

大豆豆粒中一个能抑制黄曲霉毒素积累的生物化学机制

宋 大 康

(中国科学院微生物研究所, 北京)

具有萌芽能力的正常大豆豆粒和经过热处理灭活的豆粒, 在接种黄曲霉毒素产生菌后, 尽管菌体生长和产孢情况在二种豆粒上未见有何差异, 但黄曲霉毒素 B_1 在前者中的积累速度显著低于后者。毒素产生菌的液体培养试验表明, 即使是浓度低于从正常豆粒在接种培养后所检出的大豆保卫素, 它对菌体的生长虽然影响不大, 但能使毒素的积累速度降低 70% 以上。据此推测, 大豆受侵后能够激发产生大豆保卫素这一机制, 至少是在一般条件下大豆出现黄曲霉毒素污染的情况较为少见的部分原因。

关键词 黄曲霉毒素; 植物保卫素

黄曲霉毒素是产毒黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 菌株所产生的一类真菌毒素。其中尤以 B_1 是其最引人关注的一个组分。它具有致癌、致畸、抑制免疫反应、降低血清蛋白、干扰吞噬作用、影响氨基酸和维生素的利用等多方面的恶性效应。黄曲霉毒素 B_1 能因产毒菌株的生长而在多数农作物及其加工产品中产生和积累。由于它具有广泛的有害生物活性, 六十年代初以来对重要的粮食和油料, 尤其是玉米、花生、棉子等籽粒中黄曲霉毒素 B_1 污染的发生条件和规律都进行过相当详尽的研究^[1,2]。但是有关田间和仓储大豆上产毒黄曲霉菌和黄曲霉毒素污染的研究分析报告则似乎相当矛盾。

1965 年和 1966 年美国在大豆生长季节和正常收获后六周内进行的普遍采样分析结果报导, 3114 个大豆样品中没有一个样品上能分离到 *A. flavus* 的菌株^[3]。Shotwell 等^[4]对不同等级的共 866 个商品大豆样品的分析结果报导, 尽管 50% 的被检样品都证明有 *A. flavus* 的存在, 但出

现黄曲霉毒素污染的样品最多仅占 0.8%。其中经过薄板层析和小鸭喂养试验肯定证明有黄曲霉毒素污染的两个样品, 其毒素的含量也仅有 7—10ppb, 其他还有五个则是可疑的样品。另一方面, Bean^[5] 等报导, 1971 年美国马里兰州由于生长季节中气候异常潮湿而使采前的大豆出现了严重的霉菌生长。从所采集的 28 个样品中共检出了 14 个污染 4—310ppb 的黄曲霉毒素。但甚至是同一植株的不同豆荚, 其毒素的含量也可以有很大的差别。一个尤其值得注意的现象是, 明显长有产毒黄曲霉菌株的豆粒中并不一定能够检测到毒素的存在, 说明大豆豆粒上产毒菌株的生长并非必然会导致黄曲霉毒素的积累。

有关大豆人工接种产黄曲霉毒素菌株的研究结果, 报导也颇为矛盾。有的认为大豆作为基物尽管能供应产毒曲霉菌株生长, 但并不利于其黄曲霉毒素的合成^[3,6]。但是 Hesseltine 等^[7]用 3 株产毒曲霉接种经高压灭菌的大豆碎粒, 6 天 28℃ 培养后检

本文于 1990 年 3 月 30 日收到。

出的黄曲霉毒素含量为 8—22ppm。Davis 和 Diener^[8] 用一株 *A. parasiticus* 接种并在 30℃ 和相对湿度 99% 的条件下培养 21 天后, 黄曲霉毒素含量最高可达 376.3 ppm。Nagarajan 等^[9] 采用 4 株不同的 *A. flavus* 和 *A. parasiticus* 菌株接种经高压灭菌的 5 个不同品种的大豆豆粒, 7 天 28℃ 培养后黄曲霉毒素 B₁ 的检出量为 0.125 到 31.25ppm。他们的结论认为毒素的不同积累水平决定于大豆品种和产毒菌株的不同组合。Gupta^[10] 报导用一株 *A. parasiticus* 接种经和不经高压灭菌的磨细大豆粉, 26℃ 培养 8 天后, 黄曲霉毒素的检出量前者为 68.5ppm, 而后者则为 3.4ppm。他们认为后者中检出量低的原因是由于后一基物中微量元素锌主要为结合状态而不能被利用, 因而不利于黄曲霉毒素的合成。但是 Sherertz 等^[11] 采用 York 品种的大豆碎粒进行的研究结果则更为复杂。他们发现在煮熟的豆粒上 *A. flavus* NRRL 3251 和 *A. parasiticus* NRRL 2999 分别积累的黄曲霉毒素量为 162 和 545ppm, 均显著高于在生豆粒上积累的 2.6 和 3.1ppm。但是 *A. flavus* ATCC 15548 则正好相反, 它在生豆粒上所积累的量竟达 11688ppm, 而在熟豆粒上则为 403ppm。

