

臭氧处理储粮中真菌毒素及对品质影响的研究进展^{*}

张崇霞¹ 朱延光¹ 李志民² 严晓平¹ 马一铭¹ 陈 帅¹ 周 庆¹

(1 中储粮成都储藏研究院有限公司 610091)

(2 中央储备粮梅河口直属库有限公司 135099)

摘 要 对粮食中常见的玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、黄曲霉毒素 B₁ 在粮粒上的分布特征以及臭氧对此 3 种真菌毒素的降解效果、降解产物的安全性和臭氧对粮食品质的影响做了论述, 以为臭氧在真菌毒素降解方面的应用提供参考。

关键词 臭氧 粮食 真菌毒素

DOI: 10.3969/j.issn.1674-1943.2021.05.012

真菌毒素是真菌的次级代谢产物, 在玉米、稻谷、小麦、坚果等农产品中广泛存在, 人和动物摄食含毒食品可对健康造成严重威胁。据联合国粮农组织报告, 每年全球约有近 25% 的农作物受到真菌及其代谢毒素的污染, 这其中有 2% 的农作物因为受污染严重而失去营养价值和经济价值, 造成的经济损失高达数百亿美元^[1]。近年来, 受环境和气候条件影响, 粮食真菌毒素污染现象有加剧的趋势^[2], 已经引起了全社会的广泛关注。

各国对于粮食真菌毒素残留水平均有严格的规定, 超出食品安全标准的农产品不能作为食品或食品相关的原料, 也不能用作饲料, 只有经过去毒处理才能挽回部分应用价值。为此, 近年来人们采用物理、化学及生物等多种处理手段开展了农产品真菌毒素消减处理研究, 取得了许多突破性的进展, 为粮食的数量安全和食(饲)用安全做出了积极的贡献。

各种消减含毒粮食的处理方法中, 臭氧处理是近年来人们较为关注的方法之一。臭氧的强氧化性能迅速破坏有机物的双键, 同时具有良好的气体渗透性且易自然分解、无毒性残留, 在 1997 年臭氧被美国食品药品监督管理局(FDA)认定为通常是安全的^[3]。臭氧降解玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin, AFB₁)等真

菌毒素在国内外也早有报道^[4]。本文重点综述了臭氧对粮食中真菌毒素的降解研究, 以为臭氧在真菌毒素降解中的应用提供基础。

1 常见真菌毒素在粮粒上的分布

臭氧较易分解, 其对粮粒表面毒素的破坏效果显著高于粮粒内部, 因此, 研究常见真菌毒素在粮食籽粒上的分布具有重要的意义。研究发现^[5-10]真菌毒素在粮食籽粒上分布极不均匀, 真菌毒素在粮粒上主要呈现出由外及里的递减趋势, 皮层中真菌毒素含量通常高于籽粒内部, 不同地区粮食样品中真菌毒素含量在整体上存在较大差异, 这是因为真菌毒素的形成除受产毒真菌自身遗传因素的调控外, 还受到宿主、环境因素的调控^[6]。真菌毒素在粮粒皮层含量较高, 主要是因为种皮易于与外部环境中的真菌接触, 当条件适宜时, 真菌进一步侵染并积累真菌毒素随着真菌不断生长繁殖产毒, 菌丝体深入到粮粒内部, 则籽粒内部毒素也不断积累。

1.1 玉米赤霉烯酮(ZEN)

职爱民收集^[7]全国 10 个省市 82 个批次的玉米样品发现, 玉米中胚的 ZEN 含量最多、种皮其次、胚乳最少, 霉变程度与毒素含量无明显相关性, 不完善粒的筛下物毒素含量明显高于筛上物。胚中 ZEN 含量最高, 因为胚营养丰富、吸湿性强、呼

