

# 发酵菌种黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定和 AS 3.870 菌株的鉴定

张国柱 贾珍珍 丁秀英

(北京市卫生防疫站)

齐祖训 孙曾美

(中国科学院微生物研究所)

六十年代初期, Lancaster 等<sup>[1]</sup>和 Newberne 等<sup>[2]</sup>证明黄曲霉毒素是一种强烈的致癌物质。这一事实在食品卫生范畴内已引起世界各国的普遍重视。我国的发酵工业,特别在食品发酵工业中,不少采用黄曲霉群和其他菌属的一些菌种进行发酵生产。如何保证发酵菌种使用安全,确保人民身体健康,是当前应该加以广泛注意的一个问题。

我们曾于 1975 至 1976 年对一些用于发酵生产的菌种能否产生黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (以下简称 AFT B<sub>1</sub>) 做了普查。这对于为及时淘汰产毒菌株提供依据,是十分必要的。

## 材 料 和 方 法

### 一、发酵菌种 AFT B<sub>1</sub> 的测定

#### (一) 测试菌种

由中国科学院微生物研究所菌种保藏室提供,共 38 株,其中包括 9 个属,19 个种(见表 1)。

#### (二) 产毒培养

取测试菌种孢子置于两份 4 毫升灭菌蒸馏水中,制成孢子悬液后,分别接种于灭菌的 150 毫升葡萄糖硝酸铵培养基(以下简称 GAN)<sup>[3]</sup>和 5 克大米培养基中,置 28℃ 培养 10 天,再经 100℃ 10 分钟灭菌备用。

#### (三) AFT B<sub>1</sub> 的提取

1. GAN 培养物: 参照 Kurata 等<sup>[4]</sup>的方法进行提取。

2. 大米培养物: 将大米培养物分别用玻璃棒轻轻捣碎,每份培养物均用三份氯仿(50, 30,

表 1 测试菌株

菌种名称	菌号	用途
<i>Aspergillus batatae</i> Saito (甘薯曲霉)	AS 3.324	糖化, 制酒
<i>A. niger</i> v. Tiegh. (黑曲霉 AS 3.795 变异株)	AS 3.40	糖化, 液体曲
<i>A. niger</i> v. Tiegh. (黑曲霉)	AS 3.315	果胶酶
<i>A. niger</i> v. Tiegh. (黑曲霉)	AS 3.879	柠檬酸
<i>A. niger</i> v. Tiegh. (黑曲霉变异株)	AS 3.1858	糖化
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.381	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.384	糖化, 制酒
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.800	糖化, 制酒
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.801	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.802	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.863	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉)	AS 3.870	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉 AS 3.863 变异株)	AS 3.951	蛋白分解, 酱油
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn (米曲霉变异株)	AS 3.2924	酱油
<i>A. terricola</i> March. (赭土曲霉)	AS 3.374	蛋白分解, 皮革脱毛
<i>A. terricola</i> March (赭土曲霉 AS 3.374 变异株)	AS 3.942	蛋白分解, 皮革脱毛
<i>A. usamii</i> Saka., Iizuka et Yamazaki (宇佐美曲霉)	AS 3.758	糖化, 液体曲
<i>Aspergillus</i> sp. (曲霉)	AS 3.806	糖化
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. (白僵菌)	AS 3.2055	昆虫的生物防治
<i>Gibberella fujikuroi</i> (Saw.) Wr. (藤仓赤霉)	AS 3.752	赤霉素
<i>G. fujikuroi</i> (Saw.) Wr. (藤仓赤霉)	AS 3.2835	赤霉素
<i>G. fujikuroi</i> (Saw.) Wr (藤仓赤霉)	AS 3.2879	赤霉素
<i>Monascus rubigenosus</i> Sato (锈色红曲 AS 3.978 变异株)	AS 3.2842	糖化
<i>Mucor wutungchiao</i> Fang (五通桥毛霉)	AS 3.25	腐乳
<i>Neurospora intermedia</i> Tai (间型脉孢菌)	AS 3.591	维生素 A, 发酵饲料
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom (产黄青霉)	AS 3.3871	葡萄糖氧化酶
<i>P. citrinum</i> Thom (桔青霉)	AS 3.2788	磷酸二酯酶
<i>P. citrinum</i> Thom (桔青霉)	AS 3.2833	磷酸二酯酶
<i>P. datulum</i> Bain. (展青霉)	AS 3.3879	灰黄霉素
<i>Rhizopus chinensis</i> Saito (华根霉)	AS 3.2746	糖化
<i>R. japonicus</i> Vuill. (日本根霉)	AS 3.852	糖化
<i>R. japonicus</i> Vuill. (日本根霉)	AS 3.868	糖化
<i>R. tonkinensis</i> Vuill. (东京根霉)	AS 3.851	糖化
<i>R. tonkinensis</i> Vuill. (东京根霉)	AS 3.866	糖化
<i>R. tonkinensis</i> Vuill. (东京根霉)	AS 3.867	糖化
<i>Trichoderma kōningii</i> Oudem. (康宁木霉)	AS 3.2774	纤维素酶
<i>T. kōningii</i> Oudem. (康宁木霉 AS 3.2936 变异株)	AS 3.4290	纤维素酶
<i>Trichoderma</i> sp. (木霉)	AS 3.3032	纤维素酶

