苹果及其浓缩汁受棒曲霉素污染的地域特点研究

张小平,李元瑞,师俊玲,岳田利,王 蓉,惠黎明
(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对陕西眉县、洛川、礼泉、澄城等地苹果中的棒曲霉素青霉进行了分离和统计,并对不同地区厂家所产苹果浓缩汁中棒曲霉素的含量进行了调查分析。结果表明,陕西各苹果产区均有棒曲霉素产生菌的污染,其中扩展青霉最多,皮落青霉次之,圆弧青霉极少,此外还有少量其他青霉菌种。气候湿润、苹果种植区集中地域所产苹果受青霉和棒曲霉素产生菌的污染较为严重,各地苹果受污染程度依次为眉县>洛川>礼泉>澄城;不同地区所产苹果浓缩汁中棒曲霉素含量不同。

[关键词] 苹果;地域;棒曲霉素;苹果浓缩汁
[中图分类号] TS201.6; TS255.44 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)05-0135-04

棒曲霉素是一种对动物细胞具有致癌、致畸、致突变的毒素[1-2],它主要来源于腐烂的苹果原料,其中危害最大的是扩展青霉(*Penicillium expansum*)[3]。扩展青霉对苹果的浸染及其产毒能力不仅与菌种特性有关[4-5],而且与苹果的产地、品种和生产季节有关[6-7]。国外已在棒曲霉素产生规律方面作了较多研究,但由于所用苹果品种、地理环境、加工条件等不同,已有的研究结果并不适用于我国的实际情况。陕西关中地区是我国苹果主产区之一,是出口苹果浓缩汁的主要产地,为此,本研究对陕西不同产地苹果受棒曲霉素产生菌的污染情况,以及不同地区厂家所产苹果浓缩汁受棒曲霉素污染的情况进行了研究,以期为加工厂进行原料选择和控制棒曲霉素污染提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 苹 果 霉烂程度基本相同的富士、秦冠、乔纳金各 20 个,采自陕西关中主要苹果生产区(礼泉、洛川、合阳、眉县)。

1.1.2 浓缩苹果汁 分别由陕西不同地区的 A,B,C,D 4 个果汁厂提供,各厂的地理位置分别是:A 厂位于渭北黄土高原东部,黄河中游西侧,为暖温带半干旱大陆性季风气候;B 厂位于陕西省西部,秦岭北麓,渭河南岸,气候温和湿润;C 厂位于渭北黄土高原沟壑区,是黄土高原土层最厚的塬区,属暖温带半湿润大陆性季风气候;D 厂位于关中平原中西部,属暖温带大陆性季风气候。

1.1.3 培养基 察氏培养基:硝酸钠 3 g/L,磷酸氢二钾 1 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,氯化钾 0.5 g/L,硫酸亚铁 0.01 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 20 g/L。

PDA 培养基:20%土豆汁,20 g/L 葡萄糖,20 g/L 琼脂,自然 pH。

苹果汁培养基:富士苹果去皮、去核后,用榨汁机榨汁,果汁加热过滤(4 层纱布)后,取 60 mL 果汁装入 250 mL 三角瓶中。除特别指出外,pH 均为自然 pH(pH 5.0 左右)。将装有果汁的三角瓶用 8 层纱布封口后,在 105 ℃下灭菌 15 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的分离纯化 在无菌条件下,从每个苹果上称取 5 g 腐烂部分,将同一地区的样品混和在一起进行破碎制得果浆;称取 25 g 果浆,加入 250 mL 无菌水,充分振荡后稀释至 10^{-2}倍;吸取 1 mL 稀释液涂在装有察氏培养基的平皿中,设 2 个重复。在 28 ℃,相对湿度 90%的恒温、恒湿条件下培养 3 d 后,挑取所有可见青霉菌落进行逐步纯化,分别保

[收稿日期] 2005-12-26
[基金项目] 国家"十五"科技攻关项目(2001BA501A15);国家科技部西部专项(2001BA901A19);西北农林科技大学"青年骨干计划"项目
[作者简介] 张小平(1973-),男,江苏徐州人,讲师,在职博士,主要从事食品科学研究。
[通讯作者] 李元瑞(1942-),男,陕西杨凌人,教授,博士生导师,主要从事食品科学研究。E-mail:lyr628@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

