

短波紫外线处理对3种链格孢毒素的降解作用研究

李祖梁^{1,2}, 姜楠², 王刘庆², 王蒙², 朱璇^{1*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100097)

摘要: **目的** 研究短波紫外线(UV-C)辐照对交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)和交链孢酚(alternariol, AOH)、腾毒素(tentoxin, TEN)3种链格孢毒素的降解效果。**方法** 测定不同辐照时间、不同辐照距离、不同pH值条件下、不同照射强度下UV-C辐照对3种毒素的影响,采用高效液相色谱技术测定毒素含量。**结果** 经过UV-C辐照过后,3种毒素的浓度均随着辐照时间的延长而降低,随着辐照强度的增强而降低,但是辐照距离与毒素溶液的pH值大小与毒素的降解情况并无显著关联。在pH为5,毒素浓度为1.0 μg/mL,UV-C灯功率为36 W、辐照距离为25 cm条件下照射120 min后,AME、AOH、TEN 3种毒素的降解率分别为16.10%、63.92%、89.99%。**结论** 在偏酸性环境及长时间的UV-C辐照暴露下,UV-C对链格孢毒素有较为明显的降解作用。

关键词: 链格孢毒素; 毒素降解; 短波紫外线辐照

Study on degradation of 3 kinds of alternaria toxins by short-wave ultraviolet treatment

LI Zu-Liang^{1,2}, JIANG Nan², WANG Liu-Qing², WANG Meng², ZHU Xuan^{1*}

(1. Xinjiang Agricultural University College of Food Science and Pharmacy, Urumqi 830052, China;
2. Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing (BRCAT), Risk Assessment Laboratory for Agroproducts (Beijing), Beijing 100097, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the degradation of 3 kinds of alternaria toxins including alternariol monomethyl ether (AME), alternariol (AOH) and tentoxin (TEN) by short-wave ultraviolet (UV-C) treatment. **Methods** The effects of UV-C irradiation on 3 kinds of alternaria toxins under different irradiation time, distances, pH values and irradiation intensities were studied, and the toxin content was determined by high performance liquid chromatography. **Results** After UV-C irradiation, the concentrations of the 3 kinds of toxins decreased with the extension of irradiation time, and the increase of the irradiation intensity, but the irradiation distance and the pH value of the toxin solution had no significant correlation with the degradation of the toxin. When pH was 5, the concentration of toxin was 1.0 μg/mL, the UV-C lamp power was 36 W, and the irradiation distance was 25 cm, the degradation rates of AME, AOH and TEN were 16.10%, 63.92%, 89.99%, respectively. **Conclusion** Under the acidic environment and long-term exposure to UV-C irradiation, UV-C has a significant degradation effect on

*通讯作者: 朱璇, 博士, 教授, 主要研究方向为果蔬采后贮藏。E-mail: 13999877961@126.com

*Corresponding author: ZHU Xuan, Ph.D, Professor, Xinjiang Agricultural University, Nongda East Road, Shaibak District, Urumqi 830052, China. E-mail: 13999877961@126.com

alternaria toxin.

KEY WORDS: alternaria toxin; toxin degradation; short-wave ultraviolet irradiation

1 引言

链格孢(*Alternaria*)属于半知菌丝孢纲,丝孢目,暗色菌科,链格孢属,其中 95%以上的种类兼性寄生于植物上,能够引起多种植物病害,如小麦叶枯病、马铃薯(茄)早疫病、烟草赤星病等,是一种食品及饲料原料中污染极为广泛的病原真菌^[1]。链格孢毒素作为链格孢菌生长时所产生的次级代谢产物,能够产生 70 余种具有明显毒性的真菌毒素,能够引起动植物的多种病变^[1]。链格孢毒素所产生的危害已有诸多文献报道,多数研究表明,人或动物在摄入链格孢毒素污染的食物或饲料后,能够造成一系列的急性慢性中毒,包括细胞毒性、强致畸性、强致癌性和胚胎毒性等。Marko 等^[2]在研究中发现,交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)和交链孢酚(alternariol, AOH)可以显著抑制拓扑异构酶II α 的活性,从而能够导致 DNA 键断裂,具有潜在的基因毒性;同时 AME 还能够激活细胞凋亡的线粒体通路从而诱导人结肠癌细胞死亡^[3]; Lehman 等^[4]通过 AOH 的毒性影响哺乳动物细胞,研究结果表明 AOH 能够通过影响细胞循环从而影响细胞的增殖;腾毒素(tentoxin, TEN)具有植物毒性,被认为是 ATP 合成终端的能量传递抑制剂,能够抑制植物的光合磷酸化^[5]。

