

黃麴毒素污染農產品及 環境因子影響黃麴菌 產生黃麴毒素之研究

國中教師組化學第三名

台北縣立光榮國民中學

作者：曾 信 雄

一、緒 言

黃麴毒素 (Aflatoxins) 係由黃麴菌 (*Aspergillus flavus*) 等多種黴菌所產生，對動物及人類具有高度毒性的次生有毒代謝產物 (Secondary toxic metabolites)，它由食物或飼料之媒介直接威脅人畜之健康，目前它不僅已被證明對某些動物引起原發性肝癌 (Primary Cancer)，更由於流行病學的研究 (Epidemiological study)，顯示與人類肝癌之發生具有密切的關係，是一種可怕的致癌因子，截至目前為止，至少已經分離出 17 種黃麴毒素，其中黃麴毒素 B_1, B_2, G_1, G_2 是源自於黴菌，其餘則為動物代謝黃麴毒素 B_1, G_2 之產物其中黃麴毒素 B_1 之分佈最廣，毒素最強。曾經有無數家禽或家畜因誤食污染過黃麴毒素之飼料，結果染患了黃麴毒素症 (Aflatoxicosis) 而死亡或危害健康而導致飼養效率及產量之降低。動物因黃麴毒素而引起的中毒現象，除了急性中毒 (Acute toxicity) 外亦能導致慢性中毒 (Chronic toxicity) 而最後引發肝癌。因此它在食品安全方面扮演極為重要的角色。1971 年 Bourgeois 等人指出所有的動物如果攝取了 13.5 ~ 40.5 PPm 之黃麴毒素 B_1 在 149 個小時

可導致死亡。1974年Campbell及Stoloff指出如果每日食用含1.7PPM黃麴素的米則將使13公斤重的2歲小孩發生嚴重肝受損，如劑量高達75PPM時將可導致死亡。1975年Krishnamachari等人指出印度鄉村由於黴粟(mouldy maize)受黃麴毒素污染而引起的黃麴毒素症致死106人和291人有明顯的肝臟功能喪失症狀。

利於生產黃麴毒素之條件包括很廣其主體是碳水化合物，農產品中以花生、玉米等較易受到感染，污染條件中溫度、濕度、含水量空氣等影響最大，PH值亦為主要因素之一，當PH值是6.9時產毒素量最高。如果在適當環境下，通常24小時即可產生黃麴毒素，此外農產品之破壞程度亦為產生黃麴毒素的主要因素。

自1960年英國農場發生十萬隻火雞集體中毒後，已引起世界對黃麴毒素的重視，在短短十七年中黃麴毒素污染之調查報告之多，顯示農產品受到黃麴毒素的污染已經到了不容忽視之地步。

台灣地處亞熱地帶，高溫多濕，非常有利於黃麴毒素產生菌之繁殖，若貯藏不當很容易受黃麴毒素所污染。最近發現進口玉米及市場中之花生嚴重地污染了該種毒素，而且又加上國人善食醱酵食品，這是否與台灣肝癌患率偏高之問題有關，值得重視，我們目前不斷要求增產糧食，並且大力推展畜牧事業，而對黃麴毒素污染農產品之問題應更加重視，為了解目前農產品受污染的情形而收集了進口玉米，及豬仔中毒之飼料加以分析，並就影響黃麴菌產毒之環境因子與條件，作深入的探討藉以謀求控制其蔓延之方法。

二、實驗方法與材料

一、農產品取樣與水分測定。

- (1) 隨機取樣農產品及飼料。
- (2) 水分之測定(以百分比表示之)

二、溫度與培養時間對黃麴菌產生黃麴毒素之影響。

- (1) 培養基：Czapek's agar medium (30 g) PH. 5.6
- (2) 菌株：A flavus Link

(3)培養方法：黃麴菌之孢子 (spore) 移植於 30 g 之培養基中分別以不同的時間 (日) ， 10 日、 12 日、 14 日、 16 日、 18 日、 20 日 及不同之溫度 ($^{\circ}\text{C}$) 5 $^{\circ}\text{C}$ 、 8 $^{\circ}\text{C}$ 、 15 $^{\circ}\text{C}$ 、 20 $^{\circ}\text{C}$ 、 25 $^{\circ}\text{C}$ 、 28 $^{\circ}\text{C}$ 、 35 $^{\circ}\text{C}$ 、 40 $^{\circ}\text{C}$ 培養。