30 毫升) 三次振荡提取, 每次 30 分钟, 依次用滤纸过滤, 合并氯仿提取液, 加 5 克无水硫酸钠脱水, 再移入减压浓缩器中浓缩至干, 将残渣溶于 1 毫升氯仿中备用。

#### (四) 薄层层析

取上述提取液和标准 AFT B<sub>1</sub> 液各 10 微升, 并排滴加在 0.25 毫米厚度的硅胶 G 薄层 (经 110℃ 活化 1 小时) 上, 先用无水乙醚展开,

再用氯仿: 甲醇 (98:2V/V) 展开, 待溶剂前沿展至 10 厘米处取出, 在空气中挥发干燥, 立即置暗室紫外线灯 (365 毫微米) 下与标准 AFT B<sub>1</sub> 样点进行比较观察。如发现可疑阳性样品, 用三氟醋酸进行确证, 确证阳性者再稀释定量。

#### 二、AS 3.870 菌株的鉴定

将 AS 3.870 菌株接种于察氏琼脂平皿上形成巨大菌落, 然后进行培养特征和细微结构

的观察,按《The Genus *Aspergillus*》专著进行鉴定。

## 结 果

### 一、发酵菌种中 AFT B<sub>1</sub> 的测定

38 株发酵菌种 AFT B<sub>1</sub> 的测定结果见表 2。可以看出,在测试的菌种中,只发现 9 株米曲霉中 AS 3.870 菌株产生 AFT B<sub>1</sub>,其在 GAN 培养基和 大米培养基中的产量分别为 266.7 和 40,666.7 ppb,其余的 37 株发酵菌种均未发现产生 AFTB<sub>1</sub>。

表 2 38 株发酵菌种 AFT B<sub>1</sub> 测定结果

菌种名称	阳性菌株数/ 菌株数	阳性菌株号	GAN 培养基		大米培养基	
			荧光强度	AFTB <sub>1</sub> (ppb)	荧光强度	AFT B <sub>1</sub> (ppb)
甘藷曲霉	0/1	—	—	—	—	—
黑曲霉	0/4	—	—	—	—	—
米曲霉	1/9	AS 3.870	+++	266.7	++++	40,666.7
栖土曲霉	0/2	—	—	—	—	—
宇佐美曲霉	0/1	—	—	—	—	—
曲霉	0/1	—	—	—	—	—
白僵菌	0/1	—	—	—	—	—
藤仓赤霉	0/3	—	—	—	—	—
锈色红曲	0/1	—	—	—	—	—
五通桥毛霉	0/1	—	—	—	—	—
间型脉孢霉	0/1	—	—	—	—	—
产黄青霉	0/1	—	—	—	—	—
桔青霉	0/2	—	—	—	—	—
展青霉	0/1	—	—	—	—	—
华根霉	0/1	—	—	—	—	—
日本根霉	0/2	—	—	—	—	—
东京根霉	0/3	—	—	—	—	—
康宁木霉	0/2	—	—	—	—	—
木霉	0/1	—	—	—	—	—