大豆上产毒曲霉菌株的生长和黄曲霉毒素检出率之间的不平行性, 以及不同产毒菌株在不同大豆品种上毒素积累量的巨大差别, 说明大豆中可能存在着某种不同于养料可利用性的其它制约毒素积累的生理-生化机制。

本文报导从人工接种具有萌芽能力和经灭活处理的二种豆粒后, 黄曲霉毒素 B₁ 积累的动态分析, 追索到大豆保卫素作为抑制该毒素积累的一个天然机制的研究结果。

材料和方法

(一) 菌株

A. flavus NRRL 5337。于 PDA 试管斜面 26℃ 培养 6 天后置 4℃ 冰箱保存, 供 6 周内使用。用含 0.01% 的 Triton-X 灭菌无离子水配制孢子悬液。接种大豆和玉米的悬液浓度为 1×10^3 孢子/ml, 接种液体培养基的浓度为 1×10^6 孢子/ml。

(二) 大豆的接种

Clark 63 品种大豆豆粒用 1.75% 次氯酸钠溶液表面灭菌 5 分钟, 灭菌无离子水洗涤三次后置真空干燥器内干至含水量约 10% (W/W)。接种前取半数豆粒在 60℃ 放置 48 小时使其灭活, 精确测定经和不经处理的这二部分豆粒的含水量, 并据此计算出接种黄曲霉菌孢子时应加入的水量, 以使接种后的豆粒均达到正常萌动所需的 21% (W/W) 含水量。接种量约为每一豆粒 10 个孢子, 接种后在黑暗中 26℃ 或 30℃ 保湿培养。

(三) 玉米的接种和大豆保卫素处理

经表面灭菌的玉米粒用溶有一定浓度大豆保卫素的 14.3% 乙醇水溶液进行拌种。溶液的用量和溶液中大豆保卫素的浓度控制在使处理后玉米粒的含水量为 21% (W/W), 含保卫素量为 62.5 μg/g。对照用不含保卫素的 14.3% 乙醇水溶液拌种。拌种 4 小时后采用与大豆相同的办法进行接种, 在 26℃ 下培养。

(四) 合成液体培养基及培养条件

液体培养基: 每 1000ml 无离子水中含葡萄糖 50g, (NH₄)₂SO₄ 6g, KH₂PO₄ 8g, K₂HPO₄ 3.4g, MgCl₂ · 6H₂O 0.5g, 甘氨酸 2g, 谷氨酸 2g, FeSO₄ · 7H₂O 10mg, ZnSO₄ · 7H₂O 5mg, MnSO₄ · H₂O 1mg, pH5.5。125ml 三角瓶装量 20ml, 121℃ 高压灭菌 20 分钟。

接种前每瓶加入 10 或 100 μl 含或不合 12.5mg/ml 大豆保卫素的 95% 乙醇, 然后接种 0.5ml 黄曲霉孢子悬液, 黑暗中 26 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养。从培养 48 小时开始, 每 24 小时取样至少 3 瓶供检测。

(五) 大豆保卫素的制备

将表面灭菌的豆粒萌芽后切成 2—3mm 的薄片, 每克鲜重薄片接种非大豆病原菌 *Pseudomonas tabaci* 1×10^7 个细菌细胞, 21 $^{\circ}\text{C}$ 下遮光保湿培养。

五天后参考 Yoshikawa 等^[12]的方法提取大豆保卫素。但采用 60:40:5(v/v) 的己烷:乙酸乙酯:甲醇为展开剂, 用 2mm 的 60F₂₅ 硅胶板 (E. Merck) 进行制备层析。采用 Waters μ bondapak C₁₈ 反相柱以 70% 甲醇溶液进行制备高压液相色谱。将层析薄板上溶出的粗提取物予以精制。将仅含大豆保卫素的部分收集合并, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转真空蒸发至干, 溶于少量甲醇后转入小玻璃管, 在真空干燥器内抽干, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱遮光保存。

