

乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 吸附作用的研究

李志刚 杨宝兰 姚景会 徐 进

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为研究生物防霉去毒,探讨了乳酸菌吸附黄曲霉毒素 B₁ 的强度及被吸附的黄曲霉毒素 B₁ 的致突变性。将乳酸菌细胞与黄曲霉毒素 B₁ 在生理盐水中相混合,在 37 °C振荡培养 60 min 和 120 min 后检测生理盐水中黄曲霉毒素 B₁ 的含量,同时利用 Ames 试验检测被吸附的黄曲霉毒素 B₁ 的致突变性。结果表明,在使用的 8 株乳酸菌中,乳酸菌结合黄曲霉毒素 B₁ 的强度在 4 %~50 %之间,其中干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539 吸附黄曲霉毒素 B₁ 能力最强。Ames 试验表明,被结合的黄曲霉毒素 B₁ 仍有较强的致突变性。

关键词:乳杆菌属;乳球菌属;黄曲霉毒素 B₁;Ames 试验

Surface of binding of Aflatoxin B₁ by Lactic acid bacteria

Li Zhigang, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: The toxin binding ability of eight strains of lactic acid bacteria for aflatoxin B₁ were studied. *Lactic acid bacteria* were mixed with aflatoxin B₁ and incubated at 37 °C for 60 mins and for 120 mins. The toxin binding ability of the *lactic acid bacteria* ranged between 4 %~50 %. Among the *lactic acid bacteria* studied, *L. casei subsp. casei* CGMCC 1.539 demonstrated a significantly high aflatoxin binding ability than other strains. However, chloroform extracts of binding aflatoxin B₁ exhibited mutagenic effect. *Lactic acid bacteria* had the effect on binding aflatoxin B₁, and Ames test showed that binding aflatoxin B₁ exhibited mutagenic effect.

Key Words: Lactobacillus; Lactococcus; Aflatoxin B₁; Ames Test

真菌种类繁多,分布广泛,有些真菌被用于食品的加工生产,但有些真菌在特定条件下可导致粮油食品的腐败变质。有些真菌本身作为病原体引发人类和动物疾病,其次级代谢产物真菌毒素对人和动物具有毒性。真菌毒素是农产品的主要污染物之一,人畜进食被真菌毒素污染的粮食、饲料可导致急、慢性中毒。据报道,全世界每年约有 25 % 的粮油作物由于真菌毒素的污染而不能食用。^[1]从农业及健康角度出发,目前认为污染最严重,分布最广,危害最大的真菌毒素是黄曲霉毒素。黄曲霉毒素主要由黄曲霉、寄生曲霉产生,以污染玉米、花生、坚果等农作物及其制品为主。此外,从发酵食品中(如奶酪、发酵肉类、意大利腊肠、香肠和火腿)也有检出黄曲霉毒素的报道。^[2]国外的调查表明,发酵食品真菌污染是一个重要的公共卫生问题,优势菌群为青霉属(如圆弧青霉和纯绿青霉)和曲霉属的某些菌种

(如黄曲霉、赭曲霉和杂色曲霉等),产毒试验则可检测到展青霉素、青霉酸、赭曲霉毒素 A 和桔霉素。^[3,4]

目前防止真菌及其毒素对食品污染的主要途径是遵守良好的农业生产操作规范,选择抗真菌的优良品种,收获后储藏过程中采取有效的如化学防霉等措施。化学防霉剂种类繁多,广泛用于食品保鲜和防霉的山梨酸、苯甲酸及其盐类、丙酸及其盐类、二氧化硫与亚硫酸盐可抑制或延缓微生物的生长,但防霉效果不是很理想,且化学防霉剂对人和动物多有潜在的毒性。由于目前还缺少真正有效、经济、操作性强的防霉去毒措施,因此从安全的角度出发,探讨以生物控制方法预防真菌的生长与产毒具有重要意义。生物控制短期目标是指利用微生物间相互竞争的原理使真菌不生长或不产毒;长期目标是通过阐明黄曲霉毒素合成的分子生物学过程,利用转基因技术,去除产毒基因或抑制产毒基因的表达,使经过基因修饰的不产毒黄曲霉成为田间优势菌,以

