过敏原的本质是蛋白质或者糖蛋白, 其相对分子质量一般在 10~70 kDa, 可分为主要过敏原与次要过敏原, 大多数患者的过敏是主要过敏原引起的。在联合国粮食及农业组织公布的常见过敏食物中, 90% 是由牛奶、鸡蛋、大豆、花生、小麦、坚果类(包括核桃、榛子、杏仁、腰果、山核桃和开心果等)、鱼类及甲壳类所引起的^[6]。

食物过敏是多种因素共同影响的结果, 除了最直接的遗传因素之外, 还和生活习惯及个人的免疫系统等有关。食物过敏主要有 4 种类型, 分别是 I 型速发过敏反应、II 型细胞毒性过敏反应、III 型免疫复合物过敏反应和 IV 型迟发型过敏反应。由 IgE 介导的 I 型速发过敏反应占了所有食物过敏反应的 90% 以上^[7], 其包括致敏、激发和效应 3 个阶段。

过敏原在致敏阶段首次进入机体后, 刺激 T 细胞分化为 Th2 细胞, Th2 细胞分泌各类细胞因子(如 IL-4、IL-13 等), 进而刺激 B 细胞产生 IgE 抗体, IgE 抗体与肥大细胞(分布在皮肤及内脏黏膜下的微血管周围)和嗜碱性粒细胞(主要分布于外周血中)的表面相结合, 这时的机体处于致敏状态^[8]。健康人群在初次摄入过敏原后, 可以产生耐受性, 不会有过敏反应, 而食物过敏患者的免疫力低下, 再次摄入过敏原后会进入激发阶段, 致敏阶段的肥大细胞和嗜碱性粒细胞被重新激活, 和过敏原特异性结合, 并释放组织胺、白三烯、前列腺素、血小板活化因子等具有生物活性的化合物^[9]。随后, 机体进入效应阶

作者简介: 舒二连, 女, 上海大学在读硕士研究生。

通信作者: 陈沁(1970—), 女, 上海大学教授, 博士。

E-mail: chenqincc@shu.edu.cn

收稿日期: 2022-01-26 改回日期: 2022-07-21

段,激发阶段释放的活性介质开始发挥作用。组织胺可以引起机体打喷嚏、流鼻涕,白三烯的作用强于组织胺,在呼吸道的炎症病变中起着重要作用,前列腺素和血小板活化因子是引发炎症的重要因素,这些物质作用于机体的不同部位后,最终引发全身性的过敏反应。除此之外,机体还会产生一些其他的蛋白分子,如趋化因子、肿瘤坏死因子和 IL-5,这些因子可以激活和聚集嗜酸性粒细胞,从而释放颗粒中的内容物质,最终引发人体的组织损伤和炎症^[10]。

2 超声处理对食物过敏原的影响

超声波是频率高达 20 kHz 的声波,是一种新兴高效的食品加工技术,被广泛应用于均质、切割、提取、微生物或酶的灭活、干燥增强、表面清洁、解聚。超声气泡是由机械波在高能量下以临界气泡尺寸压缩、间歇折射和崩溃而形成的。气泡的内爆导致局部高压达 1.013×10^8 Pa,高温达 5 000 K,这些参数可能会导致过敏原的结构改变^[11]。

大多数食物过敏原是蛋白质,许多研究试图通过改变结构特性来改变其功能特性,这可能会影响相关食物蛋白质的免疫反应性。热加工方式,例如煮沸和烘烤,被认为是通过各种修饰反应改变食物衰减和减轻过敏原的最有效方法,包括肽键的水解和变性、重组二硫键以及与其他成分的相互作用^[12]。然而,食品的感官特性(例如新鲜度、风味、颜色属性)和营养成分会在热处理下受到影响,例如鸡蛋或牛奶的蛋白质变性,糖脱水引起的焦糖化,烘烤产生的气体或水蒸气,高温导致的酶失活^[4-5]。超声处理作为一种非热加工方式,不仅在保持感官特性和改善营养特性(酚类和抗氧化剂)方面显示出许多优势^[13]。现有研究^[14-15]证明,超声处理可以改变一些食物过敏蛋白的结构来降低过敏原与 IgE 的结合能力,从而降低食物过敏原的致敏性。

2.1 花生

从 1925 年第一例花生过敏症被发现到 1981 年 Sachs 等^[16]从花生原料中发现第一个致敏蛋白并命名为 Peanut-I,人们对花生过敏原的研究越来越深入。目前,世界卫生组织—国际免疫学联合会(World Health Organization-International Union of Immunological Societies,WHO-IUIS)收录的花生过敏原共有 17 种类型,分别被命名为 Ara h 1-17^[17-18](见表 1)。

花生的主要过敏原包括 Ara h 1-2、Ara h 3/4 和 Ara h 6,有近 90% 的花生过敏患者血清 IgE 可以识别花生主要过敏原^[19]。Ara h 1 由 3 个相同的 N-糖基化亚基组成,占花生蛋白总量的 12%~16%^[20],是花生中含量最高的过敏原。Ara h 2 占花生蛋白的 6%~9%^[21],是致敏性最强的花生过敏原,可以被大约 90% 的花生过敏个