采用此法制备的大豆保卫素包括它的三个同分异构体组份, 每 300g 大豆干重可获得约 100mg 上述产品。其紫外吸收光谱为 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ): 207(4.68), 229(4.61), 286(4.09) 291_{sh}(4.06), 306_{sh}(3.59), 318_{sh}(3.05), 在 NaOH 乙醇溶液中 λ_{max} 286 转移为 294。上述性状说明产品确系大豆保卫素, 并不含其它杂质。但根据本项研究中的使用目的, 未将其三个组份作进一步的分离。

(六) 黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测

豆粒和玉米取样在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下干热 48 小时磨成细粉, 取 4g 细粉在捣碎机中以 10ml 丙酮搅拌提取 5 分钟。过滤后滤液吹氮气挥发至干, 溶于 3ml 33%(v/v) 的甲醇溶液, 注射通过在使用前依次以 2.5ml 丙醇、2.5ml 甲醇和 5ml 无离子水处理的

waters C₁₈ 反相 Sep-pak 短柱。短柱经 2.5ml 无离子水洗涤, 以 2.5ml 40%(v/v) 丙醇水溶液将所吸附的黄曲霉毒素洗下。洗脱液加 1ml 甲醇, 通过 0.65 μm 的 DA 型 Millipore 膜过滤。取样以 35% 乙腈或 60% 甲醇展开, 365nm 紫外检测, 在 C₁₈ 反相柱上进行高压液相色谱定量, 黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线在 12.5ng 到 50ng 范围内, 峰高和毒素量之间呈现为完美的直线关系。

干菌丝体中毒素含量的检测除取样量减少以外, 其余均与上述相同。

培养滤液先用氢氧化钠溶液调整到 pH6.5 以防止毒素形成 O-羟基衍生物, 然后以二倍体积的氯仿反复提取二次, 氯仿层真空旋转蒸发至干, 溶于 2ml 甲醇中, 用 0.5 μm FH 型 Millipore 膜过滤后取样进行高压液相色谱定量分析。

(七) 大豆保卫素的定量检测

取 10 克鲜重的豆粒或玉米样品, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 遮光条件下以 20ml 40% 的乙醇浸提 48 小时, 然后再在组织捣碎机中捣碎提取 5 分钟。滤液 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空旋转蒸发至干, 溶于 6ml 32% 乙醇, 按与黄曲霉毒素同样的方法以 C₁₈ Sep-pak 去杂质。取样以 60% 甲醇展开, 280nm 紫外检测, 在 C₁₈ 柱上进行高压液相色谱定量。标准曲线在 100ng 到 400ng 范围内其峰高和保卫素量之间为一完美的直线关系。

结 果

(一) 在接菌培养后大豆中黄曲霉毒素 B₁ 的积累动态和大豆保卫素的出现情况

接菌培养后经和不经灭活处理的豆粒上, 黄曲霉菌的生长和产孢情况均未表现任何差别。在 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 96 小时后菌丝即布满豆粒表面, 120 小时后全部被孢子覆盖。30 $^{\circ}\text{C}$ 培养下生长和产孢均比 26 $^{\circ}\text{C}$ 提

前约 30 小时左右。但是经和不经灭活的二种豆粒中黄曲霉毒素积累量的动态分析表明,灭活豆粒中的积累速度要显著高于正常豆粒,其回归方程所得出的斜率和正常豆粒可相差 2.4 到 3 倍(表 1)。

大豆保卫素只能在上述正常豆粒中被检出,26℃ 培养下第三天和第五天时其含量为 $11.86 \mu\text{g/g}$ 和 $14.32 \mu\text{g/g}$,而在上述灭活豆粒中则均未检测到有保卫素存在。

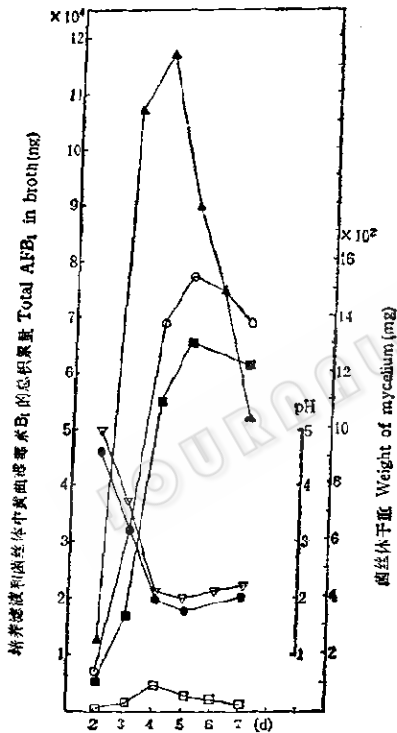


图 1 *A. flavus* NRRL 5337 在加与不加 62.5ppm 大豆保卫素的液体培养基中的生长和毒素积累
Fig. 1 The growth and AFB₁ accumulation in liquid medium culture of *A. flavus* NRRL 5337 in the presence or absence of 62.5ppm glyceollin