目前对于真菌毒素降解常用的方法有生物降解法、化学降解法和物理降解法。而物理降解法中的辐照处理通过电子束、X 射线、 γ 射线等电离辐射对食品作用,能够达到防腐保鲜、提高质量、保持营养等效果,既可以杀灭真菌等有害生物,也可以有效破坏毒素的化学结构从而实现降解毒素的目的。辐照处理与其他化学防治和生物防治手段相比具有无残留、冷加工、冷处理、能耗低、使用方便等特点^[6,7],被广泛应用于食品保鲜^[8,9]及贮存^[10]、作物育种^[11,12]与毒素降解^[13-15]等方面。目前针对链格孢毒素去除和降解的理论方法研究较少,短波紫外线(UV-C)辐照使链格孢毒素降解的原因尚不明晰。Altug 等^[16]研究表明采用低能源的紫外光辐照处理无花果能够有效地降解果实中存在的黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁),首次提出紫外辐照条件下空气电离产生的 O₃ 对 AFB₁ 有降解。罗小虎等^[17]使用微波、紫外线与臭氧组合处理玉米上的霉菌及其毒素,结果表明用紫外照射处理 30 min 后,被毒素污染的玉米中的 AFB₁ 降解了 23.6%,但是用紫外照射和臭氧熏蒸联合处理后 AFB₁ 降解率能够达到 63.6%。由于 UV-C 辐照对于毒素降解的高效性和安全性,利用 UV-C 辐照去除黄曲霉毒素的装置已经广泛用于花生油等生产工艺中。

目前,UV-C 辐照在降解黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、

脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素、伏马毒素等真菌毒素中已经取得了显著的成效^[13,18-21],但是对于链格孢毒素的降解研究较少,尚缺乏针对链格孢毒素降解和脱毒的技术,因针对链格孢毒素降解技术的研究,对于有效控制毒素的污染及保障人和动物的健康安全具有重要意义。本研究以链格孢毒素标准品为研究对象,通过 UV-C 辐照处理,探讨了不同辐照时间、照射高度、初始溶液 pH、照射强度等因素对 AME、AOH、TEN 3 种链格孢毒素的降解效果,以期探索其辐照降解的机制,控制此类链格孢毒素提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

链格孢毒素(AOH、AME、TEN)标准品(纯度>99%,美国 Sigma 公司);HCl、NaOH、乙腈(质谱纯,北京索莱宝生物科技有限公司);超纯水为实验室自制。

2.2 仪器与设备

UV-C 灯(36 W, 欧司朗照明有限公司);Agilent 1260Infinity 高效液相色谱仪液相色谱系统(安捷伦科技有限公司);Agilent 5 TC-C₁₈ 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ g)(美国 Agilent 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 毒素标准溶液的配制

标准储备液:用乙腈准确定容 1 mg 标准品于 10 mL 容量瓶,配成 100 μ g/mL 质量浓度的标准储备液,密封冷冻储存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

标准工作液:将 3 种毒素标准储备液分别用乙腈稀释、定容,制成 1 μ g/mL 质量浓度的标准工作液,密封冷冻储存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

不同 pH 值标准溶液:先将乙腈用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 3、5、7、9,各取 99 mL,在其中加入 1 mL 100.0 μ g/mL 的 AOH、AME、TEN 毒素标准工作液,制成 pH 值为 3、5、7、9 的 1.0 μ g/mL AOH、AME、TEN 毒素工作液,临用前制备。

2.3.2 实验设备

UV-C 照射装置:UV-C 杀菌腔上部吊挂 6 支 UV-C 灯管,照射腔内部覆盖金属挡板,以反射射线和阻止能量泄露。照射前先将灯预热 30 min 以确保辐照的稳定性。照射腔内有可活动挡板,可以根据不同的实验需求调整不同的照射高度。辐照腔在控制温度的情况下会进行腔内抽风,会导致标准工作液挥发,需要在辐照结束后复溶。