表 1 花生主要过敏原及其基本特性^[17-18]

Table 1 Main peanut allergens and their basic characteristics

过敏原	所属蛋白种类	分子质量/kDa
Ara h 1	7S 球蛋白(豌豆球蛋白家族)	63~65
Ara h 2	2S 白蛋白	17
Ara h 3/4	11S 球蛋白(大豆球蛋白)	60,37
Ara h 5	抑制蛋白	14
Ara h 6	2S 白蛋白	15
Ara h 7	2S 白蛋白	15
Ara h 8	病程相关蛋白	17
Ara h 9	非特异性脂质转移蛋白 I 型	9.8
Ara h 10	油质蛋白	16
Ara h 11	油质蛋白	14
Ara h 12	防御蛋白	8
Ara h 13	防御蛋白	8
Ara h 14	油质蛋白	17.5
Ara h 15	油质蛋白	17
Ara h 16	非特异性脂质转移蛋白 II 型	8.5
Ara h 17	非特异性脂质转移蛋白 I 型	11

体特异性识别^[22]。Ara h 4 和 Ara h 3 有 90% 的序列重复率,因此 Ara h 4 被看作是 Ara h 3 的同分异构体,它被重新命名为 Ara h 3.0201^[23]。虽然 Ara h 1 和 Ara h 3 是花生中含量最多的过敏原,但是 Ara h 2 和 Ara h 6 的致敏性更强。因此,被广泛应用于食品中花生过敏原的安全检测和花生过敏的组分诊断^[24-25]。

目前的研究认为超声处理主要通过改变花生致敏蛋白的高级结构从而影响致敏性。Jayasooriya 等^[26]研究发现超声处理可以使花生结构松散甚至破坏花生蛋白的肽链。Li 等^[27]使用不同的超声处理时间、胰蛋白酶或 α -胰凝乳蛋白酶的浓度和处理时间实施三因素五水平正交试验设计。通过 BCA 法测定总可溶性蛋白,SDS-PAGE 和夹心 ELISA 评估 Ara h 1 和 Ara h 2 以及竞争性抑制 ELISA 分析花生提取物和 IgE 结合。结果表明,超声处理和花生蛋白酶消化后,显著增加了花生蛋白的溶解度,降低了 Ara h 1 和 Ara h 2 的浓度。通过超声波、胰蛋白酶、 α 糜蛋白酶对花生进行顺序处理后,Ara h 1 和 Ara h 2 含量下降最明显,与 IgE 结合能力最低。该研究提供了一种显著降低花生产品中过敏原蛋白的方法。此外,Zhang 等^[28]通过粒径分布、蛋白质表面疏水性、SDS-PAGE、圆二色光谱和环境扫描电镜分析,评价超声处理对花生分离蛋白(Peanut Protein Isolate,PPI)乳化性能和结构的影响,发现超声波处理可以增加花生蛋白的表面疏水性,同时其乳化性能也得到提高,原因可能是超声作用可以诱导蛋白质折叠,从而导致更多的疏水基团暴露;

超声处理后 PPI 平均粒径从 474.7 nm 降至 255.8 nm, 而分子量不受影响; 内在荧光光谱和表面疏水性的结果表明, 超声处理引起了 PPI 中蛋白质的三级结构发生变化。耿军凤等^[29]超声处理(3.17 W/cm²、30 min、35 °C)花生蛋白后, 其溶解度、持水性和起泡性等功能特性均有所改善; 同时对花生蛋白的结构分析结果表明, 超声波辅助提取的花生蛋白 α -螺旋含量减少, β -转角含量增加, 且花生蛋白分别在 66.2 kDa 和 14.4 kDa 处生成新条带。超声处理可以成为一种改善花生蛋白功能特性的物理改性方法。

2.2 大豆

大豆过敏的发病率稍低于花生, 但大豆作为重要的植物蛋白和油脂来源, 关于其过敏原的研究也有了较大进展。目前有超过 40 种已知的大豆过敏原, 包括 Gly m 1-8、Gly m Bd 28 K(P28)和 Gly m Bd 30 K(P34)等^[30]。Gly m 4、Gly m 5、Gly m 6、P28 和 P34 被认为是大豆的主要过敏原^[31]。Gly m 4 是一种致病相关蛋白, 分子量为 17 kDa, 可溶于水, 对热、酸和蛋白酶的耐受性较弱^[32]。P34、P28 和 Gly m 5 来源于占大豆总蛋白 30% 的 7S 球蛋白。Gly m 5 是 β -伴大豆球蛋白, 分子量为 150~210 kDa, 约占 7S 大豆蛋白组分的 85%^[33]。它包含 3 个亚基, 分别是 α 亚基、 α' 亚基和 β 亚基^[34]。 α 亚基的致敏性最强, 它影响了 25% 的大豆敏感患者^[35]。P34 的分子量为 30 kDa, 约占大豆蛋白的 1%^[36]。约有 65.2% 的大豆过敏患者对其敏感^[30]。P28 的分子量为 28 kDa, pI 为 5.62, 占大豆种子蛋白的含量小于 0.5%^[36]。它包含两个 cupin 结构域并且能被大约 25% 的大豆敏感患者识别^[37]。Gly m 6 来源于占大豆总蛋白 40% 的 11S 球蛋白^[31]。它是一种具有六元结构的大蛋白质, 由 5 个亚基(G1、G2、G3、G4、G5 分子量约为 56, 54, 54, 64, 59 kDa)组成^[38]。每个含有碱性多肽(约 20 kDa)和酸性多肽(约 40 kDa)的亚基通过二硫键连接^[39]。

