

食醋酿造用玉米化学成分变化 对玉米赤霉烯酮提取的影响

高建伟¹, 张浩楠¹, 于丽萍¹, 金吉东², 贾文影², 张舵¹

(1. 齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 科菲特饲料(齐齐哈尔)有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 161200)

摘要:玉米食醋主要是以玉米、高粱为主要原料经发酵而成的具有多种功能的酸性调味品。随着传统食醋生产工艺的不断改善,安全水平不断提高,但仍存在一些潜在的危害因子。文章主要探讨了玉米化学成分变化对玉米赤霉烯酮提取的影响,进而有效提高ELISA方法检测玉米赤霉烯酮的稳定性,实验以重新审视样品前处理这一最基础的科学问题,在样品前处理阶段选取经过180 s粉碎的空白玉米为实验样品,以玉米赤霉烯酮为研究对象,采用ELISA法和UPLC-MS法联合检测,以测定玉米赤霉烯酮提取率为指标,分析玉米样品中在不同放置环境下、放置不同时间段的粉碎玉米样品中水分、粗脂肪、粗蛋白、灰分等化学成分的变化与玉米赤霉烯酮添加回收率的相关性。结果表明,不同储存环境随着储存时间延长,水分含量、粗脂肪含量与玉米赤霉烯酮的添加回收率具有一定的相关性,水分影响大于粗脂肪。粗蛋白、灰分与玉米赤霉烯酮的添加回收率无明显相关性。

关键词:食醋;玉米;玉米赤霉烯酮;间接竞争酶联免疫吸附法;高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号:TS264.22

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1000-9973.2021.07.009

文章编号:1000-9973(2021)07-0042-05

Effects of Chemical Composition Changes of Corn Used in Vinegar Brewing on the Extraction of Zearalenone

GAO Jian-wei¹, ZHANG Hao-nan¹, YU Li-ping¹, JIN Ji-dong², JIA Wen-ying², ZHANG Duo¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Co-Feed (Qiqihar) Co., Ltd., Qiqihar 161200, China)

Abstract: Corn vinegar is a multifunctional acidic condiment which made from corn and sorghum by fermentation. With the continuous improvement of the production technology of traditional vinegar, the security level is continuously improved, but there are still some potential hazardous factors. In this paper, the effects of chemical composition changes of corn on the extraction of zearalenone are discussed, and the stability of zearalenone detection by ELISA is effectively improved. In this experiment, the most basic scientific problem of sample pretreatment is re-examined. In the sample pre-treatment stage, the blank corn crushed for 180 s is selected as the experimental sample, zearalenone is taken as the research object, the correlation between the recovery rate of zearalenone and the changes of water, crude fat, crude protein, ash and other chemical components in the crushed corn samples in different storage environments and different storage periods is analyzed with the extraction rate of zearalenone as the index by ELISA method and UPLC-MS method. The results show that the water content and crude fat content have a certain correlation with the recovery rate of zearalenone under various storage environments and different storage time, and the effect of water is greater than that of crude fat, crude protein and ash content have no significant correlation with the recovery rate of zearalenone.

Key words: vinegar; corn; zearalenone; indirect competitive ELISA; UPLC-MS

收稿日期:2021-01-16

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术项目(12541871)

作者简介:高建伟(1982-),男,讲师,博士,研究方向:食品营养与安全。

引文格式:高建伟,张浩楠,于丽萍,等.食醋酿造用玉米化学成分变化对玉米赤霉烯酮提取的影响[J].中国调味品,2021,46(7):42-46.

玉米发酵食醋是以玉米为主要原料,采用发酵和酶法相结合的技术制备而成^[1]。原料发酵后,既可提高营养价值,又可合成氨基酸、维生素等,显著提高利用率^[2-4]。玉米醋不但具有维生素、氨基酸等功能成分,而且具有抗衰老、抗心脑血管疾病、增强机体免疫力等作用^[5]。玉米富含的碳水化合物、蛋白质等物质,为微生物的生长繁殖提供了天然培养基,微生物的代谢加速易导致玉米品质发生变化,产生霉菌。玉米霉变不仅降低营养和商品价值,还会对其食用性和安全性造成影响。

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)最初发现于玉米赤霉病,世界范围内谷物和饲料均易污染。ZEN由Stob等^[6]从禾谷镰刀菌污染玉米中首次分离。全球有19个国家制定了食品中ZEN的限量标准,欧盟规定食品中ZEN残留限量标准为200 $\mu\text{g}/\text{kg}$,我国规定玉米、小麦及制品中ZEN的含量不得超过60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。ZEN体外检测方法主要有三类^[8],即化学检测法、免疫学检测法^[9]和时间分辨荧光技术检测法。

