

伏马毒素削减方法研究进展

杨朋飞^{1,2},王楠希²,屈凌波¹,伍松陵²,孙长坡²

(1. 河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001;2. 国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:伏马毒素(Fumonisin,FB)是镰刀菌属(*Fusarium spp.*)在一定温度和湿度条件下产生的水溶性次级代谢产物。它不仅污染粮食作物造成粮食减产,还对人畜的健康造成巨大损害,近年来关于FB削减已成为研究热点。传统的物理、化学方法虽能一定程度削减FB,但削减不彻底,破坏营养成分,引入不确定因素,而生物方法反应温和,效率高,环境友好。目前,国际上对FB的削减研究已进入分子水平,已筛选到相关的降解菌,降解基因也已被克隆。综述了FB削减方法的研究进展,提出FB削减的有关建议。

关键词:真菌毒素;伏马毒素;毒性;污染;削减

中图分类号:TS 207.7;R155.5+1 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)05-0082-04

Research progress in fumonisins' degradation

YANG Peng-fei^{1,2}, WANG Nan-xi², QU Ling-bo¹, WU Song-ling², SUN Chang-po²

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan 450001;

2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: Fumonisin (FB) is a kind of water soluble secondary metabolites produced from genus *Fusarium* under a certain temperature and humidity condition. It not only greatly pollutes grain crops which will cause reduction of output but cause huge damage to humans and animals. Recently, degradation of FB has become a research hotspot. Although the traditional physical and chemical methods can reduce part of fumonisins the degradation is not complete, the nutritional components are damaged and some uncertainty is introduced, while the reactions by biological methods are mild, high efficiency and friendly to environment. Now, the research on degradation of FB has reached molecular levels. Correlative degrading bacteria have been filtrated and some degrading genes have been cloned. The research progress in degradation of FB was summarized. The advice for degradation of FB was proposed.

Key words: mycotoxin; fumonisin; toxicity; pollution; degradation

真菌毒素是真菌在生长繁殖过程中产生的次生有毒代谢产物,主要存在于植物特别是谷物中,如玉米、小麦、大麦、黑麦、稻米、豆类和燕麦^[1]等。真菌毒素的产生菌主要有曲霉菌、镰刀菌、青霉菌等^[2],这些真菌产生伏马毒素(FB)、黄曲霉毒素(AFT)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、展青霉素(PAT)、赭曲霉毒素A(OTA)等真菌毒素,到目前为止,已确定的真菌毒素不少于1 000种,并且这一数字还在持续增长中。2011年,我国卫生部公布的强制性标准GB 2761—2011《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》对食品中黄曲霉毒素B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素M₁(AFM₁)、DON、

PAT、ZEN和OTA的含量作出了明确的规定,但尚未提及FB^[3]。事实上,FB污染范围广,强毒性和致癌性引发了人们的关注。

1 伏马毒素

伏马毒素首次由 Gelderblom 从串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)培养液中分离出,Bezuidenhout等^[4]首次阐明了FB的化学结构。产生FB的镰刀菌主要有串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)、多誉镰刀菌(*F. proliferatum*)、花腐镰孢菌(*F. anthophilum*)、*F. nygamai*和其他一些镰孢菌属。FB是一类由不同多氢醇和丙三羧酸组成的双酯化合物,包括一条由20个碳组成的脂肪链和14、15号碳上连接的两个相同酯键侧链^[5]。目前,已发现A、B、C和P四大类,共28种FB,其中FB₁、FB₂和FB₃三种最为常见,FB₁含量最

收稿日期:2015-03-05

基金项目:粮食公益性行业科研专项(201313005)

作者简介:杨朋飞,1989年出生,男,在读硕士生。

通讯作者:孙长坡,1975年出生,男,博士,研究员。

高(约占70%)、毒性最强、对谷物的污染最严重^[6],对FB的研究主要集中在FB₁。

伏马毒素与世界范围内人类食管癌高发率有关,在非洲、南美洲、中美洲和中国等玉米主要消费区,玉米中FB的含量与当地成人食管癌发病率有很大关系^[7]。中国某些地区的肝癌人数的增加也与FB₁有关,但FB₁诱发癌症的发病机制并不清楚,也存在很大争议。国际癌症研究中心(IRAC)评估FB对人类的危害后,将其划到2B组(可能致癌物)。食用FB污染的玉米制品也会增加新生儿脊髓灰质炎发病率。FB对动物也有毒害,FB会引起马的脑白质软化(ELEM)^[8],猪的胸腔积水(PPE)^[9],犏犏的心力衰竭^[10],老鼠的肝癌和肾癌^[11]。