三、高壓殺菌使用熱壓器 (Autoclave) 之玉米和花生經接種黃麴菌後產生黃麴毒素之影響。

取碎玉米、花生分兩組，一組經高壓殺菌，一組未經高壓殺菌，每實驗瓶 30 g ， 經接種黃麴菌後分別置於 5 $^{\circ}\text{C}$ 、 28 $^{\circ}\text{C}$ 、 35 $^{\circ}\text{C}$ 之定溫箱中培養， 12 天後 取出分析黃麴毒素積聚之情形。

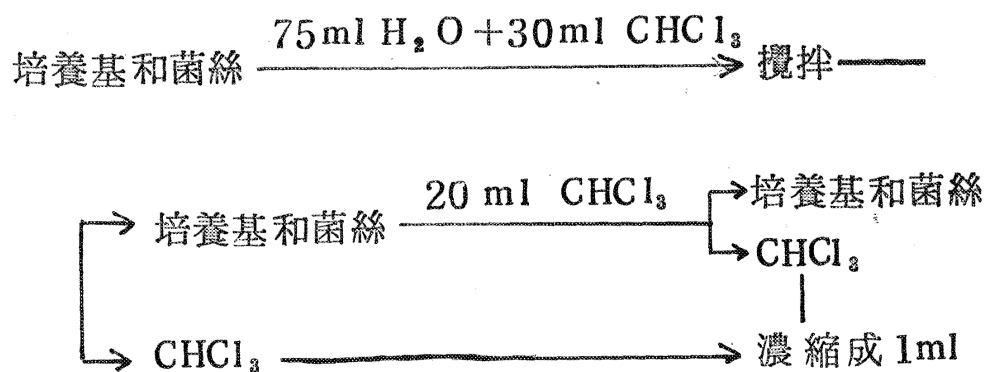
四、二氧化碳與空氣對黃麴菌產生黃麴毒素的影響。

培養在 Czapek's agar medium 中之黃麴菌分別置於無空氣，充滿二氧化碳，充分空氣，及每日曝露空氣中 10 分鐘及 28 $^{\circ}\text{C}$ 之定溫箱中培養經 12 天後取出分析黃麴毒素之積聚情形。