近年来对ZEN等食品有害物检测体系的研究领域非常活跃,包括超高效液相色谱^[10]、快速免疫分析方法、高通量检测技术、生物传感器在线检测技术等^[11]。ELISA法具有快速、高通量等特点,适用于食品中ZEN的检测,但是ELISA方法在样品定量分析时常发生测定值偏差的现象,涉及原因众多,样品前处理就是原因之一。虽然可采用超声波、超临界等方案辅助提取,但有悖于ELISA快速简便的初衷,因此,在确保ELISA方法简便、快速的基础上如何改善样品前处理的影响,提高ELISA检测的稳定性备受学者关注。

本研究在样品前处理阶段选取ZEN为实验对象,以ELISA方法测定ZEN提取率为指标,用UPLC-MS方法进行验证,分析玉米样品中化学成分的变化对ELISA检测结果的影响,发现影响提取效果的部分因子,进而可以为现代快速检测体系中简便高效的提取方法研究提供一些研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米样品:采自齐齐哈尔市梅里斯区雅尔塞镇东风村;ZEN、TMB;购自美国Sigma公司;甲醇、碳酸氢钠等;购自天津市广成化学试剂有限公司;HRP-羊抗小鼠IgG;购自碧云天生物公司;ZEN单克隆抗体;本实验室制备。

1.2 仪器与设备

Victor酶标仪 美国通用电器公司;马弗炉 苏州华隆工贸有限公司;脂肪测定仪 意大利VELP公司;TGL-16M台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心

机仪器有限公司;超高效液相色谱/四极杆-轨道阱质谱联用仪 赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 玉米样品前处理

根据甄玉萍等^[12]的实验采用高速万能粉碎机粉碎玉米,粉碎时间为180 s时,70%的甲醇水溶液提取,将处理后的玉米置于以下3种环境下保存:

通风干燥:用四分法取一定量的粉碎玉米样品,装在干净塑料袋中敞口置于实验室,温度约为15~25 $^{\circ}\text{C}$,保持良好通风。

低温密封:用四分法取一定量的粉碎玉米样品,装在干净密封袋中,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

高温高湿:用四分法取一定量的粉碎玉米样品,用干净的器皿盛装,置于30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中,并用饱和食盐水控制湿度在75%左右。

在储藏10, 20, 30, 60, 90 d用四分法取样测定。

1.3.2 间接竞争ELISA

1.3.2.1 样品前处理

准确称取一定量样品加入100 ppb ZEN标准品充分混匀,烘干后样品置于15 mL离心管中,加入2 mL 70%甲醇水溶液进行提取;涡旋混匀5 min, 4000 r/min离心5 min;取上清液400 μL ,加入600 μL 稀释液;涡旋混匀做待测样品。

1.3.2.2 实验方法

根据本实验室建立的间接竞争ELISA优化检测条件操作^[13]。

1.3.3 UPLC-MS检测方法

1.3.3.1 样品前处理

准确称取5 g粉碎样品于50 mL离心管中加入20 mL 70%甲醇水溶液;用涡旋混合器混匀5 min,摇床振荡30 min,室温下4000 r/min离心10 min;取0.5 mL上清液于15 mL离心管中,加入9.5 mL PBS稀释液;过0.22 μm 滤膜,做待测样品。

1.3.3.2 实验方法

超高效液相色谱/四极杆-轨道阱质谱联用仪的色谱条件见表1,质谱条件见表2。根据仪器操作要求加样,以ZEN标准品浓度为横坐标,ZEN出峰时间处的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

表1 色谱条件

Table 1 The chromatographic conditions

名称	条件
色谱柱	Thermo Scientific Hypersil Gold (50 mm×2.1 mm, 1.9 μm)
流动相A	0.1%甲酸水溶液
流动相B	甲醇
流速	0.3 mL/min
柱温	22 $^{\circ}\text{C}$

续 表

名称	条件
梯度洗脱	0~1 min 20% B
	1~7 min 20%~45% B
	7~10 min 45%~95% B
	10~13 min 95% B
	13~15 min 20% B 回到初始条件