作者简介:李志刚 男 主管技师

取代野生产毒菌株。^[5,6] 由于乳酸菌在发酵食品中的广泛应用和国外报道乳酸菌对某些真菌生长与产毒有抑制作用,同时对已存在的毒素亦有吸附作用。因此,乳酸菌在食品防霉去毒中的应用研究是目前生物控制的热点。

乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 吸附作用的研究始于 1995 年,目前在澳大利亚、日本和瑞典研究得较多。1999 年,澳大利亚已制定专项研究计划,拟全面研究乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附作用及其作用的机理。目前,乳酸菌与真菌毒素之间关系的研究越来越受到国际社会的关注,我国这方面的研究尚属空白。近几年来,我国乳制品的生产消费量大幅度上升,因此探讨乳制品中发酵用菌种与污染真菌毒素间的相互关系具有实际意义。本文探讨了乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附能力及被吸附的黄曲霉毒素 B₁ 的致突变性,为提高我国发酵乳制品卫生质量及乳酸菌在生物防霉去毒方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 本文使用的乳酸菌菌种见表 1。

表 1 本实验所使用的乳酸菌菌种

拉丁文名称	中文名称
<i>L. casei subsp. casei</i> CGMCC ⁽¹⁾ 1.574	干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC ⁽¹⁾ 1.574
<i>L. Plantarum</i> ATCC ⁽²⁾ 8014	植物乳杆菌 ATCC ⁽²⁾ 8014
<i>L. casei subsp. casei</i> CGMCC 1.539	干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539
<i>L. fermentium</i> ATCC14931	发酵乳杆菌 ATCC14931
<i>Lactococcus lactis</i> CGMCC 1.2030	乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030
<i>L. plantarum</i> CGMCC 1.103	植物乳杆菌 CGMCC 1.103
<i>L. helveticus</i> CGMCC 1.1877	瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877
<i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> CGMCC 1.863	德氏乳杆菌保加利亚亚种 CGMCC 1.863

注: (1) CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center; (2) ATCC: America Type Culture Collection, United States of America。

MRS 培养基。鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株 TA98 ,TA100 :美国 Ames 实验室。S9 为本实验室自制。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附作用

分别将乳酸菌接种到 MRS 肉汤 (pH6.8) 中, 37 °C 厌氧培养 24 h,在 4 °C 以 10 000 ×g 离心 10 min。弃上清液,在沉淀的乳酸菌细胞中加入生理盐水,轻轻吹打,重复离心 1 次,将乳酸菌的细胞悬液浓度调整为 1 ×10⁸ CFU/mL。取 5mL 乳酸菌细胞悬液,加入 100 μL 黄曲霉毒素 B₁ 苯 - 乙腈溶液 (AFB₁ 浓度为

100 μg/mL)。将混有 AFB₁ 的乳酸菌细胞悬液在 37 °C,180r/min 振荡条件下培养 60 min 和 120 min。在 4 °C 以 10 000 ×g 离心 10 min,弃上清液,并向沉淀中加入 5 mL 生理盐水并重复离心 2 次,按 TLC 法^[11]测定 3 次离心所得上清液中黄曲霉毒素 B₁ 的量。按下列公式计算乳酸菌吸附 AFB₁ 的强度:

乳酸菌吸附黄曲霉毒素 B₁ 的强度 (%) = (1 - 上清液中 AFB₁ 的量/实验前加入标准的 AFB₁ 量) × 100 %。

1.2.2 吸附在乳酸菌上的黄曲霉毒素 B₁ 的致突变研究

向 1.2.1 项吸附黄曲霉毒素 B₁ 最强的乳酸菌细胞沉淀中加入 5 mL 生理盐水,轻轻吹打,以此作为有活性的乳酸菌细胞组,取该组部分样本经 121 °C 高压 15 min,作为死菌组进行 Ames 试验。