^{*} 收稿日期: 2021-08-11

通讯地址: 成都市青羊区广富路 239 号 32 幢

吸旺盛,致使高水分玉米胚部带菌严重。完整玉米在种皮包裹下,可减少或避免霉菌的污染,不完善粒玉米因种皮被破坏,易受镰刀菌感染而产生ZEN毒素。姜森^[8]研究发现,玉米过筛后粉末状物质霉菌毒素含量往往是完整粒的几十倍,过筛去除玉米中的不完善粒及杂质能有效去除部分真菌毒素。

1.2 呕吐毒素(DON)

中储粮成都储藏院^[2]利用实验室小麦磨粉机处理呕吐毒素超过国家限量指标的小麦样品,分别收集粗麸、细麸、皮粉和心粉,发现小麦籽粒中DON含量分布呈现由外及里的递减趋势,DON主要分布在籽粒皮层部位,平均质量占比32.45%的外层组织DON总量占比60.82%。职爱民等^[9]采集来自全国10个省市的78个批次的玉米,发现DON主要分布在玉米种皮及筛下物中,主要是因为玉米种皮易于与外部环境中的霉菌接触,当条件适宜时,玉米受霉菌进一步侵染并积累真菌毒素。在不同霉变率的玉米中,DON在霉变率高的玉米中含量较高。在含有不完善粒的玉米中,呕吐毒素在其筛下物中含量较高。DON超标玉米经脱皮处理后其呕吐毒素含量很可能达到相关标准限量要求。也有研究发现DON含量高的小麦籽粒干瘪,体积也更小。Chelkowski J等^[10]将自然条件下感染DON的小麦过2.5 mm和2.2 mm筛分成四部分,发现籽粒小于2.2 mm的小麦DON含量为15 mg/kg,籽粒在2.2 mm~2.5 mm的小麦,DON含量为14 mg/kg,籽粒大于2.5 mm的小麦,DON含量很低(0~1.0 mg/kg)。

1.3 黄曲霉毒素B₁(AFB₁)

侯芮^[11]研究了自然条件下感染真菌毒素的6个小麦样品,磨粉后收集皮磨粉1B、2B、3B和心磨粉1M、2M、3M、细麸、麸皮共8种组分,研究发现不同AFB₁初始浓度的小麦制粉后其面粉或麸皮中AFB₁所占的比率也不相同,6个样品中麸皮AFB₁的含量是籽粒中含量的1.94~2.69倍;麸皮和细麸(即小麦外皮层)中AFB₁占小麦总AFB₁比例的48.51%~64.42%。随着小麦中AFB₁毒素含量的不断增加,AFB₁毒素越来越多的分布在内部的胚乳中。由此可以推断,AFB₁由外皮层逐渐进入到籽粒内部,对于污染AFB₁毒素程

度较轻的小麦,其内部胚乳中AFB₁毒素含量不高,制粉后,面粉中毒素含量降低。初始AFB₁含量为7.76 μg/kg的小麦,经试验制粉以后,其面粉中AFB₁含量降低至5.01 μg/kg,基本符合国家标准规定的安全水平。随着AFB₁污染的加剧,小麦中的AFB₁逐渐由外层转移到胚乳内部,面粉中毒素含量逐渐增加,去除难度逐渐加大。

2 臭氧对真菌毒素降解效果

臭氧降解真菌毒素的效果主要受臭氧处理浓度、处理时间和真菌毒素存在介质的影响。臭氧对玉米赤霉烯酮、呕吐毒素等真菌毒素溶液降解效果明显,对粮粒上真菌毒素的降解率要低于真菌毒素溶液,这与真菌毒素在粮粒上的分布特点以及粮食水分含量有关。臭氧降解粮粒上的真菌毒素,主要与粮粒表面的真菌毒素反应,同时由于粮食的水分含量普遍较低,使得臭氧在粮粒上的附着和渗透受限,降解真菌毒素效果变差^[12-14]。