现有研究认为超声处理主要通过改变大豆致敏蛋白的高级结构从而影响致敏性。孙英杰^[40]使用不同超声条件处理大豆分离蛋白, 其蛋白质空间结构被破坏, 其中对 11S 亚基组分影响较大, 大豆蛋白的功能特性(溶解性、乳化性、持油性等)也发生很大变化。Jing 等^[14]比较在不同功率(150, 300, 450 W)和不同持续时间(12, 24 min)下应用的低频(20 kHz)超声处理对功能和结构特性的影响。研究表明, 除样品 E(300 W, 24 min)外, 其余样品均显示超声处理后, 黑豆分离蛋白(Black-Bean Protein Isolate, BBPI)中 α -螺旋比例降低, β -折叠含量增加。此外, 发射荧光光谱显示超声处理后黑豆蛋白质的三级结构发生了变化, 扫描电镜结果显示, 与未超声处理的 BBPI 样品相比, BBPI 微观结构发生了变化, 并且含有更大的聚集体,

其中中等功率超声处理 24 min 后粒径最小化。超声波处理后 BBPI 分散体的表面疏水性和蛋白质溶解性增强, 增加了蛋白质分子内部疏水相互作用的破坏, 加速了蛋白质的分子运动, 导致蛋白质聚集。然而, 中等功率超声处理通过空化力将 BBPI 分散体破坏成小的可溶性蛋白质聚集体, 从而导致表面疏水性和溶解性增加。Hu 等^[41]分别使用 200, 400, 600 W 的功率在 20 kHz 的超声系统下处理大豆分离蛋白, 结果表明超声处理使蛋白二级结构发生改变, 其溶解性和表面疏水性均升高。王笑宇等^[42]发现超声处理增强了 β -伴大豆球蛋白在水溶液的分散效果, 导致蛋白质表面疏水性改变, 从而增强其乳化性能; 且在功率 200 W 下, 超声处理 15 min, β -伴大豆球蛋白的乳化活性和稳定性均达到最高值。邓涵等^[43]利用不同时间的超声处理对大豆 7S 蛋白的潜在致敏性进行研究, 7S 蛋白经过 40 kHz、300 W 超声强度加工处理 80 min 时, 其三级结构破坏程度最大, 也更易被十二指肠消化, 且消化产物与 IgE 结合能力最低。

2.3 牛奶

牛奶中的所有蛋白质几乎都是过敏原^[44]。牛奶含有两种主要过敏蛋白质, 酪蛋白(80%)和乳清(20%)。 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白是乳清的主要成分。酪蛋白是牛奶中最容易引起过敏的蛋白质, 其次发现是 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白^[45]。Tammineedi 等^[46]高强度超声处理(超声功率 500 W, 超声频率 20 kHz, 处理时间 10, 20, 30 min)酪蛋白和 α -乳清蛋白溶液后, 并没有降低酪蛋白和 α -乳清蛋白的致敏性。Stanic-Vucinic 等^[47]研究了高强度超声对 β -乳球蛋白的结构和致敏性的影响, 在未进行冰浴的情况下超声处理 β -乳球蛋白会导致 β -乳球蛋白二级结构的改变, 伴随着 β -乳球蛋白二聚体、三聚体和寡聚体的形成, 这些 β -乳球蛋白更容易被胃蛋白酶消化并减少了其与视黄醇的结合; 超声处理时进行冰浴会引起 β -乳球蛋白二级结构的变化, 但不会导致寡聚体的形成, 也不会改变蛋白质结合视黄醇的能力; 两种超声处理形式的 β -乳球蛋白都比天然的 β -乳球蛋白具有更多暴露的疏水表面, 并且与酚氧化酶进行了促进的交联反应。Wang 等^[48]用超声处理(超声功率 900 W, 超声频率 20 kHz, 超声时间 0, 30, 60 min)酪蛋白后发现, 在 Tween 80 存在的情况下, 超声处理可将酪蛋白颗粒的直径显著降低至 100 nm 以下, 从而可以产生具有高透明度的胶体酪蛋白, 过敏血清酶联免疫吸附试验表明胶体酪蛋白和 IgE 的结合能力显著降低, LAD2 肥大细胞系脱颗粒试验表明胶体酪蛋白具有低致敏性; 同样, 超声处理后新鲜全脂牛奶的致敏性也降低。该工作为降低牛奶过敏原的致敏性提供了一种有效的方法, 有利于低过敏性牛奶的生产。除此之外, 先前多项研究^[49-53]表明, 超声处理结合糖基

