

真菌毒素的微生物脱毒技术

孙建和 陆 苹 顾红香

(上海交通大学农学院生物技术研究所 上海 201101)

摘要: 尽管可采用不同的物理或化学方法去除粮食或饲料中污染的真菌毒素, 然而, 具有实用价值的方法却很少。最新研究认为最佳的脱毒方法是通过筛选微生物, 在温和条件下降解真菌毒素, 无须使用有害的化学试剂、不影响适口性且无营养价值的重大流失。文中综述了该领域的最新研究进展。

关键词: 真菌毒素, 脱毒, 微生物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0060-05

目前已经分离、鉴定的霉菌大约有100,000种, 其中超过400种具有潜在的毒性, 约5%能产生有毒复合物。真菌毒素污染谷物、油料作物和其它一些农作物已成为一个全球性的问题。食用真菌毒素污染的饲料后会严重危害动物的健康, 导致畜牧业生产率低下, 并造成重大的经济损失。真菌毒素还能通过直接或间接(通过动物产品传播)途径污染食品, 影响人类的健康。从理论上讲, 避免真菌毒素危害的最佳方法是通过对谷物和其他饲料作物的抗性育种, 从而避免真菌毒素的产生。目前, 在小麦和玉米的抗性育种方面已经取得重大进展, 但还没有获得完全抗性品种。改良收割、贮藏和加工方式, 也是抑制霉菌生长及其毒素产生的有效方法。另外, 用化学试剂处理农作物也是一种可行的方法。例如人们发现大约100余种化合物可以抑制黄曲霉毒素产生。大多数药物是通过抑制霉菌生长而抑制其毒素产生, 其中研究得较多的两种黄曲霉毒素合成抑制剂分别为DDV和咖啡因。另外一些表面活性物质也可以抑制黄曲霉素的生长及其毒素的合成^[1]。国内也有学者应用山苍子油作为防腐剂控制黄曲霉毒素的污染及其产生的毒性作用^[2]。

当无法阻止真菌毒素污染时, 那么在用这些原料作食品或饲料以前必须进行脱毒处理, 无论采用哪一种脱毒策略, 其最终目标是: 通过脱毒把真菌毒素灭活或破坏, 使之转变成无毒的复合物; 将真菌孢子和菌丝体破坏, 使新的毒素不会形成; 同时保持粮食和饲料的营养价值和适口性, 并且要经济、合理。

最简单的脱毒办法是采用人工挑拣, 但这样做既浪费时间而且在某些情况下也无法做到。人们已经研究出一种密度分离法来分离被玉米赤霉烯酮-脱氧瓜蒌镰菌醇污染的小麦、谷类等。通过面粉加工过程也可以使含有高水平真菌毒素的麸皮与真菌毒素含量很低的面粉分离。大多数真菌毒素是热稳定性的, 因此在食品加工中用热处理对真菌毒素影响不大。

应用化学试剂可破坏真菌毒素并达到无毒的效果。一些碱性化合物, 如氨水, 氢

氧化钠和氢氧化钙等,可破坏黄曲霉毒素。虽然通过处理几乎可以完全去除真菌毒素,但是这些化学药品也可能造成营养成分的丢失^[3]。最近,有研究发现咖啡二萜类能抵御黄曲霉毒素对大鼠和人类细胞的毒性作用^[4]。

人们又研究了用氧化剂去除真菌毒素。用氯来漂白面粉可以减少10%的脱氧瓜蒌镰霉醇的成分,用臭氧处理,脱毒效果更好一些,用水合重亚硫酸钠可以最大限度的降低真菌毒素。遗憾的是这样处理食品原料却不太合适。

还需提及的是一些可以吸收真菌毒素而又不能被人或动物的消化系统吸收的吸附剂。这些物质用在一些饲料添加剂中,如水合硅酸铝-钠-钙可以成功地吸收黄曲霉毒素B₁^[5,6]。也有用活性碳成功吸附赭曲霉毒素A的报道。用这些方法脱毒的潜在缺点是一些重要的微量营养物质可能也被吸附。尽管如此,一些吸附剂已商品化、并应用于饲料添加剂中^[7]。

目前,虽然在一定程度上用不同的方法脱毒已经取得成功,但其最大的不足是:去毒效果有限、可能造成重要营养物质的丢失、成本较高等。因此该领域有关人士认为脱毒的最佳方法是生物脱毒,即在温和条件下,不用有害的化学药品,不会造成营养价值的丢失,也不会降低适口性,而使真菌毒素脱毒。

1 真菌毒素的生物脱毒技术

1.1 通过发酵进行脱毒

早在20世纪80年代,人们就提出了谷物通过发酵脱毒的想法,有人通过发酵被玉米赤霉烯酮污染的粮食来生产乙醇,产生的乙醇不含真菌毒素,但发酵后的残渣和残液仍然有毒性。