2.1 玉米赤霉烯酮

齐丽君^[4]用5 mg/L的臭氧处理ZEN标准溶液(20 μg/mL) 5 s,ZEN的降解率超过90%,当臭氧浓度为10 mg/L和20 mg/L时,ZEN被降低到HPLC检测不到的含量。用40 mg/L~100 mg/L的臭氧处理自然污染ZEN的玉米,当处理时间为180 min时,玉米中的ZEN降解率达到86%,在处理的0~120 min,ZEN下降显著,在120 min~180 min,ZEN下降不明显,主要是由于臭氧容易与玉米表面的ZEN反应,对于内部的真菌毒素臭氧渗透较慢。用100 mg/L的臭氧处理水分14.1%和19.6%的玉米180 min,ZEN降解率为86.0%和90.7%,高水分含量的玉米中真菌毒素的降解效果更好,但这种差距在120 min到180 min逐渐不明显,这可能是因为臭氧与玉米表面的真菌毒素反应,通过玉米气孔进入到玉米内部比较困难。

诸多研究表明水分含量对ZEN降解十分重要,因为水分可以溶解臭氧,增加臭氧气体与真菌毒素的接触。Wang等^[14]认为高水分可以提高臭氧的渗透能力和氧化能力,臭氧在水中可以形成氧原子和氢氧根,有利于ZEN的氧化分解,增加水分含量,可以产生更多的自由基,从而对ZEN的降解产生

重要影响。

2.2 呕吐毒素

陈帅等^[15]研究发现用 3 mg/L 的臭氧处理浓度为 4 mg/L 的呕吐毒素标准品水溶液 10 min, 呕吐毒素 100% 降解, 用相同浓度的臭氧处理不同水分含量的玉米和小麦加标样品 4 h 和 8 h 发现, 臭氧对绝干玉米和小麦加标样品中的呕吐毒素几乎没有降解作用, 随着玉米和小麦水分含量的提高, 降解效果有明显提升。水分含量是影响玉米和小麦呕吐毒素降解率的关键因素。实仓验证发现, 利用内环流技术维持粮仓内臭氧浓度在 3 mg/L~4 mg/L, 仓间湿度 55%~57%, 处理 3 d, 呕吐毒素降解范围在 22.1%~35.1%。玉米脂肪酸值和小麦面筋含量在臭氧处理前后无明显变化, 霉菌总数明显降低。

2.3 黄曲霉毒素 B₁

谢刚^[16]用 40 ppm~50 ppm 的臭氧处理 AFB₁ 超标的谷物 1 h~2 h, 谷物中 AFB₁ 的含量显著减少。丁爱凤研究表明^[17], 经浓度 95 mg/L 的臭氧处理 25 min, 稻谷中 AFB₁ 的降解率随着其初始含量的增加, 呈现先上升后下降的趋势, 可将 AFB₁ 初始含量为 68.42 μg/kg 的稻谷降解到国家限量标准 (10 μg/kg), 降解率最高可达 88.1%。臭氧对稻谷中 AFB₁ 的降解效果受到臭氧浓度、处理时间以及稻谷处理量等因素的影响, 在一定范围内, AFB₁ 的降解率与臭氧处理浓度和处理时间成正比。

臭氧的处理浓度、时间和粮食水分含量都会影响到其对真菌毒素的降解效果^[18]。用臭氧处理真菌毒素超标的粮食, 应用中受臭氧机产量和投资成本影响, 臭氧浓度一般能维持在 3 mg/L~4 mg/L, 由于臭氧主要与粮粒表面的真菌毒素反应, 随着处理时间不断延长, 在后期真菌毒素降解率很难继续增加。已有的研究证明提高粮食水分含量或通入臭氧的相对湿度, 可以提高臭氧对真菌毒素的降解效果^[12-14], 因此在实践中, 可考虑从适当提高粮食水分含量或通入臭氧的相对湿度方面入手, 提高臭氧对真菌毒素的降解率。

3 臭氧处理真菌毒素的降解产物

臭氧处理玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、黄曲霉毒素 B₁ 后, 降解产物复杂, 往往含有几种不同的降

