

酶联免疫法检测赭曲霉毒素 A 在浓香型白酒生产中的变化

叶光斌¹, 罗惠波^{1,2}, 杨晓东¹, 李丹宇¹, 沈才萍³

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000) (2. 四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000) (3. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 本研究采用酶联免疫法对泸州老窖大曲、入窖酒醅、丢糟、黄水、基酒、成品酒中的赭曲霉毒素 A 的含量进行检测, 结果表明: 此法检测灵敏度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相对标准偏差在 1.497%~3.369% 之间, 平均回收率达 96.4%, 浓香型白酒生产各个环节的样品中赭曲霉毒素 A 的含量远低于国内外食品行业的限量标准, 并由此初步验证得知赭曲霉毒素 A 在浓香型白酒生产中是安全的。

关键词: 酶联免疫法; 赭曲霉毒素 A; 浓香型白酒; 安全性

文章编号: 1673-9078(2013)5-1144-1147

Determination of the Change of OTA in Luzhou-flavor Liquor Production by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

YE Guang-bin¹, LUO Hui-bo^{1,2}, YANG Xiao-dong¹, LI Dan-yu¹, SHEN Cai-ping³

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, China)

(2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong, Sichuan 643000)

(3. Luzhou Laojiao Co. Ltd, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: In this study, Ochratoxin A (OTA) in Luzhou Daqu, pit entry fermented grains, waste lees, yellow water, base liquor, wine products were detected with ELISA kit. The results showed that the detection sensitivity, the relative standard deviation (RSD) in 5 parallel determinations and the average spike recovery rate were 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1.497~3.369% and 96.4%, respectively. OTA content of all samples were well below the domestic and overseas food industry standards, indicating that the preliminary results indicate that OTA in Luzhou-flavor liquor production was safe.

Key words: ELISA; OTA; luzhou-flavor liquor; safety

赭曲霉毒素 A(Ochratoxin, OTA)是一种具有强致癌、致畸和致突变性的分子真菌毒素, 对肾脏和肝脏的危害性极大^[1-2]。OTA 广泛存在于各种食物中, 谷物及其副产品是其主要来源, 此外, 在可可、咖啡、肉类、乳汁、干果、调味品、酒类中也存在 OTA^[3-6]。众所周知, 粮食作物是白酒工业的主要原料, 而 OTA 在粮食作物中广泛存在, 且在保存过程中极易造成扩大污染, 并极有可能通过粮食作物带入酿酒工业, 在调味品、葡萄酒, 医药等行业中已经开始引入酶联免疫法进行检验^[7-9], 因此, 通过相关手段验证 OTA 在白酒生产过程中的安全性就成为了十分迫切的问题。

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 四川省教育厅重大培育项目 (09ZZ015)

作者简介: 叶光斌 (1980-) 男, 讲师, 主要从事发酵工程相关的教学与科研工作

通讯作者: 罗惠波, 男, 教授, 从事酒类发酵工程专业的教学和科研工作

当前, 保证食品安全已成为食品行业的最大议题, 而作为传统的酿造行业, 占据我国市场主体的浓香型白酒^[10]在生产过程中的一系列安全性问题也需要引起我们足够的重视。本研究即从浓香型白酒生产中 OTA 含量的安全性着手, 考虑到白酒生产的循环性, 以及丢糟在生产饲料、肥料、食品、板材、曲药等方面越来越广泛的应用^[11-12], 在实验过程中, 采用酶联免疫法分别对泸州老窖大曲、入窖酒醅、丢糟、黄水、基酒以及成品酒中的 OTA 的含量进行了检测, 注意到了浓香型白酒生产的各个环节, 从而为初步确定 OTA 含量在浓香型白酒生产过程中的安全性提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

成品大曲、入窖酒醅、丢糟、黄水、基酒、成品酒均取自泸州老窖, 大曲来源于两个曲房, 标号 1、7,

其余样品来源于泸州老窖 40 年和 100 年窖池, 标号 2~6、8~12;

OTA 免疫亲和层析柱, 玻璃纤维滤纸以及 OTA 酶联免疫试剂盒均购自北京华安麦科生物技术有限公司。

1.2 主要试剂

样品提取液: 用去离子水将甲醇按 8:2 体积比进行稀释 (8 份甲醇+2 份去离子水), 用于提取样本中的 OTA;

PBS 缓冲液: 称取 8g 氯化钠, 1.2 g 磷酸氢二钠, 0.2 g 磷酸二氢钾, 0.2 g 氯化钾, 用 990 mL 蒸馏水溶解, 然后用浓盐酸调节 pH 值至 7.0, 最后用蒸馏水稀释至 1000 mL;

清洗缓冲液: 25 g 氯化钠, 5 g 碳酸氢钠以及 0.1 mL 吐温-20 用蒸馏水稀释至 1000 mL。

1.3 主要仪器与设备

酶标仪 (Thermo1500, 美国); 多功能高速粉碎机 (SB-350 克型), 上海广沙工贸有限公司; 高速匀质器 (FJ-200), 常州丹瑞实验仪器设备有限公司; 电子天平 (AR2140), 上海托利多仪器有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 样品上柱前处理