### 二、AS 3.870 菌株的鉴定

上述结果表明,AS 3.870 菌株为产生 AFT B<sub>1</sub> 的强毒株,但不少学者<sup>[5-7]</sup>认为米曲霉都不能产生黄曲霉毒素。根据 Wilson 等<sup>[8]</sup>的报告,只有寄生曲霉和一部分黄曲霉才能产生黄曲霉毒素,因而对除前两种以外的菌株产生黄曲霉毒素要慎重对待<sup>[9,10]</sup>。为此我们对 AS 3.870 菌株进行多次培养特性和细微结构的观察,重新做了鉴定,结果如下:

菌落在察氏琼脂上 25℃ 5 天直径为 5—6 厘米,10 天长满全皿;质地为丝绒状,边缘部分生长较为稀疏(图版 I-1);颜色\* 初期为木犀绿色 (Mignonett Green, R. XXXI), 后呈浅水芹绿至水芹绿色 (Light Cress Green-Cress Green, R. XXXI), 有时显现翡翠绿色 (Jade green, R. XXXI) 或暗草绿色 (Kronberg's Green, R. XXXI); 反面初时近于无色,老后呈黄褐色;偶尔产生菌核。分生孢子头幼时近于球形,继成放射形,直径一般为 200—300 (—500) 微米,一部分呈柱形,200—500 × 50—100 微米(图版 I-3, 4); 分生孢子梗大多直接生自基质,一般长度为 500—1000 微米,长者可达 1500 微米或更长,直径 8.4—16 微米,壁粗糙;顶囊烧瓶形,直径 (16)22—45 (—50) 微米,可育面积约为 3/4,其上大多只生瓶梗;瓶梗 8—12 (—14.4) × 2.5—4 微米,有时中间具一隔膜;在大顶囊上有时先生梗基,6.4—8 × 3.2 微米,其上再生较小的瓶梗,6.4—8 × 2.4—3.2 微米;分生孢子大多为球形或近球形,少数呈椭圆形,(3—) 3.2—4.8 (5.2) 微米,壁微粗糙或有小刺(图版 I-2)。

## 讨 论

Yokotsuka 等<sup>[11]</sup>和 Sasaki 等<sup>[12]</sup>曾检查了日本发酵工业应用的 100 株黄曲霉—米曲霉群菌种,均未发现产生 AFT B<sub>1</sub> 的菌株。值得注意的是,AS 3.870 菌株系来自酱油厂,名称为米曲霉 [*A. oryzae* (Ahlb.) Cohn], 它主要用于制造酱油、蛋白质分解和食品附加增香剂——麦芽酚的重要菌种之一,沿用已久,因此,对该菌产生 AFT B<sub>1</sub> 的发现具有重要意义。实验结果表明,此菌作为发酵菌种在发酵工业上的应用,无论对工人生产操作,还是对发酵食品和酶制剂产品的生产都是不适宜的,故自发现产毒之后即已停止向生产单位供应。

Thom 和 Raper (1945)<sup>[13]</sup> 认为“黄曲霉—

\* 颜色描述根据 Ridgway, R.: "Color Standards and Nomenclature", Washington, D. C., 1912.