解产物^[3,12,19], 通过液质联用等手段推测降解产物的分子结构和化学式, 并且经细胞活性试验、小鼠亚急性毒性动物试验等对降解产物的毒性进行分析, 结果表明降解产物的毒性与真菌毒素相比, 显著降低^[3,12,19]。

3.1 玉米赤霉烯酮

臭氧通过与碳碳双键的亲电反应与有机物反应。ZEN 含有一个烯烃双键, 使 ZEN 与臭氧反应更加容易, 此外在苯环存在时臭氧易与羟基反应, ZEN 的苯环上含有两个羟基。

王铁凡^[3]用 20 mg/L 臭氧处理 10 μg/mL 的 ZEN 溶液 1 min, 产生 4 种未知的稳定降解产物, 臭氧处理 5 min 后, 这 4 种产物被完全降解而未发现其他新产物。通过超高液相色谱串联四极杆飞行时间质谱分析推测各降解产物的化学式分别为 C₁₈H₂₂O₆, C₁₈H₂₂O₇, C₁₇H₂₀O₆, C₁₈H₂₂O₈。通过 ZEN 及其臭氧降解产物的结构对比分析表明: ZEN 臭氧降解产物的生成路径主要遵循臭氧与烯烃双键加成的 Criegee 反应机制和亲电效应, 并模拟出 4 种 ZEN 臭氧降解产物的生成途径。对降解产物进行体外毒性试验发现, 臭氧处理后的 ZEN 降解产物的毒性显著降低, 但仍存在一定细胞毒性, 臭氧降解产物完全被臭氧氧化后, 其细胞毒性与空白正常组无显著性差异。

3.2 呕吐毒素

呕吐毒素的臭氧降解遵循 Criegee 机制, 即臭氧首先作用于 C₉-C₁₀ 上的双键, 进行环加成反应, 形成不稳定的臭氧化物, 随后在臭氧的强氧化作用下生成相关降解产物及过渡态产物^[20]。

陈帅等^[15]利用高效液相色谱、核磁共振及液质联用等分析手段对臭氧处理呕吐毒素标准品的降解产物进行分离和结构分析, 结果表明, 主产物为己二酸二甲酯, 从其分子结构可以看出, DON 分子中的 C₁₂、C₁₃ 环氧结构和 C₃-OH 基团等毒性基团被完全破坏, 主产物 DMA 为一种只含醛酮基团的低毒性化合物。因此, 粮食所含的 DON 进行臭氧处理降解后毒性会显著降低, 可显著改善含毒粮食的食品安全性。孙超^[19]研究发现, DON 被臭氧降解时, 高浓度 (40 mg/L) 情况下 DON 被快速完全降解, 没有新的物质出现, 当在低浓度 (20 mg/L) 条件下降解时, 降解速度变慢, 检测到两

个降解产物, 分子式为 $C_{15}O_7H_2$ 和 $C_{15}O_7H_{18}$, 降解产物不稳定, 属于中间产物, DON 完全降解后, 对细胞的毒性显著降低。

3.3 黄曲霉毒素 B_1

臭氧降解 AFB_1 的机理是臭氧通过 Criegee 机理的亲电攻击, 臭氧攻击呋喃环末端的 C_8-C_9 双键, 最后形成酮、醛、酸和二氧化碳等多种化合物, 从而去除黄曲霉毒素的致毒性, 因为 C_8-C_9 双键是黄曲霉毒素引起细胞突变和致癌性的主要原因^[16]。