化修饰也可以显著降低 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白的致敏性。

2.4 虾

虾的主要过敏原是原肌球蛋白(Tropomyosin, TM),由两个卷曲亚基组成,分子量为35~38 kDa,等电点约为4.5^[54]。在结构上, TM有8个IgE结合位点,每个位点由5~14个氨基酸组成^[55]。TM的二级结构主要由 α -螺旋组成,这确保了其在一定范围内耐受高温和高压的稳定性^[56]。在极端热负荷下, TM发生变性,热变性的TM可以在冷却后重新折叠,并且在热处理和酸处理后抗原性仍然存在^[57-58]。

Li等^[59]用高强度超声(0℃, 800 W, 30 kHz, 15 min)对虾(*P. vannamei*)进行处理后发现, TM与IgE的结合能力未受到影响,但IgE结合能力在50℃下超声处理1.5 h后降低20%,证实了超声处理和加热之间的协同作用。为了提高处理效果, Li等^[60]对水煮虾(*P. vannamei*)进行试验发现,在0℃(800 W, 30 kHz)下超声处理30 min后, IgE结合能力降低了50%。Dong等^[61]评估了高强度超声处理(0, 5, 10, 15, 20 min)对虾样品的理化和致敏特性的影响,结果表明过敏性随着处理时间的增加而降低, β -折叠和 α -螺旋随着处理时间的增加而增加;当处理时间为20 min时效果最佳,原肌球蛋白减少76%,总可溶性蛋白含量下降28.26%,而体外消化率、肽含量、总抗氧化能力分别提高了7.53%, 0.81%, 71.29%。Zhang等^[62]发现超声(800 W, 20 kHz)结合酶处理(胃蛋白酶和胰蛋白酶)对虾(*Exopalaemonitideus*)处理15 min后, TM和IgE结合能力显著降低70%以上,表明高强度超声处理降低了TM的致敏性并有助于提高其消化率。

2.5 鸡蛋

鸡蛋蛋清中含有大量鸡蛋过敏原,主要是卵类黏蛋白、卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、卵转铁蛋白和溶菌酶^[63]。OVA是鸡蛋中的主要过敏原(约占蛋清蛋白的54%),它是一种含有385个氨基酸、分子量约为45 kDa的糖蛋白,其中大约50%的氨基酸是疏水性的,还有约25%的氨基酸是带电的^[64]。

Yang等^[65]研究发现高强度超声可显著增强OVA与IgG和IgE结合能力;由于OVA部分展开, IgG和IgE结合能力随着超声功率在200~600 W范围内的增加而增强,当功率为800 W时,由于OVA的聚集,结合能力略有下降。因此,单独对某些蛋制品进行高强度超声处理可能会提高鸡蛋过敏患者发生过敏反应的风险。然而, OVA分子的展开与IgG和IgE表位的暴露可能可以通过其他方法与高强度超声相结合来修饰表位并降低OVA的潜在过敏性。为了验证这一想法, Yang等^[66]在

超声预处理后用甘露糖(Mannose, M)进行糖化,结果表明OVA-M偶联物与IgG和IgE结合能力显著降低,并显著增强了OVA-M偶联物的抗氧化活性,在600 W下,观察到IgG和IgE的结合值最低,抗氧化能力值最高,因此,糖基化结合高强度超声预处理有望成为一种生产低致敏性和高抗氧化OVA产品的方法。Stefanovic等^[67]研究了不同的超声预处理蛋清蛋白对蛋白酶促水解的影响,并评估通过各种蛋白酶处理和超声处理获得的水解产物的一些功能和抗氧化特性,结果表明,通过超声预处理与蛋白酶相结合,可以生产具有改进功能和抗氧化特性的水解产物,从而提高蛋清蛋白在食品中的利用率。

2.6 猕猴桃

猕猴桃是全球最常见的食物过敏诱因之一。目前已在绿色猕猴桃中鉴定出13种不同的过敏原,在这些过敏原中, Act d 1、Act d 2、Act d 8、Act d 11和Act d 12被定义为主要过敏原。Act d 1是主要的猕猴桃过敏原之一,分子量为30 kDa,属于半胱氨酸蛋白酶类木瓜蛋白酶家族^[68]。Act d 2是类奇异果甜蛋白,分子量为20~26 kDa,具有200个氨基酸残基^[69]。当植物受到压力(例如干旱)或传染性病原体激活防御系统时,这些蛋白质会在果实组织中表达。Act d 8(15~18 kDa)是一种致病相关蛋白,被发现与桦树花粉同源^[70]。Act d 11是猕猴桃中存在的主要成熟相关蛋白质之一^[71]。Act d 11和Act d 8都属于Bet v 1家族,并且通常与口腔过敏综合征相关的过敏反应有关^[72]。2014年,从绿色猕猴桃种子中提取了两种新的过敏原:Act d 12(分子量为50.2 kDa的11S球蛋白)和Act d 13(分子量为12 kDa的2S白蛋白)^[73]。研究^[73-74]发现,这些蛋白质与花生和坚果中存在的过敏原具有交叉反应性。

