

食品中霉菌抗原及其检测的研究进展

许 杨

(江西-OAI联合研究院 南昌 330047)

关键词 霉菌抗原, 检测

分类号 Q939.5 **文献标识码** C **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-65-67

霉菌作为食品的污染源之一广泛地分布于自然界中。许多食品的原材料,如各类粮食、水果和蔬菜等在加工之前都可能被霉菌污染,不仅造成经济上的损失,而且还会危害消费者的健康^[1]。尽管有些原材料只显示轻度的霉菌污染,甚至未显示霉菌的污染,但真菌毒素仍可能存在于原材料之中^[2]。由于真菌毒素对高温等的抵抗力很强,在食品加工过程中不易被破坏和去除,很可能进入到最终产品中。所以,及时发现原材料中霉菌及其所产生的毒素的污染,不仅能为食品工业提供高质量的原材料,而且可以预防霉菌及其毒素污染而引起的疾病之流行。因此,对食品中霉菌及其代谢产物的检测和分析,日益受到广大科技工作者、食品企

业管理人员、食品卫生监督机构和消费者的重视。许多国家逐步制定了相应的法规和检验方法。在此期间,各种检测和分析食品中霉菌及其代谢产物的方法也相继得到了发展,其中包括传统的微生物学培养法,培养基特性变化的测量,耐热酶的测定,菌丝的显微镜鉴定,细胞壁壳多糖的化学特性测定等^[1]。以后又有人介绍了一种直接落射荧光技术,以测定浓缩番茄汁中霉菌的污染状况。但是,上述许多方法都有其不足之处,例如,传统的微生物学的培养方法所需时间较长,而且,无法检测出经加热处理后的食品中霉菌污染状况^[3]。

1997-12-22收稿, 1998-08-12修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在耐热性酶测定中的ATP-assay分析中,由于从食品中分离菌丝的技术要求太高而未能得到普及。显微镜菌丝测定法缺乏精确性。化学方法工作量大,耗时多,而且需要复杂的实验室设备等等^[1]。因此,研究和建立一种快速、简便、可靠的测定食品中霉菌的方法就显得十分必要和紧迫了。

Notermans 等人在1985年至1989年曾用酶联免疫吸附法和霉菌乳胶凝集法检测并分析了各类食品中由霉菌分泌的具有抗原性的细胞外多糖(extracellular polysaccharide,以下简称EPS)^[2~5]。由于这种方法快速、简便、高度的敏感性和特异性而引起了欧美科技工作者和许多食品企业界的兴趣并受到了关注。

20年前,有人认识到真菌能够产生大量的细胞外大分子物质,而某些寡聚物(oligomers)可能是某些复杂物质的降解产物,很可能来源于细胞壁^[6]。从*Penicillium charlesii*的培养物的滤液中分离出并确定了半乳卡洛糖(galactocarolose)和甘露卡洛糖(mannocarolose),前者是一种含有5-O- β -D呋喃半乳糖基的十碳糖,后者是一种含有 α -D-吡喃甘露糖基的九碳糖。也有人认为,半乳甘露聚糖不仅是广泛地存在于真菌中的多糖之一,而且是构成细胞壁的基本成分,这些聚合糖来自于复合糖蛋白^[7]。Gander等人认为这是一种肽聚磷酸半乳甘露聚糖(Peptidophosphogalactomannan)^[8],有人还发现*Cladosporium werneckii*, *C. fulvum*和有些皮肤真菌,如毛癣菌和小孢子菌、曲霉和青霉的一些菌株也能产生磷酸肽半乳甘露聚糖^[9~10]。直到1979年,Reis和Lehmann在感染了烟曲霉的动物和人类体液中提取出一种半乳甘露聚糖并发现它具有抗原性,人们对由霉菌产生的半乳甘露聚糖的研究兴趣才得以大大地提高^[11]。

1985年,Notermans等人观察到,当某些真菌在各类食品中生长时,也能产生这类多糖并释放到周围环境中去^[5]。于是,他们用产抗原量高的霉菌菌株接种培养之后,用柱色谱分离法得到了由霉菌产生的这种细胞外多糖并分析了它们的特性。他们发现,几乎所有的曲霉和青霉都产生EPS,这种EPS具有抗原性,而其抗原性又具有属的特异性;溶于水;有高度的耐热性;只存在于被霉菌污染的食品中。经过分析,认为EPS主要是由葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成。其中各种单糖的比例因霉菌属的不同而有差异。以后的实验又观察到白

地霉、镰孢菌、枝孢霉、毛霉和根霉都能产生具有特异性的、免疫性不同的抗原。

1986年,Notermans等人用提纯后的霉菌抗原对家兔进行反复多次的免疫,经过一定时间后自家兔血清中提纯了相应的抗体,并用夹心酶联免疫法(Sandwich-ELISA)对霉菌培养物和各类食品进行了测定和分析。他们认为,这种方法有希望取代某些传统的方法用来检测食品的霉菌污染状况^[3]。这不仅使ELISA得到了发展,而且也为食品中霉菌及其代谢产物的检测和分析开辟了新途径。自那时到现在十几年的时间内,为了评价这种方法的可行性和可靠性,世界各地的一些有关科学工作者做了大量的工作,进一步分析和研究了这两种方法,许多以后的实验资料都反复证实了以前的实验结果。而且,在对人工接种的霉菌样品的分析中还观察到抗原量的产生与菌丝干重和每克样品中霉菌菌落数有一定的相关关系^[3,5,12~13];Lin等人用ELISA测定了番茄酱中的霉菌抗原(由互隔交链孢霉、白地霉、匍枝根霉等产生的EPS),交叉反应在10%以下,而且还观察到了抗原值与加入到番茄酱中的霉菌值有正的相关关系,认为比大部分化学方法敏感^[14]。