2.3.3 不同辐照时间下的毒素降解

将3种浓度为1 μg/mL的毒素标准品(pH=5.0)各取5 mL于25 mL小烧杯中(烧杯直径为5 cm),每种浓度的毒素设置4组平行。放入UV-C灯管的下方(照射方向与液面垂直),灯管与液面垂直距离25 cm,温度为25 °C,时间设定为15、30、45、60、90和120 min,UV-C辐照处理后定容至5 mL,震荡均匀,取1 mL利用高效液相色谱仪测定毒素在经过照射后的浓度,以未处理的毒素样品作为对照。

2.3.4 不同辐照距离下的毒素降解

将3种浓度为1 μg/mL的毒素标准品(pH=5.0)各取5 mL于25 mL小烧杯中,放入UV-C灯管的下方,每种浓度的毒素设置4组平行。灯管与液面垂直距离设定为15、25、35、45 cm,设定温度为25 °C,时间设定为120 min,UV-C辐照处理完成后定容至5 mL,震荡均匀,利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪测定毒素在经过照射后的浓度,以未处理的毒素样品作为对照。

2.3.5 不同pH值条件下的毒素降解

将pH值分别为3、5、7、9的3种浓度为1 μg/mL的毒素各取5 mL于25 mL小烧杯中,放入UV-C灯管的下方,每种pH值的毒素设置4组平行。灯管与液面垂直距离设定为25 cm,设定温度为25 °C,时间设定为120 min,UV-C辐照处理后定容至5 mL,震荡均匀,利用高效液相色谱仪测定毒素在经过照射后的浓度,以未处理的毒素样品作为对照。

2.3.6 不同照射强度下的毒素降解

将pH值为5的3种浓度为1 μg/mL的毒素各取5 mL于25 mL小烧杯中,放入UV-C灯管的下方,每种照射强度下的毒素设置4组平行。将灯管的照射强度分别调整为0.25、0.5和0.75 kJ/m²,灯管与液面垂直距离设定为25 cm,设定温度为25 °C,时间设定为120 min,UV-C辐照处理后定容至5 mL,震荡均匀,利用高效液相色谱仪测定毒素在经过照射后的浓度,以未处理的毒素样品作为对照。

2.3.7 高效液相色谱测定3种毒素含量

取1 mL不同条件处理后的毒素待测液至液相色谱进样瓶中。剩余部分置于-20 °C内保存,用高效液相色谱仪检测,以待测液内被测组份的峰面积为横轴,以待测液内被测组份的浓度为纵轴,建立被测组份的曲线,对待测液中的毒素含量进行测定。毒素降解率按以下公式进行计算:

$$\text{毒素降解率}/\% = \left(1 - \frac{\text{辐照处理后毒素含量}/(\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{辐照处理前毒素含量}/(\mu\text{g}/\text{mL})}\right) \times 100\%$$

2.3.8 HPLC 条件

流动相 A: (水,含有1 mmol/L的草酸水溶液),流动相 B: (乙腈,含有1 mmol/L的草酸的乙腈);运行时间:21 min;梯度洗脱程序:0~15 min,80%A,20%B;15~16.5 min,30%A,70%B;16.5~21 min,80%A,20%B;流速:1.5 mL/min;柱温:35 °C,进样量:10 μL。

2.4 数据处理方法

利用SPSS(V16.0)统计软件进行数据分析,测定结果表示为平均数($n \geq 3$),采用One-way ANOVA对各因素进行显著性分析,以 $P < 0.05$ 为显著性水平。

3 结果与分析

3.1 不同辐照时间下的毒素降解效果

如图1所示,经长时间的紫外辐照后,3种链格孢毒素的降解率均随着辐照时间的延长而有所上升,这与Murata等^[22]的研究结果相吻合。但是,不同种类的毒素降解的程度不相同。其中,TEN毒素的降解率最高,紫外辐照120 min后TEN的降解率达到87.46%。但是AME和AOH 2种毒素的降解效果却不明显,在120 min后2种毒素的降解率分别为11.14%和11.48%。表明在该辐照条件下,TEN毒素对辐照比较敏感,降解率随辐照时间的延长而增加;而AME和AOH毒素对辐照并不敏感。