Wang等^[75]将猕猴桃样品用超声波处理(25 kHz, 400 W)。结果发现,总蛋白质的溶解度在超声处理16 min后降低了20%,而体外试验与初始水平相比,消化率和肽含量分别提高了62%和3倍。此外,超声波产生的强烈剪切应力和压力导致细胞和蛋白质结构的显著破坏,导致二级结构发生变化,包括 α -螺旋含量减少和 β -折叠增加。超声处理16 min显著抑制了Act d 2的IgE结合能力,导致Act d 2过敏原含量减少了50%。因此,高强度超声处理在提高猕猴桃及相关产品的消化率和降低过敏性方面具有潜在的应用价值。

2.7 其他

Sal s 1是三文鱼的主要过敏原,与鲑鱼的主要过敏原Gad c 1有58%的氨基酸序列同源性;Sal s 1有两个亚型(Sal s 1 beta 1和Sal s 1 beta 2),均为109个氨基酸,序列基本相同;在Sal s 1 beta 1中鉴定出3个未描述的

抗原区域,而在 Sal s 1 beta 2 中未发现过敏原区域,这导致它们的致敏活性完全不同^[76]。马涛等^[77]研究发现超声处理可降低 Sal s 1 蛋白抗原性,但不能达到完全消除的效果,Sal s 1 经超声加工后其疏水性、三级结构均发生了一定程度的变化,二级结构变化不大,因蛋白构象的改变导致了其抗原性的降低。白果蛋白(Ginkgo Seed Protein,GSP)是白果的主要致敏蛋白,GSP 可以分离纯化得到白蛋白、球蛋白和醇溶蛋白^[78]。与其他植物蛋白相比,GSP 具有理想的溶解性、吸油能力、发泡能力和乳化性能^[78]。孙红^[79]将 GSP 在 70 ℃、20/60 kHz 多频超声波下处理 40 min 后发现,GSP 过敏原性 IgE 下降幅度最大可达到 40.1%,其抗原性 IgG 也显著下降 47%。

3 总结与展望

在经济高速发展下,生活水平的提高和日益丰富的食品原料给过敏性人群带来了更不利的易感条件。食物过敏已经成为人们日益关注的食品安全和公共卫生问题。目前,尚无治疗过敏反应的有效医学技术,消费者只能通过避免、减少接触或消费不含过敏原的食品,从而避免食物过敏。因此,如何能够在不改变食物风味的同时降低其致敏性成为亟待解决的问题。超声处理作为食品加工、保存和提取技术中一种不可或缺的物理手段,对食物的风味物质影响甚少。现有研究证明,超声处理可以改变食物过敏原的高级结构,进而影响其致敏性,有望成为一种降低食物致敏性的处理方法。

在今后的研究中,可以从以下几个方面考虑:① 目前关于超声处理对食物致敏性影响的文章常通过分离致敏蛋白单独处理的方式进行试验,随后在总蛋白中研究致敏性的区别。而食物中的风味物质大多为蛋白质,对食物风味有重要影响,但关于食物风味和感官特性的研究很容易被研究者忽略。② 已有的众多研究证实,超声处理能够通过改变致敏蛋白的高级结构,影响其与 IgG 的结合能力从而改变食物的致敏性。但处理后蛋白的结构变化规律和蛋白功能的改变还需要蛋白结构学方向的进一步研究。③ 关于超声处理对“八大”过敏原中坚果和小麦的致敏性是否有影响尚未明确,还需要更多研究来完善。④ 超声与其他方式(如酶解、糖化等)协同处理对食物致敏性的影响也可以成为研究方向之一。综上,超声处理对食物致敏性的影响还需要进行更深入的探索和研究,为食物脱敏提供有力的理论依据。

参考文献

[1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 41-58.

[2] 解洪丽, 邵明军, 刘传合, 等. 全国 31 个城市儿童食物过敏自我报告率调查[J]. *国际儿科学杂志*, 2017, 44(9): 637-641.

XIE H L, SHAO M J, LIU C H, et al. A survey on the self-report rate of food allergy among children in 31 cities in China[J]. *International Journal of Pediatrics*, 2017, 44(9): 637-641.

[3] CABANILLAS B, JAPPE U, NOVAK N. Allergy to peanut, soybean, and other legumes: recent advances in allergen characterization, stability to processing and IgE cross-reactivity[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(1): 1700446.

[4] MEDA V, ORSAT V, RAGHAVAN V. 2-Microwave heating and the dielectric properties of foods[M]// REGIER M, KNOERZER K, SCHUBERT H. *The microwave processing of foods*. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017: 23-43.

[5] REGIER M, SCHUBERT H. 1-Introducing microwave processing of food: Principles and technologies[M]// SCHUBERT H, REGIER M. *The microwave processing of foods*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005: 3-21.

[6] ZHANG M Y, WU P, WU J, et al. Advanced DNA-based methods for the detection of peanut allergens in processed food[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 114: 278-292.

[7] VAN PUTTEN M C, FREWER L J, GILISSEN L, et al. Novel foods and food allergies: A review of the issues [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17(6): 289-299.

[8] STONE K D, PRUSSIN C, METCALFE D D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(2): S73-S80.

[9] YU W, FREELAND D M H, NADEAU K C. Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(12): 751-765.

[10] CHINTHRAJAH R S, HERNANDEZ J D, BOYD S D, et al. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 137(4): 984-997.