存。

1.2.2 菌种的分类鉴定 根据GB/T4789.16—1994"食品卫生微生物学检验——常见产毒霉菌的鉴定"提供的方法,对分离到的菌种进行初步分类鉴定。操作时,用涂布法将分离到的各菌种在PDA培养基上培养1~2 d,待平板上有白色菌丝生长,但未形成孢子时,用打孔器打取菌丝块(直径0.5 cm),转接至一新察氏培养基上,在28 C、相对湿度90%的恒温、恒湿条件下培养7 d,每天观察菌落的形态变化。同时通过插片培养,显微观察菌种的菌丝特征及孢子形成特点,并进行显微拍照。

此外,根据不同青霉菌种对苹果侵染能力的不同,即扩展青霉最强、皮落青霉次之、圆弧青霉几乎不侵染苹果的特征,对菌种分类结果进行进一步确定。具体方法是:用体积分数75%酒精对新鲜无病伤的富士苹果进行表面消毒后去皮,用无菌小镊子扎破其表皮,于破口处接种等量等浓度的各菌种孢子悬浮液,28 C培养10 d,观察腐烂病斑的大小。

1.2.3 菌种产毒性能的测定 将各菌种在PDA斜面上培养7 d后,刮取斜面上的孢子,悬浮于30%甘油中,制成浓度约为10^6/mL的孢子悬液。在苹果汁培养基中接入0.5 mL孢子悬液,28 C、相对湿度90%的恒温、恒湿条件下静置培养7 d,测定各菌种的产毒情况。

1.2.4 棒曲霉素的提取与测定 将苹果汁培养液过滤除菌,10 000 r/min离心5 min,得上清液,参考SN0589-1996"苹果浓缩汁中棒曲霉素含量的测定"中的方法提取棒曲霉素:取上述上清液25.0 mL,用25.0 mL乙酸乙酯振荡提取5 min,然后静置分层;按照上述方法将水层再用乙酸乙酯重复提取2次,弃去水层;合并3次乙酸乙酯提取液,加入10.0 mL碳酸钠溶液(14 g/L),立即振摇,静置分层(此净化操作应尽可能在2 min内完成);再加入10.0 mL乙酸乙酯提取碳酸钠水层1次,弃去碳酸钠水层,合并乙酸乙酯提取液,加入5滴浓乙酸,全部转移至旋转蒸发器内,于40 C蒸至剩余溶液为1~2 mL,于40 C下用氮气吹干;用1.0 mL乙酸盐缓冲液(pH 4.0)溶解残留物,用0.25 μm微孔膜过滤后,用高效液相色谱仪进行测定。测定条件为:ODS反向柱(长276 nm,内径4.6 nm);流动相乙腈∶水(体积比)=10∶90;紫外检测器,276 nm;柱温40 C;进样流速,1.0 mL/min;样液注射量,10 μL。

1.2.5 不同厂家所产苹果汁中棒曲霉素含量的分析 在2003-08~2004-01的整个榨汁季节,对A,B,C,D 4个厂家所产每批苹果浓缩汁中棒曲霉素含量进行跟踪检测,分别计算各厂产品中棒曲霉素含量的月平均值。

2 结果与分析

2.1 不同产地腐烂苹果中棒曲霉素产生菌的差异

受土壤、气候及苹果品种的影响,不同苹果产区的微生物菌群存在一定差异,导致苹果腐烂的微生物菌种也会有所差异。棒曲霉素产生菌通常在苹果产生部分腐烂后才侵入苹果内部,并在其中生长、产毒,其中主要是扩展青霉。为此,本文重点考察了苹果腐烂部分青霉的毒素产生能力。由表1可见,从不同产地腐烂苹果中共分离得到195个青霉菌株,其中扩展青霉最多,皮落青霉次之,圆弧青霉极少,此外还有少量其他青霉菌种。在这些菌株中,只有61株能产生棒曲霉素,其中56株为扩展青霉,2株为皮落青霉,3株为其他青霉(表2)。由此可见,扩展青霉是苹果中污染和产生棒曲霉素的主要青霉菌种,其总数和棒曲霉素产生菌数均最大。