1.2.1 项与 1.2.2 项试验分别重复 2 次,以 3 次试验的平均值用 SAS6.12 作统计分析。

2 结果

乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附强度结果见表 2。8 株乳酸菌吸附黄曲霉毒素 B₁ 能力为 4 % ~ 50 %,菌种间差异较大,其中干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539 吸附黄曲霉毒素 B₁ 的强度最大,为 49 %;乳酸菌与黄曲霉毒素 B₁ 混合 60 min 与 120 min,对乳酸菌的吸附能力差异无显著性 (P > 0.05)。

表 2 乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附强度 %

菌种	60 min	120 min
干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.574	19.00 ±3.61	21.00 ±3.00
植物乳杆菌 ATCC 8014	15.00 ±3.00	15.33 ±4.51
干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539	46.33 ±7.10	49.00 ±5.80
发酵乳杆菌 ATCC14931	26.33 ±2.08	25.00 ±4.36
乳酸乳球菌 CGMCC 1.2030	29.00 ±3.61	31.33 ±6.51
植物乳杆菌 CGMCC 1.103	9.33 ±2.08	10.33 ±3.51
瑞士乳杆菌 CGMCC 1.1877	4.67 ±2.52	3.67 ±1.53
德氏乳杆菌保加利亚亚种 CGMCC 1.863	4.00 ±2.00	4.33 ±2.52

干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539 吸附黄曲霉毒素 B₁ 致突变试验结果见表 3。乳酸菌吸附黄

表 3 干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539 吸附黄曲霉毒素 B₁ 的致突变试验

试验处理组	回复突变数	
	TA98	TA100
生理盐水对照	36	120
三氯甲烷	38 ±6	120 ±20
苯 - 乙腈	31 ±6	133 ±15
黄曲霉毒素 B ₁ (0.24μg/mL)	1193 ±110	1477 ±143
干酪乳杆菌干酪亚种 CGMCC 1.539		
活菌	943 ±80	1330 ±108
死菌	930 ±161	1190 ±165

曲霉毒素 B₁ 后,乳酸菌无论是在存活状态下,还是经加热处理,Ames 试验结果均表明,对 TA98 和 TA100 菌株仍有较强的致突变性。尽管菌落的回复突变数较黄曲霉毒素 B₁ 对照组低,但二者间差异并无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

Nagendra^[7]等研究了 4 株双歧杆菌和 2 株乳杆菌吸附黄曲霉毒素 B₁ 的能力,将乳酸菌与黄曲霉毒素 B₁ 在 37 °C 混合振荡 15、60 和 120 min 后,检测其中的黄曲霉毒素 B₁,结果表明乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 去除能力为 20 %~50 %,用蒸馏水洗涤两遍吸附黄曲霉毒素 B₁ 的乳酸菌后,有 10 %~40 %的黄曲霉毒素 B₁ 还被吸附在乳酸菌上,说明乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 有较强的吸附作用。乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附能力与相互作用的时间没有关系,去毒能力与乳酸菌的细胞数目成正比。Hani EL-nezami^[8]等筛选出了两株鼠李糖乳杆菌 ATCC53103 和鼠李糖乳杆菌 DSM - 705,两株菌吸附黄曲霉毒素 B₁ 的能力可高达 80 %;吸附着黄曲霉毒素 B₁ 的乳酸菌细胞经乙醇、紫外照射、超声或碱处理后其对黄曲霉毒素 B₁ 的吸附强度不受影响。鼠李糖乳杆菌 ATCC53103 和鼠李糖乳杆菌 DSM - 705 去除鸡肠腔液内黄曲霉毒素 B₁ 的体内研究表明,鼠李糖乳杆菌 ATCC53103 可使肠腔液内黄曲霉毒素 B₁ 浓度下降 54 %,鼠李糖乳杆菌 DSM - 705 则为 44 %,肠腔内组织摄取黄曲霉毒素 B₁ 的量下降了 75 %。鼠李糖乳杆菌 ATCC53103 和鼠李糖乳杆菌 DSM - 705 也可去除全脂奶与脱脂奶中污染的黄曲霉毒素 B₁。Maritsa pierides^[9]等从液体培养基中去除黄曲霉毒素 B₁ 的研究表明,所使用的乳酸菌无论是活菌,还是经加热处理后的死菌均有吸附 AFB₁ 的作用。Pasi kanakanpaa^[10]等研究认为,鼠李糖乳杆菌 ATCC53103 吸附黄曲霉毒素 B₁ 后,其自身的吸附能力下降了 30 %~50 %,故作者认为:黄曲霉毒素 B₁ 可影响乳酸菌的吸附能力,在动物肠道内乳酸菌通过与黄曲霉毒素 B₁ 形成黄曲霉毒素 B₁ - 乳酸菌复合物排出体外而起到解毒的作用。目前有学者认为黄曲霉毒素 B₁ 通过非共价方式与乳酸菌的细胞壁的多聚糖和肽糖脂等组分相结合形成黄曲霉毒素 B₁ - 乳酸菌复合物。^[7]