表 2 质谱条件

Table 2 The mass spectrometry conditions

名称	条件
电离方式	HESI
检测方式	负离子扫描
毛细管电压	3.5 kV
离子源温度	300 ℃
鞘气流速	35 Arb
辅助气流速	14 Arb
选择离子扫描	317.14 m/z

注：“*”为定量离子。

1.3.4 水分含量变化对 ZEN 回收提取的影响

参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中直接干燥法测定水分含量^[14]。

1.3.5 粗脂肪含量变化对 ZEN 回收提取的影响

参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中索氏抽提法测定脂肪含量^[15]。

1.3.6 粗蛋白含量变化对 ZEN 回收提取的影响

参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法测定蛋白质中的总氮含量^[16]。

1.3.7 灰分含量变化对 ZEN 回收提取的影响

参照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》^[17]。

1.3.8 ZEN 的回收提取实验

分别称取上述 1.3.4~1.3.7 中的粉碎玉米样品，添加 100 ppb ZEN 标准品，充分均匀，烘干后分别采用间接竞争 ELISA 法及 UPLC-MS 法联合检测，计算 ZEN 添加回收率。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行分析处理，进行单因素方差分析，定义 $P < 0.05$ 为差异显著，有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

2.1.1 间接竞争 ELISA 法标准曲线

分别以浓度为 0, 0.2, 0.6, 1.8, 5.4, 16.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 ZEN 标准品为横坐标，以 OD 值为纵坐标，用 Origin 软件选择四参数 Logistic 绘制标准曲线，得到标准曲线方程： $y = 2.7599/[1 + (x/0.6616)^{0.7332}] + 0.0761$ ， $R^2 = 0.9969$ ，标准曲线见图 1。

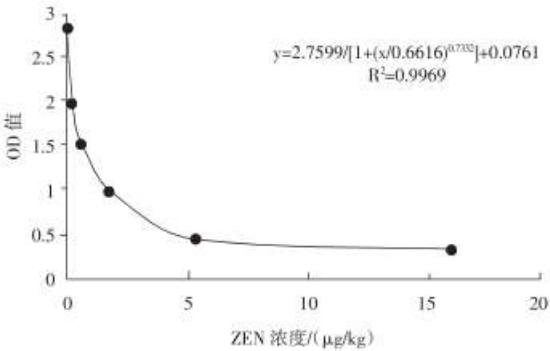


图 1 间接竞争 ELISA 法 ZEN 标准曲线

Fig. 1 ZEN standard curve of indirect competitive ELISA method

2.1.2 UPLC-MS 法标准曲线

分别以浓度为 0, 0.6, 5.4, 38, 122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 ZEN 标准品为横坐标，以 9.8 min 处出现的峰面积为纵坐标，用 Excel 绘制标准曲线，得到标准曲线方程： $y = 144315x + 316785$ ， $R^2 = 0.9989$ ，UPLC-MS 标准曲线见图 2。