表1 不同产地腐烂苹果中分离到的青霉菌株数

Table 1 *Penicillium* strains isolated from rotten apples of different planting areas

苹果产地 Apple planting area	青霉素种类 *Penicillium* strains				
	青霉菌株总数 Total number of *Penicillium*	扩展青霉 *Penicillium expansum*	皮落青霉 *Penicillium crustosum*	圆弧青霉 *Penicillium cyclopium*	其他青霉 Other unidentified *Penicillium* spp.
眉县 Mei Xian	82	60	12	2	8
洛川 Luo Chuan	49	40	7	0	2
礼泉 Li Quan	40	30	7	0	3
澄城 Cheng cheng	24	21	3	0	0
总计 Total	195	151	29	2	13

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　不同产地腐烂苹果中分离到的产生棒曲霉素的青霉菌株数

Table 2　Patulin-forming *Penicillium* strains isolated from rotten apples of different planting areas

苹果产地 Apple planting area	菌株数 *Penicillium* strains				
	青霉菌株总数 Total number of *Penicillium*	扩展青霉 *Penicillium expansum*	皮落青霉 *Penicillium crustosum*	圆弧青霉 *Penicillium cyclopium*	其他青霉 Other unidentified *Penicillium* spp.
眉县 Mei Xian	34	32	1	0	1
洛川 Luo Chuan	12	10	1	0	1
礼泉 Li Quan	10	9	0	0	1
澄城 Cheng cheng	5	5	0	0	0
总计 Total	61	56	2	0	3

青霉菌株总数及产生棒曲霉素的青霉菌株总数在不同苹果产区间存在较大差异，并呈现出一定的规律性，其由大到小的顺序依次为眉县、洛川、礼泉、澄城。本研究结果表明，选用棒曲霉毒素产生菌感染较轻产地的苹果原料，可以降低果汁中棒曲霉素的污染程度。

由于青霉是一种适宜在潮湿、温暖和偏酸性条件下生长的真菌，其在生长过程中会产生大量孢子，孢子随风飘扬而到处传播。因此，潮湿的气候和集中的苹果栽培都利于青霉的传播。从 4 个苹果产区的气候和苹果的种植情况看，眉县和礼泉的气候较为潮湿，而洛川和澄城的气候比较干旱；另外，眉县和洛川的苹果栽培较礼泉和澄城更为集中。眉县苹果的污染最严重是因为此地不但气候湿润，而且苹果种植相对较为集中，澄城污染最轻是因为此地不但气候干燥，而且苹果种植相对稀疏。因此，气候和苹果种植的集中程度是导致青霉总数和棒曲霉素产生菌数在不同地域间有所差异的主要原因。

2.2　不同厂家所产苹果浓缩汁中棒曲霉素的含量变化

由图 1 可见，A，B，C，D 4 个厂家所产浓缩苹果汁中棒曲霉素含量在一个榨季的变化趋势基本一致，但其绝对值有所不同，依次为 B>C>D>A。说明苹果产地对苹果浓缩汁中棒曲霉素含量有较大影响。

据调查，A，B，C，D 4 厂所用生产技术基本相同，所用原料均以当地所产苹果为主。因此可以认为，原料产地是导致棒曲霉素含量差异的主要原因。结合各厂所在地的地理位置和气候特点可知，B 厂所在地域温和湿润，适于青霉的生长与繁殖；而 C，D，A 厂所在地的干旱程度依次增加，A 厂所处地域已经属于半干旱大陆性季风气候，不利于青霉的生长与繁殖。