研究表明,被F₂毒素污染的粮食可作为假丝酵母发酵的底物,发酵后毒素的活性降低了10倍,而且几乎全部留在发酵液中,在饲料蛋白中根本检测不到毒素的存在。

有关通过发酵生产啤酒和白酒并去除毒素的报道已有很多,研究发现,在加拿大和欧洲的啤酒中不存在玉米赤霉烯酮。在欧洲啤酒中没有检测到黄曲霉毒素,也很少检测到超过1ng/mL水平的赭曲霉毒素A。Scott和Lawrence分析了美国和墨西哥各种类型的啤酒,只在一种样品中发现微量的黄曲霉毒素,研究者还分析了41种加拿大啤酒中烟曲霉毒素的情况^[8]。其中4个样品中的烟曲霉毒素B₁超过2ng/mL、烟曲霉毒素B₂超过7.6ng/mL,而大多数样品中的烟曲霉毒素含量极低,Torres研究了西班牙啤酒的烟曲霉毒素B₁含量情况,结果发现43.8%样品无毒,烟曲霉毒素B₁的含量较低(4.76~85.53ng/mL)^[9]。

在有关应用酵母发酵生产乙醇、使真菌毒素脱毒的研究中,研究人员通过发酵葡萄汁研究了单端孢菌素和异单端孢菌素的分解过程,发现分解产物含异单端孢菌素、单端孢菌素及单端孢菌素的衍生物,但未发现含环氧化物组分。至于分解的机制,推测是某种酵母羟化酶发挥了作用,同时酵母还可能产生连接酶和酮-烯醇互变异构酶。值得一提的是添加重亚硫酸盐可以提高单端孢菌素及其异构体的分解率。异单端孢菌素通过酵母作用使其侧链分解,从而部分转变成单端孢菌素,尽管乙醇发酵后这种复合物的毒理学活性仍然存在,但其毒性比最初复合物的毒性显著降低,约有20%的真菌毒素被酵母吸收。

在Scott的另一实验中,用3种不同酵母菌株对一个添加了赭曲霉毒素A、烟曲霉毒素B₁和B₂的容器进行发酵,8d后,赭曲霉毒素减少13%,烟曲霉毒素B₁和B₂各减少

了28%和17%，酵母吸收了21%赭曲毒素，但未吸收烟曲霉毒素^[8]。

1.2 真菌毒素的细菌脱毒技术 早在20世纪60年代，Ciegler就发现有超过1000种微生物有能力降解黄曲霉毒素。但其中只有一种细菌：橙黄杆菌 B-184 (*Flavobacterium Aurantiacum* B-184) (以下简称 F 菌) 能够不可逆的从溶液中去除黄曲霉毒素。最初的研究显示 pH 值和温度影响细菌对毒素的摄取，高密度细菌比低密度细菌吸收黄曲霉毒素的能力要强一些。大量热灭活细菌也呈现一定的结合黄曲霉毒素的能力。

研究发现微生物能从牛奶、植物油、花生饼和花生奶中去除黄曲霉毒素。最近 Hao 和 Backet 报道用这种微生物脱毒花生奶，并暗示微生物在对其它食品和饲料的脱毒中可能有潜在的应用价值。由于采用化学方法处理食品不易被消费者接受，那么用这种生物方法去除黄曲霉毒素，其重要性就显著增加。令人遗憾的是由于细菌产生黄色素，故在食品和饲料的发酵上受到一定的限制。最近，国内有学者从一株小蜜环菌中分离、鉴定了一种黄曲霉毒素脱毒酶，其分子量约 51.8kD，具较强的黄曲霉毒素脱毒能力^[10]。

现阶段本领域研究的焦点集中在对毒素降解机制的研究上。为了弄清毒素降解机制，要明确的首要问题是：细菌能否真正降解黄曲霉毒素或者是否真是由于细菌吸收才导致毒素消失。为了确定暴露于 F 菌中的黄曲霉毒素 B₁ 真正的转归情况，Line 用 C¹⁴ 标记黄曲霉毒素 B₁，从而进行精确的示踪和检测。通过检测 CO₂ 产生的数量、黄曲霉毒素 B₁ 数量，水溶性降解产物的数量、被细菌吸收的黄曲霉毒素 B₁ 的数量来研究毒素的降解情况。对照实验包括：无细菌空白、热灭活细菌。放射分析表明，对溶于氯仿的黄曲霉毒素 B₁ 接种 5 个 F 菌后快速转化为水溶性产物，在活细菌存在情况下经过 6h，大约有相当于起始放射性 24.1% 的物质仍保留在有机相中。未接种细菌的样品中没有产生水溶性复合物，72h 后，对照中约有 99.7% 的放射性物质保存在氯仿中。死亡的细菌不能产生水溶性的黄曲霉毒素 B₁ 的降解产物。但无论活细菌还是死细菌都吸收了大量的黄曲霉毒素 B₁，不过由死细菌去除的黄曲霉毒素 B₁ 与起始样品相比没有改变，表明只是物理性的吸附毒素。在整个实验过程中，活细菌能释放标记的二氧化碳，死细菌和对照细菌都不产生放射性标记的二氧化碳，这个结果有力地证明了至少部分标记的黄曲霉毒素 B₁ 被活的 F 菌代谢，而死细菌或对照细菌不能产生放射性标记的二氧化碳的事实进一步说明黄曲霉毒素 B₁ 通过活细菌进行了代谢而不单是被细菌壁吸附。对黄曲霉毒素 B₁ 分解产生的水溶性产物的结构和他们的毒性还需要进一步研究。有学者发现用 F 菌去毒不会产生剧毒残留物。