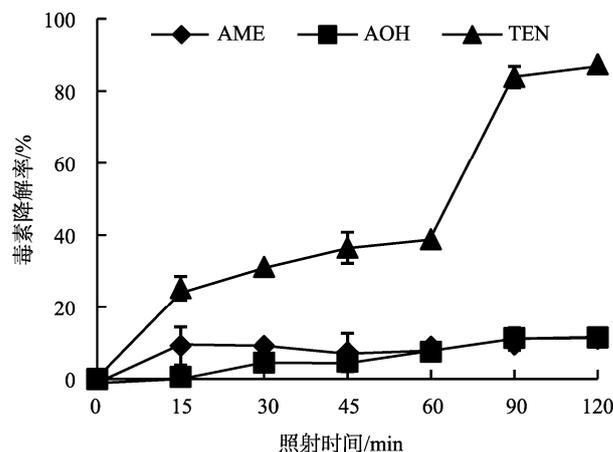


图1 辐照时间对毒素的降解效果($n=4$)

Fig.1 Effect of ultraviolet irradiation time on degradation of toxin ($n=4$)

3.2 不同辐照距离下的毒素降解效果

如图2所示,照射距离对3种链格孢毒素并没有明显的影响,推测可能由于辐照将氧气电离产生臭氧,而臭氧对链格孢毒素有一定的降解作用。对于受照射距离影响的毒素,只有AME降解的效果较好,降解率从15 cm的8.96%提高到了45 cm的22.78%,而AOH与TEN 2种毒素对于照射距离并不敏感,降解率变化并不明显。

3.3 不同pH条件紫外辐照对毒素的降解效果

如图3所示,不同pH值对3种链格孢毒素的降解效果并不显著,但是相比较pH为3及pH为9的降解情况,pH为5和pH为7的溶液里的毒素降解情况较好,毒素AME及TEN在pH为5的条件下降解率最高,AME的降解率为31.91%,TEN降解率为92.78%;毒素AOH在pH为7的条

件下降解率最高,降解率为73.51%。不同pH下的毒素降解率之间相差较小,推测pH值对于UV-C辐照降解毒素的影响较小,但是在偏弱酸性的条件下毒素的降解情况略好于其他条件。

3.4 不同照射强度下的毒素降解效果

如图4所示,在不同的照射强度下,3种毒素的降解率随照射强度增加在不断提高,其中AME对于照射强度并不敏感,照射剂量为0.25 kJ/m²的情况下降解率不明显,在照射剂量提高到0.75 kJ/m²时其降解率也只提高到16.96%。AOH和TEN 2种毒素在照射强度为0.25 kJ/m²

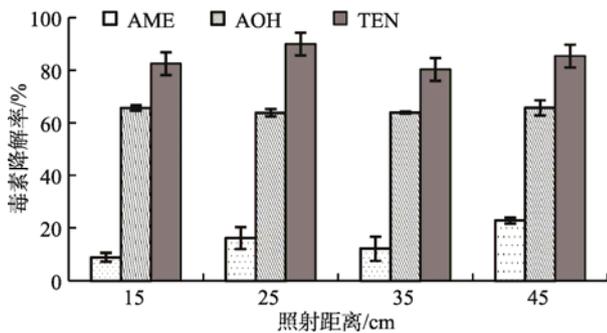


图2 辐照距离对毒素的降解效果(n=4)

Fig.2 Effect of irradiation distance on degradation of toxins (n=4)

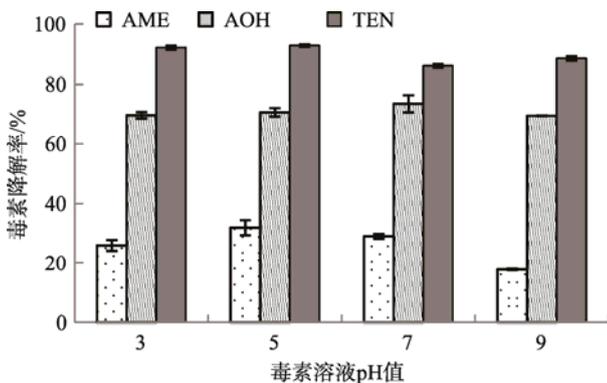


图3 pH值对紫外降解毒素的影响(n=4)