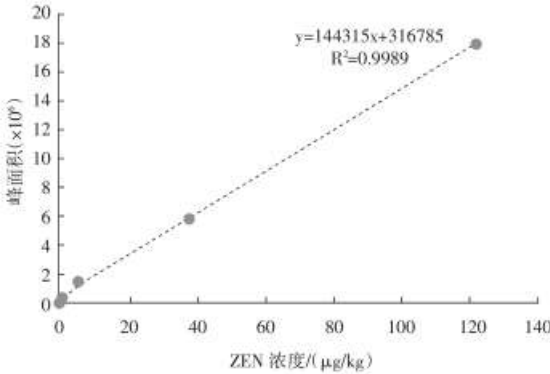


图 2 UPLC-MS 法 ZEN 标准曲线

Fig. 2 ZEN standard curve of UPLC-MS method

2.2 UPLC-MS 法测定玉米样品中 ZEN 含量色谱图

用 UPLC-MS 法测得的玉米样品中 ZEN 含量的色谱图见图 3，9.8 min 处为 ZEN 的出峰时间。

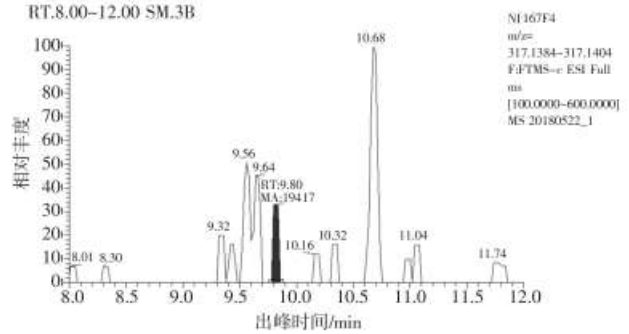


图 3 UPLC-MS 法测玉米样品中 ZEN 含量色谱图

Fig. 3 Chromatogram of ZEN content in corn samples measured by UPLC-MS

2.3 水分含量变化

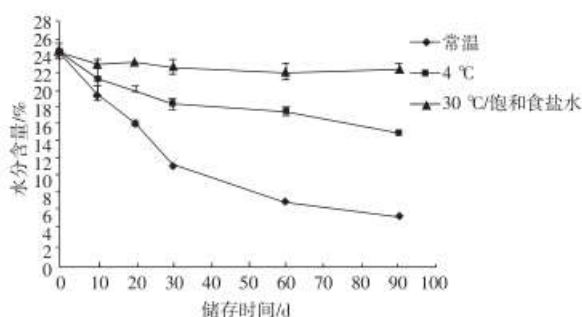


图4 不同储藏温度下玉米样品中水分含量随储存时间的变化

Fig. 4 The changes of moisture content in corn samples with storage time at different storage temperatures

由图4可知,在90 d的储藏期内,同一初始水分的样品,30 °C/饱和盐溶液条件下玉米水分在22.12%~24.57%之间波动,整体处于平稳趋势;4 °C下的玉米水分整体呈下降趋势,下降趋势平缓;常温下的玉米水分含量由24.57%下降到5.64%,下降趋势显著。3种环境下样品水分含量不同,可能是由于储存条件为30 °C、75%饱和食盐水条件下,提供了密闭空间的相对湿度,使得水分含量基本处于平稳趋势;4 °C低温冷藏下,水分略有下降,两种情况下含水量的变化可能是样品在储藏期间环境与微生物的生长繁殖活动有关^[18]。

常温条件下随着时间延长,玉米样品的水分含量显著下降,样品敞口放置于空气流通环境中,相对湿度较低,容器中储存的玉米样品上层暴露于空气中,有利于水分的蒸发。因此,比较3种环境条件下水分含量下降趋势为:常温>4 °C>30 °C/饱和盐溶液环境。

2.4 粗脂肪含量变化

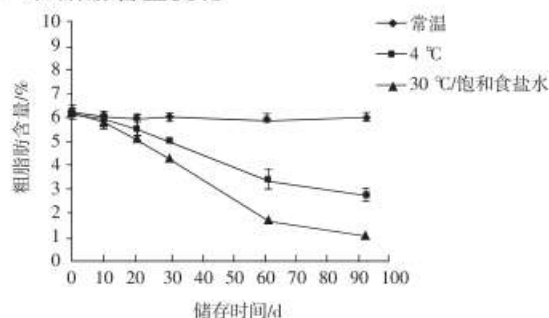


图5 不同储藏温度下玉米样品中粗脂肪含量随储存时间的变化

Fig. 5 The changes of crude fat content in corn samples with storage time at different storage temperatures

由图5可知,随着储存时间的延长,在常温下玉米样品粗脂肪含量降低量微小,在5.89%~6.24%之间波动;4 °C的玉米样品粗脂肪从6.24%下降到2.75%,30 °C的样品粗脂肪含量从6.24%下降到1.02%,30 d下降速度加快且整体下降趋势更显著。可能与玉米样品在储存过程中水分含量引起的霉菌生长有关。胡元森等^[19]认为玉米高水分促进玉米中微生物活性急剧增加,微生物代谢活动旺盛,玉米在储存中霉菌生长和繁殖过程会消耗部分脂肪,脂肪会被分解成游离的高级脂肪酸和甘

油物质等,导致粗脂肪含量呈降低趋势,且水分含量越高,粗脂肪降低趋势越显著。

2.5 粗蛋白含量变化

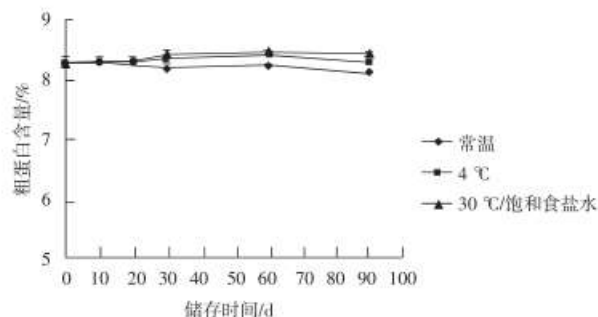


图6 不同储藏温度下玉米样品中粗蛋白含量随储存时间的变化

Fig. 6 The changes of crude protein content in corn samples with storage time at different storage temperatures