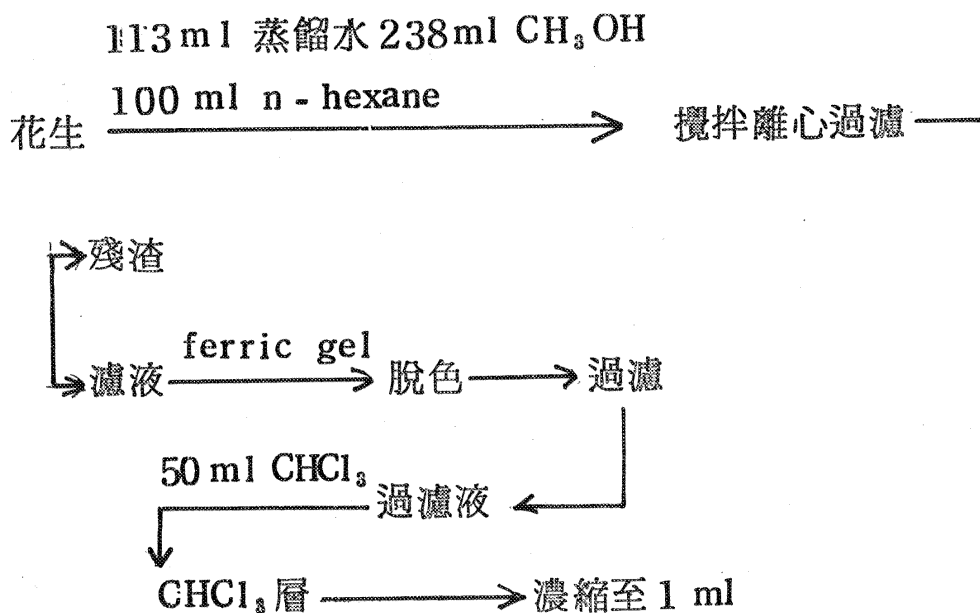
五、黃麴毒素之分析

抽取

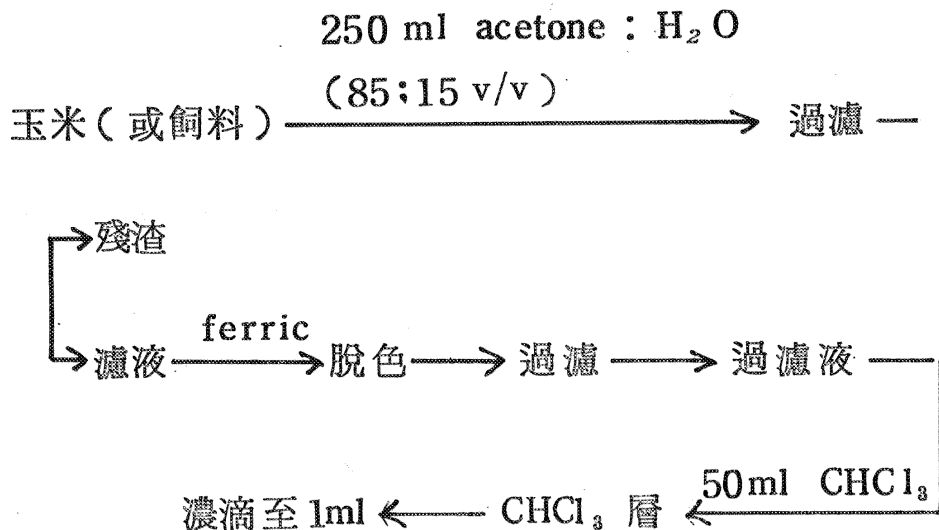
(1) Czapek's agar medium 中黃麴毒素之抽取



(2)花生中黃麴毒素抽取



(3)玉米及飼料中黃麴毒素之抽取。



定性：

(1)薄層色層分析(Thin layer Chromatography)

分析體積 50 μ l，展開液 T. E. F. (Toluene : Ethylacetate : 90% Formic acid 6 : 3 : 1 v/v/v)，C. A (Chloroform : Acetone 9:1 v/v)，C. M (Chloroform : methanol

97:3 v/v) 系統經展開後藉標準黃麴毒素之助(比較 Rf 值與螢光性質)而確定之。

(2) 呈色法分析

1 碘蒸發法 (Iodine evaporation) 黃麴毒素螢光變成黃綠色。

2 噴灑法 (Spraying)

(i) 以 2, 4 dinitrophenyl hydiazine 溶液, 黃麴毒素呈桔紅色。

(ii) 以 0.5 ml P - anisaldehyde 溶解於含 10 ml glacial acetic acid 5ml H₂SO₄ (C one) 之 85ml 之 methanol 中, 噴灑後置於 130 °C 之烘乾箱中 8 ~ 20 分鐘, 黃麴毒素 B₁, B₂ 呈紫色螢光, 而 G₁, G₂ 呈藍色螢光。

定性所用之紫外線波長是 365 nm

定量:

將確認之黃麴毒素斑點, 在迷你管中 (minicolumn) 以溶劑 (CHCl₃ + CH₃OH 94 + 6 v/v) 純化並以 meotic Velasco flourtor metes 定量之。後再以 365 nm 之紫外線下, 觀察 florasil 層之螢光而確定之。

三、實驗結果與討論。(略)

農產品之分析

進口玉米受昆蟲之蛀食非常嚴重, 受黃麴毒素污染之結果如下

黃麴毒素污染百分率 (%)

存放期	樣品數	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	樣品數	百分率 (%)
一個月	24	41.7	8.3	12.5	25.0	4	17
二個月	24	33.3	8.3	16.7	8.3	9	38
三個月	24	37.5	—	8.3	20.8	9	38
平均	(72)	37.5	5.5	12.5	18.0	(22)	31