张芳^[1]研究发现, 通过 HPLC-MS 对臭氧降解 AFB_1 的降解产物进行推测, 发现臭氧完全降解 AFB_1 最终产生 3 个氧化产物。Mckenzie 等^[21]研究发现在臭氧的作用下 $C=C$ 双键首先发生加成反应, 得到分子式为 $C_{17}H_{12}O_9$ 的中间产物, 臭氧的进一步作用使得苯环和另一个 $C=C$ 双键被打破, 形成 $R-COOH$ (酸类), $R-CHO$ (醛类)、 $R-CO-R$ (醚类) 和 CO_2 。通过小鼠毒性试验和 Ames 致突变试验发现: 臭氧处理过的小鼠不再对小鼠造成伤害。臭氧处理过的玉米浆也不再对小鼠健康造成伤害, 也不会有致突变的作用。DIAO 等^[22]研究发现臭氧降解 AFB_1 后检测到 10 种降解产物, 这些产物含量低, 且分子量相近, 通过对其结构-效应分析可知, AFB_1 的最终降解产物毒性显著降低。

4 臭氧对粮食品质的影响

用臭氧处理真菌毒素污染的粮食, 在降解真菌毒素的同时, 臭氧对粮食品质也会产生一定的影响, 从已有的研究可以看出, 臭氧对小麦、玉米、稻谷等原粮的品质影响较小。

研究发现臭氧降解小麦中 DON, 小麦粉相比原面粉白度增强, 黄度下降。孙超^[19]用 80 mg/L 臭氧水处理小麦 10 min, 磨粉后小麦粉亮度和白度增加, 蛋白含量、淀粉含量和脂肪酸值变化不大。齐丽君^[4]用 100 mg/L 臭氧处理玉米 180 min 后, 玉米粉白度增加、黄度下降。臭氧可以与胡萝卜素、类胡萝卜素的双键反应从而具有漂白作用。玉米含有丰富的胡萝卜素, 小麦的主要颜色来自类胡萝卜素, 因此臭氧与这些色素的反应可能是导致白度增加、黄度下降的原因。用 100

mg/L 的臭氧处理玉米样品 180 min, 随着处理时间延长, 玉米脂肪酸值呈上升趋势, 但仍在正常范围内。玉米糊化峰值粘度、最低粘度、最终粘度和回生值呈下降趋势。Melte 等^[4]用同样浓度的臭氧处理被 AFB_1 污染的小米, 小米的脂肪酸值无显著变化。

Chan 等^[23]认为, 淀粉经过氧化会导致部分糖苷键断裂, 淀粉分子量下降, 淀粉峰值粘度降低。也有研究表明用臭氧处理蜡质大米淀粉, 发现随着处理时间延长, 蜡质大米淀粉的峰值年度粘度增加。可能有两个原因: 一是臭氧处理后, 蜡质大米淀粉中酶的活性降低; 二是氧化使淀粉分子发生交联从而使淀粉分子膨胀力增加。淀粉种类不同, 处理方式不同也会造成淀粉糊化特性的差异。臭氧处理后玉米中直链淀粉含量呈下降趋势, 但变化不显著。臭氧处理会造成高相对分子质量的淀粉聚合物解离, 产生低相对分子质量的淀粉聚合物和直链淀粉。臭氧处理时, 玉米外壳对其内部的淀粉起到一定保护作用。玉米中氨基酸总量和必需氨基酸含量呈下降趋势, 但必需氨基酸与总氨基酸含量的比值无显著变化。庄坤等^[17]用臭氧处理糯米, 氨基酸总含量减少, 这可能是因为这些氨基酸的侧链基团对臭氧比较敏感, 容易被氧化。

5 结束语

真菌毒素在粮食籽粒上分布极不均匀, 在粮粒上主要呈现由外及里的递减趋势, 皮层中真菌毒素含量通常高于籽粒内部, 不同地区粮食中真菌毒素含量在整体上存在较大差异。

臭氧作为一种强氧化剂, 可有效降解原粮中的真菌毒素, 降解效果受臭氧浓度、处理时间和原粮水分含量的影响。受臭氧附着和穿透能力的影响, 臭氧主要与原粮籽粒表面的真菌毒素反应, 因为水分可以提高臭氧在籽粒表面的附着和穿透能力, 在用臭氧处理真菌毒素超标的粮食时, 建议适当提高通入臭氧的相对湿度。