大曲, 入窖酒醅及丢糟的处理方法: 取 10 g 粉碎样品溶于 20 mL 样品提取液, 再加入 1 g 氯化钠以匀质器高速搅拌 2 分钟, 4000 r/min 离心 5 min, 取 10 mL 上清液并加入 40 mL PBS 缓冲液, 用玻璃纤维滤纸过滤, 得到滤液;

黄水, 基酒及成品酒的处理方法: 取 5 mL 样品脱气后加入 2.5 g 氯化钠与 45 mL PBS 缓冲液混匀, 用玻璃纤维滤纸过滤, 得到滤液。

1.4.2 免疫亲和柱净化样品^[13]

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下, 准确移取 10 mL 样品注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接, 调节压力, 使溶液以约 2 mL/min 的流速通过免疫亲和柱, 直至空气进入亲和柱中, 依次用 10 mL 清洗缓冲液与 10 mL 蒸馏水淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 并使 2 mL~3 mL 空气通过柱体, 最后准确加入 1 mL 色谱甲醇洗脱, 流速 1 mL/min, 1 mL 洗脱液中 OTA 的含量相当于 1 g 样品中的含量, 收集洗脱液, 供检测使用。

1.4.3 酶联免疫法检测步骤

参照酶联免疫试剂盒提供的方法进行检测: 首先将所需试剂包括洗涤工作液从冷藏环境中取出, 置于室温 (20~25 °C) 平衡 30 min 以上 (每种液体试剂使用前均须摇匀), 取出足够的检测孔板, 记录标准品及

样品的位置; 其次加入 50 μL 上述标准品/样品到对应的微孔中 (单独吸头), 并依次加入 OTA 抗试剂 50 μL/孔 (单独吸头), 设置酶标仪于 25 °C 反应 30 min 后, 用洗涤工作液充分清洗 5 次; 随后加入 OTA 酶标物 100 μL/孔, 25 °C 反应 30 min 并清洗 5 次; 再分别加入底物 A 液与底物 B 液 50 μL/孔进行显色, 25 °C 反应 15 min; 最后加入终止液 50 μL/孔, 水平轻微混匀, 设定酶标仪于 450 nm 处, 测定每孔吸光度 (OD) 值。

1.4.4 标准品与样品的酶联免疫检测

1.4.4.1 百分吸光率的计算

标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品的 OD 值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的 OD 值, 再乘以 100%, 即:

$$\text{百分吸光度值}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

注: B-标准溶液或样品溶液的平均吸光度值; B₀-0(ppb) 标准溶液的平均吸光度值。

1.4.4.2 标准曲线的绘制与检测结果计算

按照酶联免疫试剂盒所提供的 RIDAWIN 软件绘制标准曲线图, 同时计算出各样品中 OTA 含量。

1.4.5 方法评价

从灵敏度、精密度和回收率等方面, 对酶联免疫法用于测定浓香型白酒生产过程中 OTA 含量的方法进行评价。

2 结果与分析

2.1 标准品与样品的酶联免疫检测结果

2.1.1 标准曲线的绘制

由于考虑到标准品的成本, 对标准品与样品都进行 3 倍稀释, 得到标准品 1~5 号的工作浓度梯度分别为 0 ppb, 0.1 ppb, 0.3 ppb, 0.9 ppb, 2.7 ppb (ppb 相当于 μg/kg), 标号为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅。设置酶标仪于 450 nm 处进行 OD 值的检测, 检测数据通过 RIDAWIN 软件分析后得到的检测结果以及标准曲线如表 1 和图 1 所示:

表 1 赭曲霉毒素 A 标准样品的检测结果

Table 1 Test results of OTA standard sample

标品 序号	浓度 ppb	吸光度 平均值	百分吸 光度/%	计算 ppb	变异 系数/%
C ₁	0	1.798	100	-	-
C ₂	0.1	1.619	90	0.107	6.7
C ₃	0.3	1.193	66.4	0.282	6.1
C ₄	0.9	0.708	39.4	0.851	5.4
C ₅	2.7	0.178	28.8	2.9	5.6