目前,国际上对食品和饲料中FB的限量尚无统一标准。美国FDA规定的食品中最大限量为2.0 μg/g^[12],欧盟为1.0 μg/g^[13]。美国兽医诊断协会真菌毒素委员会规定了动物用饲料中FB的限量范围为1.0 ~ 50.0 μg/g^[14]。我国对食品和饲料中FB的限量还没出台相关标准,卫生部门应尽快出台相关标准,保障我国的食品和饲料质量安全。

2 削减方法

伏马毒素对谷物的污染的广泛性和对人畜巨大的毒性,使降解FB成为一个迫切的问题。FB的削减方法已经有很多学者进行研究,总体上看,大致可以分为以下三类方法:物理削减、化学削减和生物削减方法。

2.1 物理削减法

2.1.1 热处理法

伏马毒素虽具有一定的热稳定性,但在较高的温度条件下FB的结构会被破坏。Tania等^[15]比较了传统加热、干热处理和高压处理三种方法对大米中FB₁含量的影响。传统加热可降低80%的FB₁,干热处理在150 ~ 200 °C时可降低83%的FB₁,高压处理不会降低FB₁。Pitt发现在玉米挤压加工过程中,温度超过160 °C,可降低产品中FB含量。Castelo等^[16]研究了被FB污染的玉米粉和添加FB的玉米粉在烘烤后,FB量会减少,但把污染玉米粉做成罐头或蒸煮,FB量基本不变。这是因为烘烤的温度较高,破坏了FB的结构。热处理法降解毒素的同时也会破坏食物中的营养成分,有一定的局限性。

2.1.2 密度差异处理法

张浩等^[17]用水和10%、20%、30%和饱和的NaCl溶液浸泡FB污染的玉米。玉米粒由于密度不同而上下分层:上层玉米颗粒空瘪,颜色发灰,检出含大量FB;下层玉米颗粒饱满,颜色金黄,未检出FB。用清水浸泡过的上层玉米样品中FB减少66.4%,而用

30% NaCl溶液浸泡过的上层玉米中FB减少90.8%。用盐水处理后的上浮玉米可以作为肥料使用,下层玉米检测达标后可用于进一步的工业加工。此法只适用于少量污染玉米中FB的去除,不适宜大量去除。

2.1.3 辐照处理法

杨静^[18]研究了γ射线和电子束对污染FB₁的玉米进行照射处理,随着辐射剂量的增加(0 ~ 10 kGy),FB₁逐渐减少,且在10 kGyγ射线时,FB₁降解率达到63.4%。Aziz^[11]小组研究了γ射线对FB的降解效果,当γ射线辐照剂量为5 kGy时,玉米、小麦和大麦中FB₁的降解率分别为87%、97%和100%;当辐照剂量达到7 kGy时,玉米和小麦中的FB会被完全破坏,丧失毒性。辐照处理可以有效降低粮食中FB的含量,但小麦经过5 kGy剂量辐照比未经辐照的小麦其α-淀粉酶活性下降41%,脂肪酸含量大幅增加,会对加工品质产生一定的影响,且会对种子产生损伤,降低种子活力^[19]。辐照方法无二次污染、操作简便、速度快,但会影响小麦的加工品质,此外作为种子用的小麦慎用辐照法。

2.1.4 加工过程处理法

Generotti等^[20]研究了在工业加工过程FB在谷物制品中的含量变化,结果显示清洗和谷物去皮可减少谷物粉中约40%的FB。Pitt也发现将玉米加工成粉状或破碎,可降低玉米中FB含量^[7]。该法消耗大量水和能源,加工过程易造成资源浪费。

2.1.5 吸附处理法

利用疏松多孔物质的吸附作用可降低毒素的生物活性。将活性炭、粘土和硅藻土加入轮枝镰孢菌溶液中,可吸附85%的FB₁^[21]。用含2%活性炭的FB₁污染饲料饲喂小鼠,可降低小鼠体内SA(二氢神经鞘氨醇)浓度和SA/SO(神经鞘氨醇)比值,降低小鼠肝癌的发病率。该法操作条件要求较高,大规模使用效率不高,处理后谷物与吸附剂的分离会增加操作难度。

2.2 化学削减法

2.2.1 异硫氰酸盐(ITC)处理法^[22]