[11] SHRIVER S K, YANG W W. Thermal and nonthermal methods for food allergen control[J]. *Food Engineering Reviews*, 2011, 3(1): 26-43.

[12] CHIZOBA EKEZIE F G, CHENG J H, SUN D W. Effects of non-thermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74: 12-25.

[13] DONG X, WANG J, RAGHAVAN V. Critical reviews and recent advances of novel non-thermal processing techniques on the modification of food allergens[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(2): 196-210.

[14] JIANG L Z, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 595-601.

[15] NAZARI B, MOHAMMADIFAR M A, SHOJAEE-ALIABADI S, et al. Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate [J]. *Ultrasonics*

- Sonochemistry, 2018, 41: 382-388.
- [16] SACHS M I, JONES R T, YUNGINGER J W. Isolation and partial characterization of a major peanut allergen[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1981, 67(1): 27-34.
- [17] CHAPMAN M D, POMES A, BREITENEDER H, et al. Nomenclature and structural biology of allergens[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007, 119(2): 414-420.
- [18] SHAH F, SHI A, ASHLEY J, et al. Peanut allergy: Characteristics and approaches for mitigation[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(5): 1 361-1 387.
- [19] JAYASENA S, SMITS M, FIECHTER D, et al. Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(6): 1 849-1 855.
- [20] BURKS A W, WILLIAMS L W, HELM R M, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1991, 88(2): 172-179.
- [21] WU Z, ZHOU N, XIONG F, et al. Allergen composition analysis and allergenicity assessment of Chinese peanut cultivars[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 459-465.
- [22] VALCOUR A, JONES J E, LIDHOLM J, et al. Sensitization profiles to peanut allergens across the United States[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2017, 119(3): 262-266.
- [23] 黄玉霞, 梁金玲, Lisa Wang, 等. 食品中花生过敏原及其检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 314-318, 327.
- HUANG Y X, LIANG J L, LISA W, et al. Research progress of peanut allergen and its detection methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 314-318, 327.
- [24] KUKKONEN A K, PELKONEN A S, MAKINEN-KILJUNEN S, et al. Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: A double-blind placebo-controlled study[J]. Allergy, 2015, 70(10): 1 239-1 245.
- [25] SANTOS A F, BARBOSA-MORAIS N L, HURLBURT B K, et al. IgE to epitopes of Ara h 2 enhance the diagnostic accuracy of Ara h 2-specific IgE[J]. Allergy, 2020, 75(9): 2 309-2 318.
- [26] JAYASOORIYA S D, TORLEY P J, D'ARCY B R, et al. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine Semitendinosus and Longissimus muscles[J]. Meat Science, 2007, 75(4): 628-639.
- [27] LI H, YU J, AHMEDNA M, et al. Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 762-768.
- [28] ZHANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(C1): 30-37.
- [29] 耿军凤, 张丽芬, 陈复生. 超声波辅助提取对花生蛋白结构与功能特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9): 61-69.
- GENG J F, ZHANG L F, CHEN F S. Effect of ultrasound-assisted extraction on the structure and functional properties of peanut protein[J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 61-69.
- [30] TSAI J J, CHANG C Y, LIAO E C. Comparison of allergenicity at Gly m 4 and Gly m Bd 30K of soybean after genetic modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(6): 1 255-1 262.
- [31] HANAFUSA K, MURAKAMI H, UEDA T, et al. Worm wounding increases levels of pollen-related food allergens in soybean (Glycine max)[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(7): 1 207-1 215.
- [32] UEBERHAM E, SPIEGEL H, HAVENITH H, et al. Simplified tracking of a soy allergen in processed food using a monoclonal antibody-based sandwich ELISA targeting the soybean 2S albumin Gly m 8[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(31): 8 660-8 667.
- [33] AMIGO-BENAVENT M, ATHANASOPOULOS V I, FERRANTI P, et al. Carbohydrate moieties on the in vitro immunoreactivity of soy β -conglycinin[J]. Food Research International, 2009, 42(7): 819-825.
- [34] JIA H M, ZHOU T J, ZHU H, et al. Quantification of Gly m 5.0101 in soybean and soy products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Molecules, 2019, 24(1): 68.
- [35] HE M X, XI J. Identification of an IgE epitope of soybean allergen Gly m Bd 60K [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 133: 6.
- [36] GENG T, STOJŠIN D, LIU K, et al. Natural variability of allergen levels in conventional soybeans: Assessing variation across north and South America from five production years[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(2): 463-472.
- [37] LIU B, TENG D, WANG X, et al. Detection of the soybean allergenic protein Gly m Bd 28K by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(4): 822-828.
- [38] SEO S H, CHO S J. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 70: 208-212.
- [39] BISCOLA V, DE OLMOS A R, CHOISET Y, et al. Soymilk fermentation by *Enterococcus faecalis* VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of allergenic proteins β -conglycinin (7S) and glycinin (11S)[J]. Beneficial Microbes, 2017, 8(4): 635-643.
- [40] 孙英杰. 超声波处理对大豆分离蛋白结构和功能性影响研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014: 44-46.
- SUN Y J. Study on the effect of ultrasonic treatments on structure and functional properties of SPI[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014: 44-46.
- [41] HU H, WU J, LI-CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655.
- [42] 王笑宇, 韩东, 陈子净, 等. 超声处理对 β -伴大豆球蛋白乳化性能的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 153-159.