1989年Kamphuis等将抗*Penicillium digitatum*-EPS的抗体吸附在直径为0.8 μ m的乳胶微粒的表面,用这种颗粒性抗体对25种霉菌的滤液进行了分析,发现这种抗体只与其中各种青霉和曲霉发生阳性反应^[4]。他们还用这种方法检测了各类食品,得到了类似的结果。该方法还包括了一个假阳性的检测系统,这是由合成的半抗原构成的一个特异性封闭系统,以提高方法的可靠性。这种方法被称为霉菌乳胶凝集法(Mold Latex Agglutination Test,简称MLAT),实际上就是抗原-抗体玻片凝集法,整个反应过程只需20—30min^[15]。

1990年,世界上8个国家的9个实验室合作,用MLAT分别对来自澳大利亚、美国、联邦德国、挪威、荷兰、以色列、比利时和瑞士等国的各类不同的食品(谷类、果汁、动物饲料、调味品和坚果类)进行了分析,同时还采用了传统的霉菌菌落计数法检测了同批样品,并将两种方法所得的结果进行了比较。他们认为MLAT是一种快速、简便和可靠的检测食品中青霉、曲霉的(半)定量方法,适用于对多种已加工和未加工的食品如谷类、动物饲料、果汁和调味品等食品中霉菌污染的分析,但不包括坚果类^[15]。

无论食品是否经过加热处理,都可用 Sandwich-ELISA 和 MLAT 两种方法测出其中的霉菌之污染,而且两种方法测得的结果相似。虽然,ELISA 比 MLAT 敏感 5~10 倍,但后者的敏感性也可以通过增加抗体浓度而得到提高。ELISA 的试验过程为 5~10h,而 MLAT 只需 20~30min^[3,5]。目前,在西欧市场上已有这两种方法的试剂盒销售,主要是用于检测食品中青霉和曲霉的污染,由镰孢菌分泌的 EPS 的检测试剂尚在研究之中。

关于食品中 EPS 与真菌毒素之间的关系,至今报道较少。对一些市售食品进行的检测结果显示,由青霉和曲霉产生的 EPS 存在于所有含黄曲毒素 B₁ 的样品中,并且,EPS 的含量与黄曲毒素 B₁ 有一定的相关关系。在人工接种产毒菌株的样品中,用 Sandwich-ELISA 在霉菌生长的很早期即可测出有抗原生成^[3]。本文作者用 Sandwich-ELISA 和传统的微生物学培养法分析测定了我国某地区的近 100 份稻谷和大米样品,同时还测定了其中的黄曲毒素 B₁ 的含量,并将 EPS(青霉和曲霉属)与同批样品中黄曲毒素 B₁ 的含量和每克样品中青霉和曲霉的霉菌菌落数三者的关系进行了相关分析,结果为 EPS 的含量与每克样品中霉菌菌落数呈明显正相关,但与黄曲毒素 B₁ 的含量则相关不显著^[11~12]。

综上所述,由于 EPS 的产生比真菌毒素更早且存在于所有含黄曲毒素 B₁ 的样品中,它不仅能够较早期地反映食品中霉菌的污染状况,而且可以提示待测样品中真菌毒素存在的可能。又,在所有加工前后的食品中,EPS 的含量都与每克样品中霉菌菌落数相关显著,加之霉菌抗原测定法的快速和简便,因此,这种方法很有希望在西欧诸国和美国取代传统的霉菌菌落计数法而用于大批样品中霉菌污染的分析 and 筛选,在我国也

有广泛应用之可能。

参 考 文 献

- [1] Jarvis B, Seiter, D A L Ould A J L *et al.* *J Appl Bacteriol*, 1984, **55**:325~336.
- [2] Northolt M D, Thesis Ph D. Agricultural University of Wagenigen, The Netherland, 1979.
- [3] Notermans S, Kamphuis H. *Food and Agricultural Immunology*, 1990, **2**:37~46.
- [4] Kamphuis H J, Notermans, S Veenemans G H *et al.* *J Food Prot*, 1989, **52**:244~247.
- [5] Notermans S, Heuvelman C J. *Int J Food Microbiol*, 1985, **2**:247~258.
- [6] Marth E H, Doyle M P. *Food Technol*, 1979, **33**: 81~87.
- [7] Kamphuis H J, De Ruiter G A, Notermans S *et al.* *Food & Agricultural Immunology*, 1992, **4**:241~251.
- [8] Gander J E, Jenioft, N H Drewes L R *et al.* *J Biological Chemistry*, 1974, **429**:2063~2072.
- [9] Dow J M, Callow. J A J *General Microbiology*, 1979, **113**:57~66.
- [10] Miyazaki T, Yadomae. T *Chemists and Pharmacists Bulletin*, 1968, **16**:1721~1725.
- [11] Reis E, Lehman P F. *Infect Immun*, 1979, **25**:357~365.
- [12] Xu Y, Schwabe M, Kraemer J. *Proceeding of 3rd World Congress of Foodborne Infections and Intoxications*, Berlin, 1992, 1244~1247.
- [13] Xu Y, Kraemer J. *Proceeding of the 15th International Symposium, Food Micro' 93*, Bingen, Germany, 1993, 78. .
- [14] Schwabe M, Kamphuis H, Truempner U *et al.* *Food and Agricultural Immunology*, 1992, **4**:19~25.
- [15] Notermans S, Kamphuis. H *Food and Agricultural Immunology*, 1990, **2**:37~46.