臭氧降解真菌毒素的产物复杂, 从已有的研究可以看出, 真菌毒素降解后, 降解产物毒性显著降低。在臭氧有效降解真菌毒素的浓度和时间范围内, 臭氧对粮食品质的影响较小。

参 考 文 献

- 张芳. 真菌毒素臭氧降解及其他脱毒方法研究 [D]. 2014, 无锡: 江南大学
- 唐洁, 陈帅, 赵艳研, 等. 低浓度臭氧降解小麦呕吐毒素技术初探 [J]. 粮食储藏, 2020, 49 (5): 31~38
- 王铁凡. 玉米赤霉烯酮的臭氧降解产物分析及其处理前后的安全性评价 [M]. 2016, 无锡: 江南大学
- 齐丽君. 臭氧和电子束辐照降解玉米中的 ZEN 和 OTA 的效果及玉米品质研究 [M]. 2017, 无锡: 江南大学
- 李俭, 李世勇, 张传惠, 等. 不同质量玉米中 3 种真菌毒素含量的研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2014, (4): 18~20
- 王刚, 王玉龙, 张海永, 等. 真菌毒素形成的影响因素 [J]. 菌物学报, 2020, 39 (3): 477~491
- 职爱民, 贾国超, 郑文楠, 等. 玉米不同结构中玉米赤霉烯酮的污染分布规律 [J]. 饲料工业, 2017, 38 (3): 58~60
- 姜森, 郭本成, 王改琴, 等. 物理过筛对玉米中霉菌毒素的去除效果 [J]. 饲料工业, 2013, 34 (6): 45~48
- 职爱民, 张培蕾, 贾国超, 等. 玉米各部位中呕吐毒素分布规律探究 [J]. 粮食与饲料工业, 2016, 10: 58~60
- Chelkowski J, Perknowski J. Distribution of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels [J]. Mycotoxin Research 1992, 8: 27~30
- 侯芮. 清理与制粉工艺中去除污染小麦中真菌毒素的效果及面粉品质的而变化 [M]. 2016, 广州: 华南理工大学
- TIWARI B K., Brennan C. S., Curran T, etc. Application of zone in grain processing [J]. Journal of Cereal Science 2010, 51: 248~255
- Christopher Young J., Zhu Honghui, Zhou Ting. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone [J]. Food and Chemical Toxicology. 2006, 44: 417~424
- Wang Li, Luo Yingpeng, Wang Ren, etc. Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains [J]. Food Ctrol, 2016, 66 (1): 137~144
- 陈帅, 孔翻霞, 宋鑫, 等. 新收获玉米呕吐毒素与生霉粒的关系及削减研究 [J]. 粮食储藏, 2019, 48 (4): 29~32
- 谢刚. 粮食污染主要真菌毒素的研究 [M]. 2005, 成都: 四川大学
- 丁爱凤, 包月红, 周建新, 等. 臭氧降解稻谷中不同黄曲霉毒素 B1 初始含量效果研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 343 (23): 35~37
- Chen Ran, Ma Fei, Li Pei—wu, etc. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts [J]. Food Chemistry, 2014, 146: 284~288
- 孙超. 二氧化氯和臭氧对污染粮食中呕吐毒素 DON 产生的影响及削减控制研究 [D]. 2017, 无锡: 江南大学
- 任东亮. 呕吐毒素臭氧降解机制及其安全性评价 [M]. 2020, 泰安, 山东农业大学
- Mckebziei K. S., Sappl A. B., Mayural K. Oxidative Degradation and Detoxification of Mycotoxins using a novel source of zone [J]. Pergamon Food and Chemical Toxicology, 1997 (35): 807~820
- DIAO E J, HOU H X, DONG H Z. ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B1: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 33 (1): 21~26
- Chan H T, Bhat R, Karim A A. Physicochemical and functional properties of ozone—oxidized starch [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (13): 5965~5970