註 () 表總和, T 表包括黃麴毒素 B₁, B₂, G₁, G₂。

受污染之玉米剪開後在 365 nm 之紫外線下可發現金黃綠

色之螢光，這可能是因爲 heat - label enzyme 作用所致。但豬仔中毒之飼料中並沒有發現黃麴毒素之污染，但在 T. E. F. 系統中展開後却發現 Rf 0.05 及 0.85 之極強之藍色螢光且經毒性試驗結果發現前者對 Brine shrimp larvae 有 61% 之致死率，而後者有 52% 之致死率。這兩種物質有待進一步之研究。

二 溫度對黃麴菌產生黃麴毒素之影響。

溫度與黃麴菌之生長成正相關，在低溫時菌絲生長緩慢，毒素無法合成，但溫度高達 40℃ 時，該菌之生長極爲迅速（但黃麴毒素量減至最低，由此可知黃麴毒素產生的最低溫約 10℃ 左右，最適溫 25℃ ~ 28℃ 最高溫 35℃ ~ 40℃ 至於量方面黃麴毒素 $B_1 + G_1 > B_2 + G_2$ 黃麴毒素可在薄層分析板上藉 365 nm 之紫外線之助而確認之。

三 培養時間對黃麴菌產生黃麴毒素之影響。

在適當的條件下，培養基中黃麴毒素積聚量自第 10 天開始增加，第十二天時最多，第十四天時突然減少，而此時可發現 Rf 值約爲 0.68 之黃綠色螢光，以後隨時間而變動不定，這些是否因爲 PH 值或其他原因所導致的結果，實有待進一步之研究。

四 經高壓殺菌之玉米和花生接種黃麴菌後產生黃麴毒素之影響。

經高壓殺菌或未經高壓殺菌之無毒碎玉米經 5℃、28℃、35℃ 培養 12 天後分析發現 28℃、35℃ 兩種溫度培養者出現極強的螢光反應，雖然，水分含量只相差 1% 但菌之生長及黃麴毒素之聚積差異甚大，28℃ 時黃麴毒素量達 1.194 PPb，35℃ 時 656.6 ppb，5℃ 時却等於 0（經高壓殺菌）而未經高壓殺菌者 28℃、35℃ 黃麴毒素全量各僅 5.8 ppb 而已。這或許是因高壓殺菌破壞玉米中之 Phytic acid，而使鋅充分影響了黃麴毒素的合成。或因未高壓殺菌之玉米內有其他菌類之競爭。而抑制產毒量。至於花生經高壓殺菌含水量 8% 未經高壓殺菌含水量 8.6%，都低於 9 - 10%，因此不但菌之生

長受影響而黃麴毒素之量亦受抑制。如高壓殺菌者含水量高達 50% 時不但菌之生長迅速而且亦能產生大量的黃麴毒素。
五 二氧化碳和空氣對黃麴菌產生黃麴毒素之影響。

由於一般產毒黴菌是好氣性的微生物 (Aerobic microorganism) 因此氧氣的利用對黴菌的代謝作用影響很大。在完全二氧化碳或無空氣之環境中黃麴毒素的產生受到限制。但如果在正常空氣下或每日曝露空氣中 10 分鐘則產毒量極大，這些產生之黃麴毒素可藉 365 nm 之紫外線下顯出黃綠色螢光並可由薄層色層分析板中確認該毒素之存在，氧氣影響黃麴毒素產生可能是因氧氣能影響黴菌之代謝及類似 Oxygenase 之酵素系統而無法將先驅物質轉變為黃麴毒素之故。

要防止黃麴毒素的蔓延，農產品之儲藏環境非常重要，如果儲藏前將含水量降至 8% 以下，溫度降至 10℃ 以下直接將濕度降至 50% 以下，而且防止農產品受到破壞，這樣黃麴毒素污染農產品之情形或可降至最低程度或在儲藏前利用人工大氣抽去空氣或增加二氧化碳，氮或利用氨或 Propionic acid 加以燻蒸，將可防止黃麴毒素污染的嚴重問題。