- WANG X Y, HAN D, CHEN Z J, et al. Effects of ultrasonic treatment on the emulsifying properties of β -conglycinin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 153-159.
- [43] 邓涵, 祖琴琴, 朱杰瑞, 等. 超声处理对大豆 7S 蛋白潜在致敏性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 32-37.
- DENG H, ZU Q Q, ZHU J R, et al. Effect of ultrasonic treatment on the potential allergenicity of soybean 7S globulin[J]. Food Science, 2017, 38(5): 32-37.
- [44] WAL J M. Bovine milk allergenicity[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2004, 93(5, Suppl 3): S2-S11.
- [45] NATALE M, BISSON C, MONTI G, et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2004, 48(5): 363-369.
- [46] TAMMINEEDI C V R K, CHOUDHARY R, PEREZ-ALVARADO G C, et al. Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of α -casein and whey proteins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 54(1): 35-41.
- [47] STANIC-VUCINIC D, STOJADINOVIC M, ATANASKOVIC-MARKOVIC M, et al. Structural changes and allergenic properties of β -lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound[J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(12): 1 894-1 905.
- [48] WANG C, XIE Q, WANG Y, et al. Effect of ultrasound treatment on allergenicity reduction of milk casein via colloid formation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(16): 4 678-4 686.
- [49] LIU J, TU Z C, LIU G X, et al. Ultrasonic pretreatment combined with dry-state glycation reduced the immunoglobulin E/Immunoglobulin G-binding ability of α -lactalbumin revealed by high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(22): 5 691-5 698.
- [50] SHAO Y H, ZHANG Y, ZHU M F, et al. Glycation of β -lactoglobulin combined by sonication pretreatment reduce its allergenic potential[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1 527-1 535.
- [51] YANG W, TU Z, WANG H, et al. Mechanism of reduction in IgG and IgE binding of β -lactoglobulin induced by ultrasound pretreatment combined with dry-state glycation: A study using conventional spectrometry and high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(36): 8 018-8 027.
- [52] SHAO Y H, ZHANG Y, ZHANG L, et al. Mechanism of reduction in allergenicity and altered human intestinal microbiota of digested β -lactoglobulin modified by ultrasonic pretreatment combined with glycation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(46): 14 004-14 012.
- [53] LIU G X, TU Z C, YANG W, et al. Investigation into allergenicity reduction and glycation sites of glycated β -lactoglobulin with ultrasound pretreatment by high-resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2018, 252: 99-107.
- [54] PEIXOTO S, MONTEIRO T, CARVALHO M, et al. Tropomyosin from vertebrates as an allergen-case report [J]. Allergy, 2017, 72: 534.
- [55] CHENG J H, WANG H, SUN D W. An overview of tropomyosin as an important seafood allergen: Structure, cross-reactivity, epitopes, allergenicity, and processing modifications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 21(1): 27-47.
- [56] COSTA J, VILLA C, VERHOECKX K, et al. Are physicochemical properties shaping the allergenic potency of animal allergens? [J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2022, 62(1): 37-63.
- [57] ZHANG Z Y, LI X M, LI Z X, et al. Investigation of glycated shrimp tropomyosin as a hypoallergen for potential immunotherapy[J]. Food & Function, 2021, 12(6): 2 750-2 759.
- [58] LASEKAN A, CAO H J, MALEKI S, et al. Shrimp tropomyosin retains antibody reactivity after exposure to acidic condition[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(11): 3 623-3 630.
- [59] LI Z X, LINHONG C L, JAMIL K. Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus Vannamei*) allergens by high intensity ultrasound[J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(5): 639-644.
- [60] LI X Y, LI Z X, LIN H, et al. Effect of power ultrasound on the immunoactivity and texture changes of shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2011, 29(5): 508-514.
- [61] DONG X, WANG J, RAGHAVAN V. Effects of high-intensity ultrasound processing on the physiochemical and allergenic properties of shrimp[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 65: 102441.
- [62] ZHANG Z Y, ZHANG X F, CHEN W, et al. Conformation stability, *in vitro* digestibility and allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Exopalaemon modestus*) as affected by high intensity ultrasound[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 997-1 009.
- [63] ANET J, BACK J F, BAKER R S, et al. Allergens in the white and yolk of hen's egg[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1985, 77(3): 364-371.
- [64] NISBET A D, SAUNDY R H, MOIR A J G, et al. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin[J]. European Journal of Biochemistry, 1981, 115(2): 335-345.
- [65] YANG W H, TU Z C, WANG H, et al. High-intensity ultrasound enhances the immunoglobulin (Ig) G and IgE binding of ovalbumin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(9): 2 714-2 720.
- [66] YANG W, TU Z, WANG H, et al. Glycation of ovalbumin after high-intensity ultrasound pretreatment: Effects on conformation, immunoglobulin (Ig) G/IgE binding ability and antioxidant activity[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(10): 3 767-3 773.