- ▲—AFB in broth (control)
- AFB in broth (+G)
- Wt. of mycelium (control)
- Wt. of mycelium (+G)
- pH of filtrate (control)
- ▼—pH of filtrate (+G)

(二) 大豆保卫素对液体培养中黄曲霉毒素 B₁ 积累的影响

培养基中加入最终浓度为 $62.5 \mu\text{g/ml}$ 的大豆保卫素以后,黄曲霉毒素 B₁ 的初始积累速度和最高积累量均比对照降低约 95% (图 1)。即使加入的最终浓度减至 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 时,二者的降低幅度仍达 70% (图 2)。但是菌丝体的生长仅分别比对照降低 16.1% 和 11.4%,而其生长曲线和培养液的 pH 变化曲线则和对照几无差别。

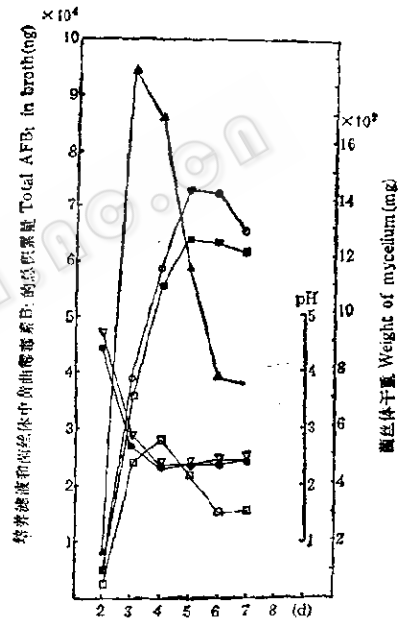


图 2 *A. flavus* 5337 在加与不加 6.25ppm 大豆保卫素的液体培养基中的生长和毒素积累
Fig. 2 The growth and AFB₁ accumulation in liquid medium culture of *A. flavus* NRRL 5337 in the presence or absence of 6.25ppm glyceollin

- ▲—AFB in broth (control)
- AFB in broth (+G)
- Wt. of mycelium (control)
- Wt. of mycelium (+G)
- pH of filtrate (control)
- ▼—pH of filtrate (+G)

(三) 大豆保卫素预处理对接菌培养后玉米中黄曲霉毒素 B₁ 积累的影响和保卫素的残留量分析

表 1 豆粒中黄曲霉毒素 B₁ 积累速度的直线回归方程
Table 1 Linear regression equation describing the rate of AFB₁ accumulation in inoculated soybean seeds (AFB₁ ng · g⁻¹ · d⁻¹)

样 品 Samples	回归方程 Regression equation	r ² 值 r ² value
正常豆粒 ^a Viable seeds ^a	Y = 63X - 0.0	1.00
灭活豆粒 ^a Non-viable seeds ^a	Y = 189X - 9.3	0.99
正常豆粒 ^b Viable seeds ^b	Y = 47X - 8.8	0.91
灭活豆粒 ^b Non-viable seeds ^b	Y = 113X - 0.9	0.99

a. 26℃ 培养,第 5 至 9 天样品。
Samples collected at the fifth to ninth day incubation at 26℃.
b. 30℃ 培养,第 3 至 6 天样品。
Samples collected at the third to sixth day incubation at 30℃.

表 2 玉米中黄曲霉毒素 B₁ 积累速度的直线回归方程
Table 2 Linear regression equation describing the rate of AFB₁ accumulation in corn kernels (AFB₁ ng · g⁻¹ · d⁻¹)

样 品 Samples	回归方程 Regression equation	r ² 值 r ² value
保卫素预处理玉米 Glyceollin pretreated kernels	Y = 53.5X - 6.0	0.995
对照玉米 Control kernels	Y = 163.8X + 7.5	0.999

表 3 接菌培养后预处理玉米中的保卫素残留量
Table 3 Residual glyceollin in pretreated corn kernels after inoculation with *A. flavus* and incubated at 26℃

培养时间 (h) Incubation time	大豆保卫素残留量 (μg/g) Residual glyceollin
12	13.8
72	13.2
120	11.0
168	10.6

预处理与否对接种后黄曲霉菌的生长和产孢情况均未表现有何差别。接种后 7 天在处理和对照玉米中同时开始检出黄曲霉毒素 B₁, 但从第 7 到 11 天期间的积累速度(表 2)表明, 在对照玉米中约为预处理玉米中的 3 倍。