在黄曲霉毒素 B₁ 的微生物脱毒过程中，对毒素浓度和第二碳源的研究表明，无论添加营养，还是添加非标记性毒素对黄曲霉毒素 B₁ 的微生物脱毒效果都无显著影响。这些结果表明黄曲霉毒素 B₁ 被 F 菌分解可能是矿化现象，而不是共代谢。对不需要外来能源却能使黄曲霉毒素 B₁ 脱毒的微生物的作用机制的揭示、并将它应用于发酵，意义十分重大。

最近，Souza 博士研究了示踪金属离子在黄曲霉毒素分解过程中的作用，发现铜和锌离子可以抑制 F 菌分解黄曲霉毒素 B₁，出现这种结果大概是由于在降解过程中金属离子对酶系统的影响造成的^[11]。

另一种较常见的真菌毒素——赭曲毒素 A，据报道可被瘤胃细菌降解。然而尚未分离和鉴定到相应的细菌。为了获得能降解赭曲毒素 A 的微生物，有学者对 37 种细菌、

10株酵母和12种霉菌进行了筛选,发现在一种培养基中,醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)在25℃和30℃条件下,均能够将初始含量在10ng/mL的赭曲毒素A分解,分解的终产物被作者命名为 α -赭曲毒素A,与赭曲毒素A相比,其对鸡胚的毒性极低。最近,Janos等研究了曲霉菌对赭曲毒素A的降解能力,发现烟曲霉和黑曲霉能在培养基中使赭曲毒素A脱毒,研究了赭曲毒素A脱毒的动力学,并筛选了一株曲霉菌,其能从液体或固体培养基中清除赭曲毒素A,并且其降解产物还能进一步分解^[12]。下一步将对分解产物的特性和这种微生物在食品及饲料中的活性进行研究。

最近人们分离到一种能代谢单端孢菌素的土壤细菌,人们从土壤样品中通过富集培养过程还获得能够代谢脱氧瓜蒌镰醇的复合微生物培养物。在培养一天后这种细菌能够完全分解外源性补加的脱氧瓜蒌镰醇,通过形态学和系统发育学研究,认为E_{3.39}菌株属于土壤根瘤菌(*Agrobacterium rhizobium*)种群,主要代谢产物为3-酮-4脱氧瓜蒌镰醇,这种代谢产物毒性比脱氧瓜蒌镰醇小很多^[13]。

2 未来的发展趋势

从现有的实验结果看,微生物似乎是主要的能用于真菌毒素生物降解的生物。对其进一步筛选可能会获得更有效和更实用的菌株。应用微生物进行真菌毒素的脱毒,首先,要研究微生物对真菌毒素的抗性,对几种细菌和酵母的研究表明这些微生物对真菌毒素的敏感性和选择性有所不同。如短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)对8种真菌毒素敏感,包括玉米赤霉烯酮和赭曲毒素A,但对高浓度的单端孢菌素不敏感。克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)对所有的单端孢菌素敏感,但这种酵母不会被其他的真菌毒素抑制。其次,对抗性机制(如:通过细胞膜的选择吸收、通过选择性酶的降解和通过形成复合物进行封闭等)的研究可能对发现应用性更强的细菌很有帮助。

应用微生物的真菌毒素脱毒技术,应综合考虑降解产物的安全性、脱毒对营养和适口性等各方面的影响,并最终建立一种经济、可行、合理的技术来处理粮食和饲料中的真菌毒素污染问题。

参考文献

- [1] Arpad B, Radomir L. Trends in Food Sci Technol, 1999, 10: 223 ~ 228.
- [2] 余伯良. 微生物学通报, 1998, 25 (3): 144 ~ 147.
- [3] Das C, Mishra H N. Food Chemistry, 2000, 70 (4): 483 ~ 487.
- [4] Cavin C, Mace K, Offord E A, et al. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39 (6): 549 ~ 556.
- [5] Philips T D. J Agric Food Chem, 1998, 59: 599 ~ 605.
- [6] Mutlu M, Gokmen V. J Food Eng, 1998, 35: 259 ~ 266.
- [7] Galvano F, Pietri A, Beruzzi T. J Food Protection, 1998, 61: 469 ~ 475.
- [8] Scott P M, Lawrence G. J A O A C Int, 1997, 80: 1229 ~ 1234.
- [9] Torres M R, Sanchis V, Ramos A J. Int J Food Microbiol, 1998, 39: 139 ~ 143.
- [10] Liu Da-Ling, Yao Dong-Sheng, LiangYu-Qiang et al. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39 (5): 461 ~ 466.
- [11] D'Souza D H, Brackett R E. Food Protect, 1998, 61: 1666 ~ 1669.
- [12] Janos V, Krisztina R, Jozsef T. Int J Food Microbiol, 2000, 59: 1 ~ 7.
- [13] Shima J, Takase S, Takahashi Y. Appl Environm Microbiol, 1997, 63: 3825 ~ 3830.