伏马毒素结构上含有一个氨基(电子供体)可与ITC上的活性碳原子(电子受体)反应。在PBS缓冲液中加入等体积的FB(1 mg/L)和ITC(1 mg/L),用LC-MS-LIT检测,缓冲液中FB₁和FB₂减少42% ~ 100%,这个反应受pH影响较大,酸性条件不利于该反应。用气态ITC熏蒸被FB污染的玉米粒和玉米粉会使FB与ITC形成共轭物,该法能减少FB₁ 53% ~ 96%,FB₂ 29% ~ 91%和FB₃ 29% ~ 96%。Azaiez等^[23]发现ITC类物质可被应用于食品工业中,ITC能使面包中FB₂减少73% ~ 100%。该法目前研究较

多,降解效果良好。

2.2.2 肉桂油处理法^[24]

Xing 等用 ELISA 法检测肉桂、柠檬醛、山苍子、丁香、桉树、茴香、绿薄荷和樟脑等八种植物的精油对 FB₁ 的降解作用,发现肉桂油对 FB₁ 的降解效果最好,其次依次是柠檬醛、丁香油、桉树油、茴香油和樟脑油。肉桂油降解 FB₁ 的最佳条件是浓度 280 μg/mL,30 °C 处理 120 h,可将 FB₁ 的浓度从 15.03 μg/mL 降至 0.89 μg/mL,降解率达 94.08%。肉桂油有望被应用于玉米制品中 FB₁ 的削减。该法降解效率高,但操作时间稍长。

2.2.3 氢氧化钙浸泡处理法^[25]

污染玉米样品用 0.03 mol/L Ca(OH)₂ 溶液,在 25 °C 下浸泡 8 h,可使 FB 的残存率降为 48% ~ 58%。但该法耗时,还需进一步优化。

2.2.4 氨气处理法

Chourasia^[26] 研究发现通过氨处理可以分别降低培养基和串珠镰刀菌污染的玉米中 FB₁ 含量至 30% 和 40%,但不能减少毒性。用 100 gFB₁ 污染的玉米做样袋,预埋在粮仓上、中、下三层,用氨气熏蒸,可平均降低 79% 的 FB,但氨气熏蒸处理的玉米对小鼠的毒性并未改变,会出现串珠镰刀菌中毒迹象^[27]。该法不能降低污染玉米的毒性,存在局限性。

2.2.5 臭氧处理法

Mckenzie 等^[28] 用 2%、10% 和 20% 三种浓度的 O₃ 处理 FB₁、AFB₁、ZEN 等 10 种真菌毒素,FB₁ 与 O₃ 反应 15 s 可被迅速分解,并生成 3-酮基-FB₁ 衍生物,这种衍生物毒性更强,所以臭氧处理法没有实用价值。

2.2.6 加糖处理法

Lu 等^[29] 在一个无酶玉米模型系统中加 100 mmol D-葡萄糖到 FB₁ 污染玉米中,60 °C 处理 8 d,FB₁ 的浓度减少 50%,温度提高到 80 °C 只需处理 2 d,可达同样效果。该法在模型系统中是有效的,但能否大规模工业应用还需进一步验证。

2.2.7 农药处理法

苯菌灵是一种农药,用于农业杀菌。Cruz 等^[30] 发现苯菌灵会影响 FB 生物合成基因(FUM1 和 FUM19)的正常表达,从而减少 FB 的产生。由于农药不能过度使用,会限制该法的降解效果。

2.3 生物削减法

2.3.1 细菌降解法

该法是利用微生物将毒素作为营养源来达到降解、转换的目的。Benedetti 等^[31] 用富集培养法从土壤中分离出一株丛毛单胞菌属细菌,该菌可以 FB₁ 作为唯一碳源和氮源降解 FB₁。Duvick 等^[32] 发现两种黑酵母真菌 *Exophiala spinifera* 和 *Rhinochadiella*

atrovirens 可以将 FB₁ 为唯一碳源降解 FB。本实验室目前筛选到一株 FB₁ 高效降解菌,对 FB₁ 的降解率达到 99%,初步解析了降解机理,相关的降解基因也正在寻找。该法反应温和,不受时间和空间限制,但需确定细菌和降解产物对人畜是否有毒性。