本研究结果表明,8 种乳酸菌结合黄曲霉毒素 B₁ 的能力在 4 %~50 %之间,菌种间差异较大;乳酸菌与黄曲霉毒素 B₁ 混合 60 min 与 120 min,二者

对乳酸菌的吸附能力并无显著差异,这与国外的研究结果基本一致。

形成黄曲霉毒素 B₁ - 乳酸菌复合物后,本研究率先对牢固结合在乳酸菌细胞壁上黄曲霉毒素 B₁ 的致突变性进行了研究。TA98 菌株可检测各种移码型诱变剂,TA100 菌株可检测引起碱基对置换的诱变剂,Ames 实验结果表明,黄曲霉毒素 B₁ - 乳酸菌复合物无论是乳酸菌在存活状态下,还是经加热处理形成死菌后,尽管菌落的回复突变数较黄曲霉毒素对照组低,但二者间差异并无显著性,对 TA98 和 TA100 菌株仍有较强的致突变性,这也间接说明尽管黄曲霉毒素 B₁ 可结合在乳酸菌细胞上,但其化学结构可能并未改变。尽管如此,形成的黄曲霉毒素 B₁ - 乳酸菌复合物可能也会阻止黄曲霉毒素 B₁ 在人体内的吸收,同时复合物较之黄曲霉毒素 B₁ 更易排出体外,从而减少黄曲霉毒素 B₁ 在人体中的量。

参考文献:

- [1] Council for agricultural science and technology. Mycotoxins: Economic and health risks[R]. USA. 1989, No. 116.
- [2] Hassan G, Bullerman LB. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* spp[J]. J Food Prot, 1995, 57: 1249—1256.
- [3] Bennett J W, Papa K E. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp[J]. Adv Plant Pathol, 1988, 6: 265—279.
- [4] Cotty P J, Bhatnagar D. Variability among toxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2248—2251.
- [5] France T, Mahanti N, Linz J E. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis[J]. Microbiology, 1995, 141: 755—765.
- [6] Robert E M, Townsend C A. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis[J]. Chem Rev, 1997, 97: 2537—2555.
- [7] Nagendra S, Wu X R. Aflatoxin B₁ binding abilities of probiotic bacteria[J]. Bioscience Microflora, 1999, 18(1): 43—48.
- [8] Hani E L-nezami, Hannu Mykkanen Pasi kanakanpaa, Seppe salminen, et al. Ability of lactobacillus and propionibacterium strains to remove AFB₁ from the chicken duodenum[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(4): 549—552.
- [9] Maritsa pierides, Hani EL-nezami, Karita peltonen, et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind AFB₁ in a food model[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63

- [10] Pasi kanakampaa, Elina Tuomola, Hani EL-nezami, et al.
Binding of AFB₁ alters adhesion properties of Lactobacillus
rhamnosis strain GG in a Caco-model[J]. Journal of Food

- [11] GB/T 5009.22—1996. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法[S].