米曲霉群”内许多菌株无明确的界限,而把该群以米曲霉和黄曲霉为中心分成两个系。米曲霉指具较长的分生孢子梗和初为黄绿色老后变成褐色的分生孢子头,大多只具瓶梗,也有具梗基的菌株。其中包括许多东方用于制酒或豆类产品的产生糖化酶和蛋白酶的菌株,并发现有许多似乎是米曲霉和黄曲霉的中间型。黄曲霉则具较短的分生孢子梗和始终保持黄绿色的分生孢子头,大多具梗基和瓶梗,也有只具瓶梗(小顶囊上)甚至同一顶囊上两种情况同时存在。Raper 和 Fennell (1965)<sup>[14]</sup> 对“黄曲霉群”仍然重视米曲霉和黄曲霉两个种在颜色变化上的区别。米曲霉在察氏琼脂上老后变褐,近于橄榄黄色 (Olive Yellow, R. XXX), 而黄曲霉则始终为黄绿色,近于翡翠绿色 (Jade Green, R. XXXI) 至水芹绿色 (Cress Green, R. XXXI)。米曲霉的顶囊上只生瓶梗,或生有梗基在其上再生瓶梗,甚至同一顶囊上两种情况可能同时存在;分生孢子初为梨形或椭圆形,老后有的变为球形或近球形,大小差别明显,球形时一般为 4.5—7.0 微米,椭圆形者长轴可达 8—10 微米,壁近于光滑或多少有些粗糙。黄曲霉的顶囊上只生瓶梗,或生有梗基在其上再生瓶梗,前者总是生于小顶囊上,但罕见同一顶囊上二者并存的情况;分生孢子球形或近球形 (3—)3.5—4.5 (—6.0) 微米,有时呈椭圆形,4.5—5.5 × 3.5—4.5 微米,壁具明显小刺。

根据上述基准,米曲霉和黄曲霉除在颜色变化上有不同之外,重要的区别还在于分生孢子的特征,而梗基的有无不是一个主要的区分

基准。AS 3.870 菌株的颜色明显保持黄绿色而不褐,分生孢子的形状、大小和壁的性质,完全附合于黄曲霉的分生孢子特征,尽管该株大多只具瓶梗而少见梗基,我们认为应该是黄曲霉 (*Aspergillus flavus* Link) 而不是米曲霉 [*Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn]。

#### 参 考 文 献

- [1] Lancaster, M. C. et al.: *Nature*, 192: 1095, 1961.
- [2] Newberne, P. M. et al.: *Pathol. Vet.* (Basel) 1: 105, 1964.
- [3] Raper, K. B., and Fennell, D. I.: “*The Genus Aspergillus*” p. 109, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965.
- [4] Kurata, H. et al.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 9: 29, 1968.
- [5] Armbrecht, A. et al.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 46: 805, 1963.
- [6] Delongh, H. et al.: “*Mycotoxins in Foodstuff*” (C. Wogan, ed.) p. 235, M. I. T. Press, Cambridge, Mass., 1965.
- [7] Hesseltine, W. et al.: *Bacteriol. Rev.*, 30: 795, 1966.
- [8] Wilson, B. J. et al.: *Appl. Microbiol.* 16: 819, 1968.
- [9] Heathcote, J. G., and Hibbert, J. R.: “*Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects*” p. 11, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 1978.
- [10] Moreau, C.: “*Moulds, Toxins and Food*” (Translated with additional material by M. Moss,) p. 65, John Wiley and Sons, Chichester, 1979.
- [11] Yokotsuka, T. et al.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 41: 321, 1967.
- [12] Sasaki, M. et al.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 41: 154, 1967.
- [13] Thom, C., and Raper, K. B.: “*Manual of the Aspergilli*” p. 259, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1945.
- [14] Raper, K. B., and Fennell, D. I.: “*The Genus Aspergillus*” p. 358—377, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965.

#### 《中华微生物学和免疫学杂志》征订启事

《中华微生物学和免疫学杂志》为中华医学会微生物和免疫学会主办,1981年创刊,主要报道医学微生物学和免疫学方面的研究论文、简报综述、评论、国内外学术动态、书评及消息等。

本刊为双月刊,16开本,每期64页,每期定价0.50元。于1981年11月开始收订,国内由全国各地级、市级邮电局发行。地区级、市级以下的地区读者可直接向本刊编辑部(地址:北京,天坛,卫生部药品生物制品检定所内)索取订单订阅;国外由中国国际书店发行。

报刊代号: 2—55。

本刊1981年各期尚有余存,读者可向编辑部索取订单订购。