因此，苹果原料受棒曲霉素污染较重地区的果汁生产厂家，应根据实际情况对加工工艺进行适当改良，以提高产品质量。

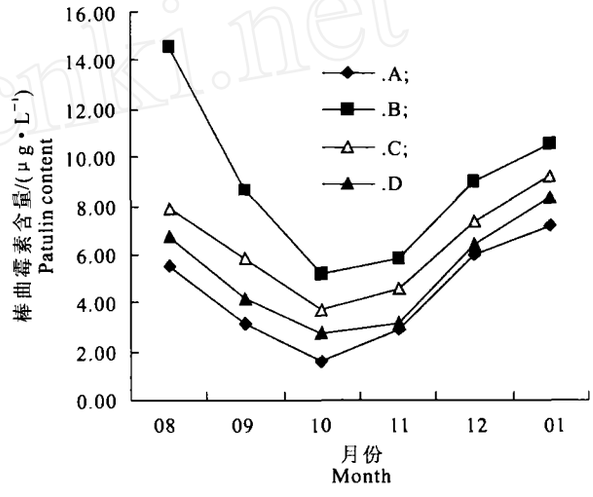

图 1　各果汁厂所产苹果浓缩汁中棒曲霉素含量的变化趋势

Fig. 1　Patulin content in concentrated apple juice produced in different factories

从图 1 还可以看出，在整个榨季中，各厂苹果浓缩汁中棒曲霉素含量均呈先降后升的趋势，在 10 月份达到最低值。这是因为在 10 月份以前，厂家所用原料主要是果园中的落果；10 月份以后，由于贮藏期的延长，苹果原料的烂果率增加，这也说明果园中的落果和贮藏期的苹果受棒曲霉素的污染更为严重。因此，可通过减少果实与地面的接触及缩短苹果的贮藏期，以从根本上降低苹果和果汁中棒曲霉素的污染。

3　讨　论

本研究发现，从不同地区所产苹果中分离到的棒曲霉素产生菌数各不相同，以当地苹果为原料不同地区苹果浓缩汁生产厂所得产品中的棒曲霉素含量也不相同，从而说明棒曲霉素污染程度在不同地域间存在一定差异；结合当地气候与苹果种植规模

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

进行分析后发现,潮湿的气候和苹果的集中种植均有利于棒曲霉素产生菌的污染。该结果在国内外尚属首次报道。另外,本文的研究结果也能为果汁加工厂的原料选择提供一定的理论指导。

[参考文献]

[1] Bissessur J,Permaul K,Odhav B. Reduction of patulin during apple juice clarification[J]. Journal of Food Protection,2001:1216-1219.

[2] Radhia M,Marc M,Nicolas G,et al. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinalepithelium:mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione[J]. Toxicology and Applied Pharmacology,2002,181:209-218.

[3] Arici M. Patulin production of *Penicillium* isolates from fermented olives in a synthetic medium[J]. Ernaehrung,2000,24(6):257-259.

[4] Abrunhosa L,Paterson R R M,Kozakiewicz Z,et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes[J]. Letters in Applied Microbiology,2001,32(4):240-242.

[5] Paster N,Huppert D,Barkai G R,et al. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres[J]. Food Additives and Contaminants,1995,12(1):51-58.

[6] Gokmen V,Acar J,Alper N,et al. Change of patulin in apple juice concentrates through processing season[J]. Fruit Processing,1999,9:194-196.

[7] Ross G U,Taniwaki M H,Sabino M,et al. Production of patulin in apples (*Malus domestica* Borkhausen),Gala and Fuji cultivars inoculated with *Penicillium* spp. [J]. Ciencia e Tecnologia de Alimentos,1998,18(1):63-67.

Studies on the variation of patulin contamination in apple and apple concentrate juice among different planting areas

ZHANG Xiao-ping,LI Yuan-rui,SHI Jun-ling,YUE Tian-li,WANG Rong,Xi Li-ming

(*College of Food Science and Engineering,Northwest A & F University,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*)

Abstract:Patulin-forming penicillium was isolated and counted from rotten apples produced in Meixian,Liquan,Luochuan and Chengcheng counties in Shaanxi province. Patulin contamination of commercial clear apple juice concentrate made in four different areas in Shaanxi was also tested in the whole producing season,from Augest 2004 to January 2005. Patulin-forming penicillium was found in all apple planting areas,which is mainly *Penicillium expansum*,a few of *Penicillium crustosum* and *Penicillium cyclopium*,and few other unidentified *Penicillium* spp. Rotten apples produced in humid or densely planted apple areas are more seriously contaminated,corresponding to contamination degree of Meixian > Luochuan > Liquan > Chengcheng. Patulin content in apple juice concentrate varies in different planting areas.

Key words:apple;planting area;patulin;juice

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net