由图6可知,在90 d的储藏期内,3种条件下玉米样品粗蛋白含量均无大幅度增减变化,在4 °C和30 °C/饱和盐溶液环境下在20 d逐渐出现上升趋势,30 d后呈平稳趋势。粗蛋白含量升高可能与霉菌滋生有关,储藏过程中,霉菌生成的物质一部分转化为非蛋白氮,粗蛋白含量测定是以总氮乘以相应的蛋白质系数得到,非蛋白氮的增加可能会造成粗蛋白增加的假象^[20]。殷晶晶等^[21]提到在储藏期间玉米中粗蛋白总量基本保持不变,而蛋白质各组分会伴随储藏时间、温湿度发生上升或下降趋势。

2.6 灰分含量变化

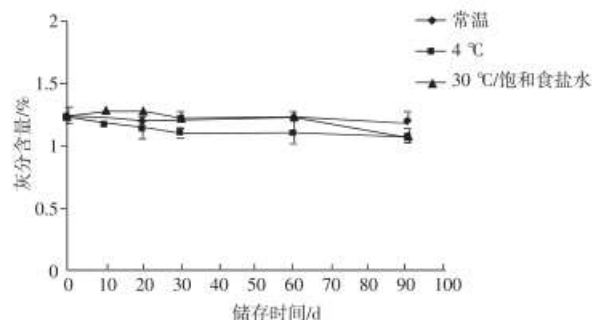


图7 不同储藏温度下玉米样品中灰分含量随储存时间的变化

Fig. 7 The changes of ash content in core samples with storage time at different storage temperatures

由图7可知,在不同环境条件下,随着储存时间的增加,灰分含量并没有明显波动趋势,在1.1%~1.3%之间呈稳定趋势。

2.7 ZEN添加回收率的分析

表3 ELISA回收率及UPLC-MS回收率

Table 3 The recovery rates of ELISA and UPLC-MS

时间/d	储藏条件	ELISA回收率/%	UPLC-MS回收率/%
10	常温	92.5±0.2	91.6±1.2
	4 °C冷藏	94.7±0.8	92.7±0.3
	30 °C/75%饱和食盐水	95.6±0.5	94.3±1.1

续 表

时间/d	储藏条件	ELISA 回收率/%	UPLC-MS 回收率/%
20	常温	93.5±0.3	93.7±0.4
	4℃冷藏	96.1±0.7	95.3±0.6
	30℃/75%饱和食盐水	97.3±0.5	96.4±0.4
30	常温	94.7±1.3	95.2±1.5
	4℃冷藏	97.2±1.1	98.3±0.3
	30℃/75%饱和食盐水	101.5±0.3	99.8±1.6
60	常温	92.9±0.5	91.2±1.4
	4℃冷藏	112.4±1.2	110±2.1
	30℃/75%饱和食盐水	121.4±2.3	119.3±1.9
90	常温	91.8±0.9	90.8±0.4
	4℃冷藏	105.2±1.4	102.7±0.6
	30℃/75%饱和食盐水	109.7±0.5	107.5±1.3

由表 3 可知,90 d 储存期内,常温条件下玉米样品添加回收率在 91.8%~94.7%之间,这种趋势是由于水分含量大幅度下降,在玉米储存过程中未引起霉变产生。30℃/饱和盐溶液与 4℃添加回收率变化趋势大体一致,30℃下添加回收率整体高于 4℃,在 30~60 d 储存期间添加回收率持续升高,分别达到 121.4%、112.4%。这可能是因为水分含量较高,玉米样品在储藏期内发生霉变,霉菌的生长繁殖消耗粗脂肪,镰刀菌属等产生 ZEN,因此添加回收率会因霉变的产生、粗脂肪含量的减少呈现上升趋势。而在 60 d 后,毒素积累到一定量,由于引起霉变的不同霉菌数量和种类之间的拮抗作用,在后期储存中,产生玉米赤霉烯酮的镰刀菌属等会逐渐减少,青霉属、曲霉属成为主要霉变的菌属,因此 ZEN 的添加回收率又呈下降趋势。而在 90 d 中灰分含量没有因环境、储存时间产生波动,无法将灰分和 ZEN 提取间产生相关联系。丁斌鹰^[22]在豆粕发霉过程中发现粗蛋白的含量变化没有受到霉菌生长及环境温度因素的影响。齐德生等^[23]研究玉米的品质变化时也得出此结论。因此,我们推断粗蛋白与 ZEN 的添加回收率无相关性。