2.3.2 酶降解法

Heinl 等^[33] 在细菌 *Sphingopyxis sp.* MTA144 中找到了两个水解 FB₁ 的关键基因,一个基因编码脱羧酶,另一个编码转氨酶。并且推测 FB₁ 的脱毒过程包括两步酶促反应,第一步在脱羧酶作用下进行脱羧反应,FB₁ 被催化成为 HFB₁;第二步在转氨酶的作用下进行转氨基反应,HFB₁ 被转化成 2-酮基-HFB₁,这两步酶促反应将 FB₁ 降解。Hartinger 等^[34] 研究得出细菌 *Sphingopyxis sp.* MTA144 产生的可降解 FB₁ 的转氨酶 Fum I 的酶解最适条件为:35 °C、pH 8.5 和低盐浓度,且认为 Fum I 可与脱羧酶 Fum D 共同作用水解 FB,这一研究结果与 Heinl 类似。此外将筛选的降解基因克隆至酵母菌、大肠杆菌等模式微生物中,使其大量表达水解酶,添加到镰刀菌污染的玉米等粮食中降解 FB,也可添加到饲料中,减少饲料中的 FB^[35]。该法反应速度快,效率高,专一性好,适合大规模使用。

2.3.3 基因工程降解法

Duvick^[32] 从真菌 *E. spinifera* 中找到 FB 降解基因并克隆至玉米等农作物中获得成功。该菌水解 FB₁ 的过程为:首先 FB₁ 被水解为 AP₁ 和 TCA,其次 AP₁ 被氨氧化酶氧化为 2-OP₁,最后经内部环化生成 2-OP₁ 半缩酮,这其中参与的酯酶、胺氧化酶和下游酶一起构成新的 FB 代谢途径。此外,转基因 Bt(苏云金杆菌)玉米是被用作抵抗欧洲玉米螟,也发现该转基因玉米有抑制玉米中 FB 产生的能力。该法可从源头减少 FB 污染。

2.3.4 信号反馈法

有证据表明植物会产生一个积极或消极的信号影响毒素积累。设计一种植物产生一种可溶性信号来打开或关闭在真菌中毒素的产生途径,干扰 FB 的正常产生,这种抑制毒素产生的植物已被报道^[36]。*F. verticillioides* 产的 FB 会受到氮元素含量的制约,但这种抑制 FB 产生的途径不易被控制,因为氮元素对农作物本身不可缺少。该法作为一种新型方法,还需进一步研究。

3 展望

伏马毒素的全球污染性和高危害性引起人们关注,许多国家正在进行 FB 削减研究,取得很大进展,同时也有很多方法需要改善。物理法可去除一定量的 FB,但条件要求高,易改变食品品质,所以此法的实施会受到限制。采用化学处理法也能降低

FB的含量但会引入新的化学物质,增加安全隐患,此外欧盟也禁止使用化学方法消除真菌毒素,所以化学削减法存在很大的局限性。FB是天然毒素,生物降解是一种非常有效的方法。生物降解法反应温和,专一性强,特异性高,但是方法还不成熟,成本较高,还需进一步优化。目前,新型降解菌制剂和酶制剂正在研发,随着科技发展会有更多更好的方法被发现,相信在不久的将来,FB等真菌毒素必将会得到完全控制。

参考文献:

- [1] Omurtag G Z, Yazıcıoğlu D, Beyoğlu D, et al. A review on fumonisin and trichothecene mycotoxins in foods consumed in Turkey[J]. *ARI, ITU - Bulletin*, 2006, 54: 39 - 45.
- [2] 程亮, 管建军, 常晓娇. 隐蔽型脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2012, 20(6): 61 - 64.
- [3] GB2761 - 2011, 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- [4] Bezuidenhout S C, Gelderblom W C A, Gorst - Allman C P, et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*[J]. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1988(11): 743 - 745.
- [5] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩, 等. 超高压液相色谱法同时检测玉米中的伏马毒素 B₁、B₂、B₃[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(1): 215 - 223.
- [6] Wang J, Zhou Y, Liu W, et al. Fumonisin level in corn - based food and feed from Linxian Country, a high - risk area for esophageal cancer in China[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(1): 241 - 246.
- [7] John Pitt. *Mycotoxins: Fumonisin*[J]. *Encyclopedia of Food Safety*, 2014(2): 299 - 303.
- [8] Geline - van Waes J, Voss K A, Stevens V L, et al. Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects[J]. *Advances in food and nutrition research*, 2009, 56: 145 - 181.
- [9] Bucci T J, Howard P C. Effect of fumonisin mycotoxins in animals[J]. *Toxin Reviews*, 1996, 15(3): 293 - 302.
- [10] Harrison L R, Colvin B M, Greene J T, et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1990, 2(3): 217 - 221.
- [11] Hard G C, Howard P C, Kovatch R M, et al. Rat kidney pathology induced by chronic exposure to fumonisin B₁ includes rare variants of renal tubule tumor[J]. *Toxicologic pathology*, 2001, 29(3): 379 - 386.
- [12] Food and Drug Administration(FDA). Guidelines for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds[S]. Rockville: FDA, 2001.
- [13] European Commission(EC). Commission Regulation (EC) NO 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) NO 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products[S]. *Off J Eur Union*, 2007, L255: 14 - 17.
- [14] 苏福荣, 王松雪, 孙辉, 等. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. *粮油食品科技*, 2008, 15(6): 57 - 59.
- [15] Becker - Algeri T A, Heidtmann - Bemvenuti R, dos Santos Hackbart H C, et al. Thermal treatments and their effects on the fumonisin B₁ level in rice[J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 488 - 493.
- [16] Castelo M M, Sumner S S, Bullerman L B. Stability of fumonisins in thermally processed corn products[J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(8): 1030 - 1033.
- [17] 张浩, 侯红漫, 刘胜楠, 等. 利用密度差异方法处理受伏马菌素污染的玉米[J]. *粮食与饲料工业*, 2007(11): 30 - 31.
- [18] 杨静. 农产品中真菌毒素污染辐射降解效应研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [19] 胡碧君. 电子束辐照对小麦理化性质及加工品质的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [20] Generotti S, Cirlini M, Dall'Asta C, et al. Influence of the industrial process from caryopsis to cornmeal semolina on levels of fumonisins and their masked forms[J]. *Food Control*, 2015, 48: 170 - 174.
- [21] 张笑, 侯红漫, 刘阳, 等. 食品中伏马菌素的污染及污染控制[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 127 - 129.
- [22] Font G, Azaiez I, Giuseppe M, et al. Detoxification of fumonisins by isothiocyanates[J]. *Toxicology Letters*, 2012, 211: 98 - 99.
- [23] Azaiez I, Meca G, Manyes L, et al. Antifungal activity of gaseous allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in vitro and their use for fumonisins reduction in bread[J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 428 - 434.
- [24] Xing F, Hua H, Selvaraj J N, et al. Degradation of fumonisin B₁ by cinnamon essential oil[J]. *Food Control*, 2014, 38: 37 - 40.
- [25] 檀丽萍. 玉米及玉米制品中伏马菌素的检测与去除[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [26] Chourasia H K. Efficacy of ammonia in detoxification of fumonisin contaminated corn [J]. *Indian journal of experimental biology*, 2001, 39(5): 493 - 495.
- [27] Niderkorn V, Morgavi D P, Pujos E, et al. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model[J]. *Food additives and contaminants*, 2007, 24(4): 406 - 415.
- [28] McKenzie K S, Sarr A B, Mayura K, et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1997, 35(8): 807 - 820.
- [29] Lu Y, Clifford L, Hauck C C, et al. Characterization of fumonisin B₁ - glucose reaction kinetics and products[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50(16): 4726 - 4733.
- [30] Cruz A, Marín P, Magan N, et al. Combined effects of benomyl and environmental factors on growth and expression of the fumonisin biosynthetic genes FUM1 and FUM19 by *Fusarium verticillioides*[J]. *International journal of food microbiology*, 2014, 191: 17 - 23.
- [31] Benedetti R, Nazzi F, Locci R, et al. Degradation of fumonisin B₁ by a bacterial strain isolated from soil [J]. *Biodegradation*, 2006, 17(1): 31 - 38.
- [32] Duveck J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(2): 337.
- [33] Heinel S, Hartinger D, Thamhesl M, et al. Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes[J]. *Journal of biotechnology*, 2010, 145(2): 120 - 129.
- [34] Hartinger D, Schwartz H, Hametner C, et al. Enzyme characteristics of aminotransferase FumI of *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B₁[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 91(3): 757 - 768.
- [35] 徐瑾, 伍松陵, 孙长坡, 等. 伏马菌素生物合成和降解的研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(7): 119 - 123.
- [36] Burow G B, Nesbitt T C, Dunlap J, et al. Seed lipoxigenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis[J]. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 1997, 10(3): 380 - 387. ㊟