接菌培养不同时间后, 玉米中的保卫素残留量分析结果如表 3。

讨 论

正常的具有萌发能力的大豆豆粒在接种黄曲霉产毒菌株后, 豆粒中黄曲霉毒素 B₁ 的积累速度显著低于灭活豆粒中的积累速度, 说明正常豆粒中必有某种制约的机制。本研究根据接种后两种豆粒上菌体生长和产孢情况均未发现有何差别, 但大豆

保卫素仅能在接种的正常豆粒中检出的线索,选择保卫素这一诱发形成的大豆代谢产物^[10]作了进一步探讨。从产毒黄曲霉菌株液体培养所获得的结果,清楚地显示大豆保卫素在并不显著影响菌体生长的浓度下能够极显著地降低毒素的积累速度。事实上,在接菌培养后正常豆粒中所检出的诱发形成的保卫素浓度,以及预处理玉米中所残留的保卫素浓度,就可能完全解释所观察到的毒素积累速度降低的幅度。这种解释也和正常豆粒以及预处理玉米上的菌体生长和产孢情况分别与灭活豆粒及未处理玉米上的菌体生长和产孢情况并无差别这一现象是相容的。

Keen^[14]早年的研究曾经证明,大豆上的天然微生物区系能够在一定条件下激发活豆粒产生大豆保卫素。本研究所获得的结果似乎能够用来进一步推测,在自然条件下大豆豆粒出现黄曲霉毒素污染的情况较为少见,如或出现其浓度也一般较低,其中的原因至少部分是由于微生物,其中也包括产黄曲霉毒素菌株本身,当环境条件有利于它们在豆粒上生长时所造成的侵害,能够使得存活的豆粒受激产生保卫素并因此而起到制约黄曲霉毒素积累的缘

故。

参 考 文 献

- [1] Heathcote, J. G. and J. R. Hibbert: Aflatoxin, Chemical and Biological Aspects, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1978.
- [2] Goldblatt, L. A.: Aflatoxin, Academic Press Inc., New York, 1969.
- [3] Howell, R. W.: Proceedings of The First U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms, p. 61—66, (ed. Herzberg), US Department of Interior, Washington, D. C., 1968.
- [4] Shotwell, O. L. et al.: *Cereal Chem.*, **46**: 454—463, 1969.
- [5] Bean, G. A.: *Appl. Microbiol.*, **24**: 437—439, 1972.
- [6] Irxing, G. W.: U. S. Department of Agriculture, ARS 20—17, 1971.
- [7] Hesseltine, C. W.: *Bacteriol. Rev.*, **30**: 795—805, 1976.
- [8] Davis, N. D. and U. L. Diener: Proceedings of The First U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms, p. 43—47, (ed. Herzberg), US Department of Interior, Washington, D. C., 1968.
- [9] Nagarajan, V. et al.: *Experientia*, **29**: 1502—1503, 1973.
- [10] Gupta, S. K. and T. A. Venkatasubramanian: *Appl. Microbiol.*, **29**: 834—836, 1975.
- [11] Sherertz, P. C. et al.: *Jour. of AOAC*, **59**: 662—665, 1976.
- [12] Yoshikawa, M. et al.: *Physiol. Plant Pathology*, **12**: 73—82, 1978.
- [13] Ingham, J. L. et al.: *Phytochemistry*, **20**: 795—798, 1981.
- [14] Keen, N. T.: *Phytopathology*, **65**: 91—92, 1975.

A BIOCHEMICAL MECHANISM THAT SUPPRESSES AFLATOXIN ACCUMULATION IN SOYBEAN SEEDS

Song Dakang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Despite the fact that growth and sporulation of toxigenic strain of *Aspergillus flavus* on inoculated viable and non-viable soybean seeds do not have any evident difference, the rate of Aflatoxin B₁ accumulation in viable seeds is much lower than that in non-viable ones. Results of studies with liquid cultures of *A. flavus* demonstrated that the presence of glyceollin, at a concentration even lower than that detected in inoculated viable seeds, could reduce the rate of Aflatoxin B₁ accumulation and its maximum level by more than 70%,

while its effect on mycelial growth was rather limited. Based on this finding, it is inferred that under normal conditions the infrequent occurrence and comparatively low level of aflatoxin contaminations in soybean seeds might be at least partly due to the elicitation of glyceollin production when they are being attacked.

Key words

Aflatoxin; Phytoalexin