- [67] STEFANOVIC A B, JOVANOVIĆ J R, GRBAVIC S Ž, et al. Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(6): 979-993.
- [68] BUBLIN M, PFISTER M, RADAUER C, et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(3): 687-694.
- [69] MISRA R C, SANDEEP, KAMTHAN M, et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 25340.
- [70] AGARWAL P, AGARWAL P K. Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(2): 599-611.
- [71] D'AVINO R, BERNARDI M L, WALLNER M, et al. Kiwifruit Act d 11 is the first member of the ripening-related protein family identified as an allergen[J]. *Allergy*, 2011, 66(7): 870-877.
- [72] SUSSMAN G, SUSSMAN A, SUSSMAN D. Oral allergy syndrome[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2010, 182(11): 1 210.
- [73] SIRVENT S, CANTÓ B, GÓMEZ F, et al. Detailed characterization of Act d 12 and Act d 13 from kiwi seeds: implication in IgE cross-reactivity with peanut and tree nuts[J]. *Allergy*, 2014, 69(11): 1 481-1 488.
- [74] SIRVENT S, CANTÓ B, CUESTA-HERRANZ J, et al. Act d 12 and Act d 13: Two novel, masked, relevant allergens in kiwifruit seeds[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014, 133(6): 1 765-1 767.
- [75] WANG J, WANG J, KRANTHI VANGA S, et al. Influence of high-intensity ultrasound on the IgE binding capacity of Act d 2 allergen, secondary structure, and In-vitro digestibility of kiwifruit proteins[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 71: 105409.
- [76] PEREZ-GORDO M, LIN J, BARDINA L, et al. Epitope mapping of atlantic salmon major allergen by peptide microarray immunoassay[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2012, 157(1): 31-40.
- [77] 马涛, 王一侠, 刘艳, 等. 超声处理对三文鱼小清蛋白构象及致敏活性的影响[J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 160-163.
- MA T, WANG Y X, LIU Y, et al. Effect of ultrasonic treatment on the antigenicity and conformation of salmon parvalbumin[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(3): 160-163.
- [78] LIU W, ZOU M, WANG Y, et al. Ginkgo seed proteins: characteristics, functional properties and bioactivities[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2021, 76(3): 281-291.
- [79] 孙红. 超声波处理结合糖基化反应降低白果蛋白致敏性的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019: 9-37.
- SUN H. Ultrasonic treatment combining with glycosylation reduces the allergenicity of ginkgo seed protein [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019: 9-37.
- (上接第 157 页)
- [20] 陆剑锋, 万全, 殷章敏, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其特征[J]. *水产学报*, 2010(6): 801-808.
- LU J F, WAN Q, YIN Z M, et al. Extraction and characteristics of collagen from the skirt of Chinese soft-shelled turtle[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010(6): 801-808.
- [21] 张强, 黄鑫, 符安卫, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取、鉴定及其理化性质[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(12): 176-182.
- ZHANG Q, HUANG X, FU A W, et al. Extraction, identification and physicochemical properties of collagen from the skirt of Chinese soft-shelled turtle[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2019, 45(12): 176-182.
- [22] 蔡路昀, 史航, 曹爱玲, 等. 鳊鱼骨胶原蛋白的结构及流变特性[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 66-73.
- CAI L Y, SHI H, CAO A L, et al. Structure and rheological properties of plaice bone collagen[J]. *Chinese Journal of Foodstuffs*, 2020, 20(3): 66-73.
- [23] 杨淑晓, 李萌, 马永生, 等. 响应面法优化虹鳟鱼骨中可溶性钙提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(16): 150-160.
- YANG S X, LI M, MA Y S, et al. Optimization of the extraction process of soluble calcium from rainbow trout bones by response surface methodology[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(16): 150-160.
- [24] 刘闪, 刘良忠, 杨永生, 等. 白鲢鱼骨脱钙工艺优化[J]. *食品与机械*, 2013, 29(5): 164-168.
- LIU S, LIU L Z, YANG Y S, et al. Optimization of silver carp bone decalcification process[J]. *Food & Machinery*, 2013, 29(5): 164-168.
- [25] 陈铁壁, 刘冬敏, 鹿康, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白酸酶分步提取工艺研究[J]. *食品与机械*, 2016, 32(8): 163-166.
- CHEN T B, LIU D M, LU K, et al. Study on the step-by-step extraction process of collagenase from grass carp fish scales[J]. *Food & Machinery*, 2016, 32(8): 163-166.
- [26] 叶韬, 林琳, 张晓霞, 等. 罗非鱼骨胶原蛋白的提取及其性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(3): 302-310.
- YE T, LIN L, ZHANG X X, et al. Extraction and properties of tilapia collagen protein[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2015, 34(3): 302-310.
- [27] 武文霞, 于同慧, 朱祎, 等. 骨胶原蛋白的制备及其在食品中应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(13): 445-454.
- WU W X, YU T H, ZHU Y, et al. Research progress on the preparation of collagen and its application in food[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(13): 445-454.
- [28] ZHAO W H, CHI C F, ZHAO Y Q, et al. Preparation, physicochemical and antioxidant properties of acid-and pepsin-soluble collagens from the swim bladders of miuiy croaker (*Micthysmiiuy*)[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(5): 161-180.