Fig.3 Degradation of toxin under different pH values (n=4)

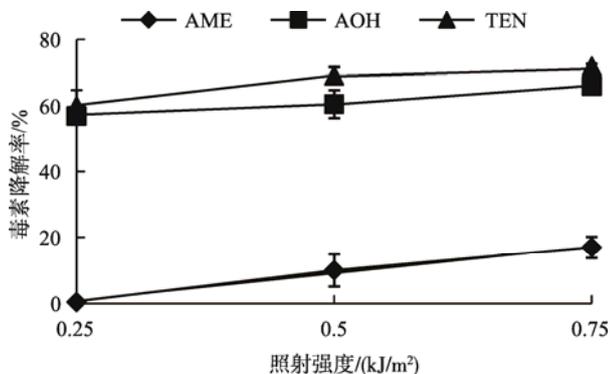


图4 不同照射强度对毒素的降解效果(n=4)

Fig.4 Degradation of toxins under different irradiation intensity (n=4)

时的降解率分别达到了57.01%和60.10%,而将照射强度提高到0.75 kJ/m²时,2种毒素的降解率也均有不同程度的提高,降解率分别提高至66.01%和70.95%。在pH为5,毒素浓度为1.0 μg/mL,UV-C灯功率为36 W、辐照距离为25 cm条件下照射120 min后,AME、AOH、TEN 3种毒素的降解率分别为16.10%、63.92%、89.99%。

4 结论

本研究结果表明,辐照距离和pH值这2种因素与3种链格孢毒素的降解率无明显的相关性,但辐照强度和辐照时间这2种因素与毒素的降解率呈正相关,降解率随着辐照剂量的升高、照射时间的延长而升高,因此,在食品工业中可考虑将紫外光辐照技术作为去除AOH、AME、TEN的一种加工方法。

虽然链格孢标准品经UV-C辐照后有一定的降解效果,但在食品基质中的降解规律和降解效果如何还有待考量,而且紫外处理后毒素的降解产物及其安全性等问题有待进一步研究,这将为UV-C辐照技术的应用奠定良好的理论基础。

参考文献

- [1] 吴春生, 马良, 江涛, 等. 链格孢毒素细交链格孢菌酮酸的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 295-301.
Wu CS, Ma L, Jiang T, et al. A review on tenuazonic acid, a toxic produced by *Alternaria* [J]. Food Sci, 2014, 35(19): 295-301.
- [2] Marko D. Mechanisms of the genotoxic effect of alternaria toxins [R]. Stuttgart-Fellbach: Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop, 2007.
- [3] Davis VM, Stack ME. Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in salmonella typhimurium [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(10): 3901-3902.
- [4] Lehmann L, Wagner J, Metzler M. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(3): 400-408.
- [5] Kono Y, Gardner JM, Takeuchi S. Nonselective phytotoxins simultaneously produced with host-selective ACTG-toxins by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins [J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(9): 2401-2403.
- [6] 赵玉生, 赵俊芳, 周昇昇. 初探非热力杀菌技术在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技, 2006, (9): 32-34.
Zhao YS, Zhao JF, Zhou SS. Exploring the application of non-thermal sterilization technology in food industry [J]. Sci Technol Food Ind, 2006, (9): 32-34.
- [7] 闫璐, 哈益明, 高贵田, 等. γ射线对溶液中交链格孢菌酮酸降解效果的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2129-2134.
Yan L, Ha YM, Gao GT, et al. Effects of γ-irradiation on degradation of tenuazonic acid in aqueous solution [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 2129-2134.
- [8] 周冉冉, 高虹, 范秀芝, 等. 低剂量⁶⁰Co γ射线辐照处理影响贮藏期鲜香菇保鲜效果[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 190-197.