[收稿日期:2003-01-31]

中图分类号:R15;Q939.117 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)03-0212-04

《中国食品卫生杂志》2003 年征订启事

《中国食品卫生杂志》(ISSN 1004-8456/CN 11-3156/R)系中华预防医学系列杂志,公开发行,双月刊,96 页。所设栏目论文部分有:论著、实验技术与方法、监督管理、调查研究、综述、食物中毒、CAC 专栏、网络信息;法规文件部分刊登有关食品卫生的国家法律、法规、标准、行政答复、通告等。读者可以通过本刊及时掌握国家新颁布的食品卫生法律、法规,了解最新食品卫生科研成果,解决工作中遇到的问题,提高论文水平。

本刊现可通过邮局订阅,邮发代号:82-450;同时自办发行并常年办理订阅,2003 年《中国食品卫生杂志》全年售价 76 元(含邮费),个人订户按本卷第 1 期第 38 页“联合征订启事”办理。从邮局汇款时请注明订阅册数、详细的收件人地址、单位、邮编、收件人姓名;通过银行汇款的单位,请在汇款的同时寄函或电传我所以以下内容:订阅册数、详细收件人地址、单位、邮编、收件人姓名,以便准确邮寄。

希望挂号投寄期刊的用户,每期杂志需加挂号费 2 元,全年合计挂号费 12 元,并请寄款时同时说明要求挂号。

汇款地址:北京市朝阳区潘家园南里 7 号

《中国食品卫生杂志》编辑部

邮 编:100021

联系人:刘瑕

电 话:(010)87781383

电 传:(010)67711813

银行汇款:北京农业银行开发区支行潘家园分理处

账 号:11-220201040003236

户 名:中国疾控中心营养与食品安全所 请注明“《中国食品卫生杂志》订阅款”

[上接本期导读]

的基础,在我们这样一个经济上还不发达的国家,学习、借鉴、改进是现阶段的重要手段。在下一期我们将推出王竹天教授的“我国水产品中铅含量监测及应对国际标准制定的对策”一文,该文围绕国际组织对铅标准的制定,考虑其对我国经济可能产生的影响,我们目前应急需做的工作。本期推出的冯家望同志的“进出口食品微生物检验有关问题的探讨”一文,则指出了我国口岸在进出口检验工作中存在的问题,这些问题对进出口的影响及其建议。这些文章表明,我们已然是以实际行动应对 WTO 了,应对 WTO 还有许多工作要做,我们任重道远。

尽管我们不间断地推出各种食品生产的 HACCP 方面的文章,我们还是非常遗憾地看到海城发生的食物中毒。不知豆奶的生产厂家是否在工作中实施了 HACCP,但至少有一点,在豆奶中需要灭活的除与一般食品相同的外,还有其特殊的需灭活的物质,如抗营养因子,在豆奶生产中这至少应是一个关键控制点。希望大家一方面在工作中大力推行 HACCP,另一方面对以往的教训举一反三,针对所生产食品的特点,不落掉一个关键控制点。

本期还刊登了卫生部的《集贸市场食品卫生管理规范》。在这之前,我国没有统一的集贸市场管理办法,各省根据自己的情况制定。经过多年的经济发展和工作实践,一个统一的《集贸市场食品卫生管理规范》应运而生。该规范的特点之一是在集贸市场的食品卫生方面,卫生行政管理部门、集贸市场的举办者、食品生产经营者责任明确。另一方面将街头食品纳入到了集贸市场管理之中。为配合大家领会该管理规范,我们将请有关专家解读,敬请关注。当下,我国部分地区发生“传染性非典型性肺炎”,该病对我国的人民健康、生产、旅游、出口等经济活动发生了重大影响。但同时该病也将预防医学在我国经济建设的重要性凸显到了空前的高度。相信这一事件使全国上下对市场经济下的“预防为主”有了新的认识。可以想见,今后预防医学工作者将承担更重要的使命。目前在各级疾病预防控制机构,我们的许多同志辛苦在防治“非典”的工作中,编辑部的全体同仁向这些同志致以深切的敬意。