3 讨论与结论

在 90 d 的储存期内,水分含量在常温、4℃冷藏条件下呈不同程度的下降趋势。30℃/75%饱和食盐水条件下水分含量变化幅度较小;高水分含量的玉米样品随储存期的延长均发生不同程度霉变,消耗粗脂肪,生成游离的脂肪酸和甘油,玉米赤霉烯酮会随着霉变的发生产生一定量的积累,储存 30 d 后添加回收率增幅显著增高;粗蛋白和灰分含量在不同储存条件下无明显变化。综上所述,玉米样品在不同储存条件下,随着储存时间的延长水分含量、粗脂肪含量与 ZEN 的添加回收率均具有一定的相关性,影响程度为水分>粗脂肪。粗蛋白、灰分与 ZEN 的添加回收率无明显相关性。本次实验确定了食醋酿造用玉米化学成分改变对 ZEN 添加回收率的影响因子,为 ZEN 的提取提供了化学因素影响的数据参考,为现代快速检测体系中简便高效的提取方法研究提供了基础,同时也为玉米食醋生产的各个环节提供了真菌毒素监测方法。

参考文献:

- [1]马先红,李雪娇,刘洋,等.谷物食醋营养与功能研究现状[J].中国调味品,2017,42(8):163-166.
- [2]刘旭.保健型荞麦醋酿造工艺研究[D].西安:陕西科技大学,2013.
- [3]李益民.三盛合小米醋奇妙的保健功效[J].农产品加工,2013(10):62-63.
- [4]信亚伟,孙惜时,谈甜甜,等.食醋的营养价值和保健功能作用研究进展[J].中国调味品,2015,40(2):124-127.
- [5]杨月欣.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2005:80-81.
- [6]STOB M, BALDWIN R S, TUIE J, et al. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*[J]. Nature, 1962, 196: 1318.
- [7]国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [8]王元凯,王君,严亚贤.玉米赤霉烯酮检测方法研究进展[J].中国公共卫生,2009,25(9):1100-1101.
- [9]PEI S C, LEE W J, ZHANG G P, et al. Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA[J]. Food Control, 2013, 31(1): 65-70.
- [10]宫小明,任一平,董静,等.超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J].分析测试学报,2011, 30(1): 6-12.
- [11]PEI S C, ZHEN Y P, GAO J W, et al. Screening and monitoring zearalenone-producing *Fusarium* species by PCR and zearalenone by monoclonal antibodies in feed from China[J]. Food Additives and Contaminants Part B: Surveillance, 2014, 7(4): 282-287.
- [12]甄玉萍,裴世春,王岩,等.玉米样品前处理方法和掩蔽剂对 ELISA 检测玉米赤霉烯酮的影响[J].食品科学,2015, 36(16): 255-260.
- [13]甄玉萍.玉米赤霉烯酮的提取纯化及其产生菌的产毒性研究[D].齐齐哈尔:齐齐哈尔大学,2016.
- [14]国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.食品安全国家标准 食品中水分的测定:GB 5009.3—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [15]国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.食品安全国家标准 食品中脂肪的测定:GB 5009.6—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [16]国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定:GB 5009.5—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [17]国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.食品安全国家标准 食品中灰分的测定:GB 5009.4—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [18]许利丽,刘玉兰,温运启,等.储存条件对玉米胚及粕和毛油中呕吐毒素含量的影响[J].中国油脂,2017,42(2):71-75,101.
- [19]胡元森,王改利,李翠香,等.玉米储藏期霉菌活动及玉米主要品质变化研究[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2010, 31(3): 16-19.
- [20]陈金定,刘玉兰,张振山,等.储存条件对玉米胚及其毛油中黄曲霉毒素 B1 含量和品质的影响[J].中国油脂,2015, 40(3): 57-61.
- [21]殷晶晶,赵妍,田晓花.不同储藏温湿度对玉米中蛋白质的影响[J].食品工业科技,2017,38(3):331-335.
- [22]丁斌鹰.霉变豆粕品质变化规律的研究[D].武汉:华中农业大学,2001.
- [23]齐德生,于炎湖,刘耘,等.霉变豆粕品质改变的研究[J].粮食与饲料工业,1999(1):25-26.