- Zhou RR, Gao H, Fan XZ. *et al.* Preservative effects of low-dose(^{60}Co) γ -ray irradiation treatment on the freshness of fresh lentinus edodes in storage [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2018, 34(9): 190–197.
- [9] 顾可飞, 刘海燕, 杨海峰, 等. 电子束辐照对羊肚菌营养成分影响分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(12): 55–62.
- Gu KF, Liu HY, Yang HF, *et al.* Effect analysis of electron beam irradiation on morels nutrient composition [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(12): 55–62.
- [10] 何国鑫, 邓青芳, 周欣. 链格孢毒素的分析方法及其毒理机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- He GX, Deng QF, Zhou X. Research progress of analytical methods and toxicological mechanisms for alternariamycotoxins [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- [11] 崔敬爱, 徐岩, 邵智韬, 等. 高产 γ -淀粉酶黑曲霉菌株的电子束诱变育种[J]. *食品科技*, 2018, 43(9): 60–64.
- Cui JA, Xu Y, Shao ZT, *et al.* Mutation breeding of aspergillus niger with high production of gamma amylase by electron beam [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(9): 60–64.
- [12] 魏云华, 陈阳, 潘宏. 山茶花 ^{60}Co - γ 射线辐照诱变研究[J]. *现代农业科技*, 2018, (18): 134, 137.
- Wei YH, Chen Y, Pan H. Study on mutagenesis of camellia ^{60}Co - γ ray irradiation [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2018, (18): 134, 137.
- [13] 王杏. 紫外和电子束辐照技术消减T-2和AFB₁毒素及其在两种鱼干中的应用[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.
- Wang X. The degradation of ultraviolet and electron beam irradiation on T-2 and AFB₁ toxin and its application in two dried fishes [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2017.
- [14] 梁剑锋, 李亚. 小油坊黄曲霉毒素B₁紫外光降解技术模拟及脱毒效果研究[J]. *粮食与食品工业*, 2017, 24(4): 15–18, 22.
- Liang JF, Li Y. Simulation of UV degradation of aflatoxin B₁ in small oil workshop and study on the effect of detoxification [J]. *Cereal Food Ind*, 2017, 24(4): 15–18, 22.
- [15] 张小勇, 倪芳妍, 方晓璞, 等. UVA紫外灯辐照连续降解食用植物油中黄曲霉毒素B₁的设备[J]. *中国油脂*, 2015, 40(12): 99–101.
- Zhang XY, Ni FY, Fang XP, *et al.* Equipment for continuously degrading aflatoxin B₁ in edible vegetable oil with UVA ultraviolet lamp radiation [J]. *China Oil Fat*, 2015, 40(12): 99–101.
- [16] Altug TE, Yousef AH, Marth E. Degradation of aflatoxin B₁ in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide [J]. *Food Prot*, 1990, (53): 581–582.
- [17] 罗小虎, 李克, 王初, 等. 臭氧、电子束辐照降解玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A[J]. *食品与机械*, 2017, 33(12): 98–102, 173.
- Luo XH, Li K, Wang R, *et al.* Study of ozone and electron beam irradiation on degradation of zearalenone and ochratoxin A [J]. *Food Mach*, 2017, 33(12): 98–102, 173.
- [18] 王洪健, 马静瑜, 蔡双福, 等. 紫外处理对黄曲霉毒素B₁及花生油品质的影响[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(15): 187–190, 224.
- Wang HJ, Ma JY, Cai SF, *et al.* Effects of ultraviolet treatment on aflatoxin B₁ and the quality of peanut oil [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(15): 187–190, 224.
- [19] 朱文倩. 玉米油中玉米赤霉烯酮的测定和脱除[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- Zhu WQ. Research on determination and removal effects of zearalenone in corn oil [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [20] 邹忠义, 黄斐, 李洪军. 紫外光辐照对脱氧雪腐镰刀菌烯醇和T-2毒素的去除作用[J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 7–11.
- Zou ZY, Huang F, Li HJ. Removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by ultraviolet irradiation [J]. *Food Sci Technol*, 2015, 36(19): 7–11.
- [21] Nagy HA, Ferial M. El-Far AAM, *et al.* Control of fusarium moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation [J]. *Food Control*, 2007, (1): 1337–1342.
- [22] Murata H, Mitsumatsu M, Shimada N. Reduction of feed-contaminating mycotoxins by ultraviolet irradiation: An *in vitro* study [J]. *Food Add Contamin*, 2008, 25(9): 4.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



李祖梁, 硕士, 主要研究方向为农产品贮藏加工。

E-mail: phatatta@outlook.com



朱璇, 博士, 教授, 主要研究方向为果蔬采后贮藏。

E-mail: 13999877961@126.com