由表 1 和图 1 可知: 各个标准品的变异系数均小

于 10%，标准曲线线型关系良好，完全符合酶联免疫试剂盒的检测要求。

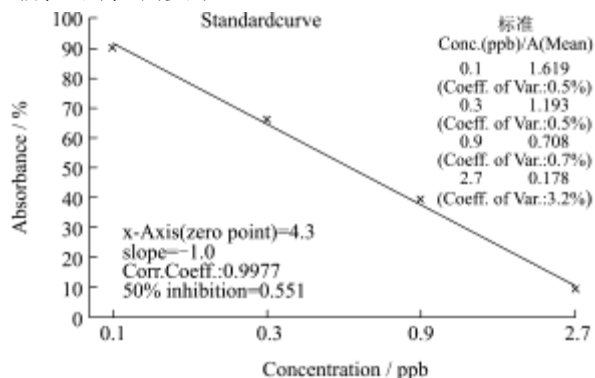


图 1 赭曲霉毒素 A 的标准曲线

Fig.1 Standard curve of OTA

2.1.2 各样品中赭曲霉毒素 A 含量的检测结果

对处理后的各个样品通过酶标仪进行 OD 值检测，并将所得数据通过酶联免疫试剂盒所提供的 RIDAWIN 软件进行数据分析，所得结果如表 2 所示。

由表 2 可知泸州老窖白酒生产各个过程样品 OTA 的含量：其中大曲样品 1、7 号中的含量为 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，入窖酒醅 2、8 号的含量为 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，丢糟 3、9 号的含量为 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，黄水 4、10 号的含量为 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，基酒 5、11 号和成品酒 6、12 号中 OTA 的含量均小于 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2 方法评价的实验结果

2.2.1 灵敏度检测

通过表 1 可以看出，OTA 工作浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时 OD 值分别为 1.798 和 1.619，差值大于 0.1，

此浓度可确定为本方法的灵敏度，因此本法对 OTA 的最低检出浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。由于在实际检测时标准品和样品的浓度都进行了 3 倍稀释，因此可以确定样品的实际检测浓度范围为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~8.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，并且可以得知基酒和成品酒中 OTA 的含量极低，低于该酶联免疫试剂盒的最低检测限。

表 2 各样品中赭曲霉毒素 A 的含量

Table 2 Contents of OTA in the samples

样品序号	吸光度平均值	百分吸光度/%	稀释倍数	实际浓度/ $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	0.921	53.9	3	1.6
2	0.899	52.6	3	1.7
3	0.847	49.6	3	1.9
4	0.793	46.4	3	2.1
5	1.642	96.1	3	*
6	1.646	96.4	3	*
7	0.96	56.2	3	1.4
8	0.918	53.7	3	1.6
9	0.881	51.6	3	1.7
10	0.819	48	3	2
11	1.645	96.3	3	*
12	1.66	97.2	3	*

2.2.2 精密度测定

在进行精密度实验时，分别选择工作浓度的标准品 3 号、4 号与同样 3 倍稀释的样品 1 号、4 号都进行 5 次测定，得到的实验结果如表 3 所示：

表 3 酶联免疫试剂盒的精密度分析

Table 3 Precision analysis of enzyme-linked immunosorbent assay kit

样品名	测定结果/ $\mu\text{g}/\text{kg}$					平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	标准差/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	相对标准偏差/%
C3	0.289	0.301	0.297	0.294	0.307	0.2976	0.006841	2.298
C4	0.903	0.895	0.914	0.889	0.897	0.8996	0.009476	1.497
1 号	1.564	1.613	1.573	1.632	1.497	1.5758	0.052199	3.344
4 号	2.043	1.995	2.159	2.112	2.067	2.066	0.068848	3.369

表 4 样品回收率实验结果

Table 4 Recovery rates of OTA in yellow water sample at different spiked amounts

样品名称	4 号黄水样品		
样品原含量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.066	2.066	2.066
标准添加量/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.3	0.9	2.7
检测值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.349	2.897	4.698
	2.357	2.952	4.747
	2.351	2.943	4.713
平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.352	2.931	4.719
回收率/%	95.3	95.7	98.3

由表 3 可知：酶联免疫试剂盒检测的相对标准偏差为 1.497~3.369%，精密度较好，说明该方法适用于白酒生产过程中各个样品的定量分析。

2.2.3 回收率实验

以 OTA 含量较高的 4 号黄水样品作为实验样品，实验样品浓度为 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，准确添加 OTA 标准溶液 0.3、0.9、2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度，每个浓度测定 3 次，按照实验测定方法进行检测，所得结果如表 4 所示。

由表 4 可以得知，样品加标测定的回收率在 95.3~98.3% 之间，平均回收率达到 96.4%，说明此方法用于测定白酒生产过程中样品的稳定性较好。

3 结论

3.1 本研究采用酶联免疫法检测了浓香型白酒生产各个环节中 OTA 的含量,此方法相对于高效液相色谱具有操作简便、快捷、安全无污染且检测成本低廉的特点。通过实验证实该方法用于检测浓香型白酒生产各个环节中 OTA 的检测灵敏度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相对标准偏差在 1.497~3.369%之间, 平均回收率达 97%, 说明该方法灵敏度高, 精确度和稳定性好, 因此可以在浓香型白酒生产过程 OTA 含量的检测中进行推广使用。

3.2 浓香型白酒在我国的白酒市场上占据着主导的位置, 保证其在生产过程中的安全性非常必要, 本实验对具有代表性的泸州老窖白酒生产过程中各个阶段样品的 OTA 含量进行了检测, 结果表明: 各个样品中 OTA 含量完全符合国内外食品行业中的限量要求^[9], 尤其是作为我国传统饮品的浓香型成品白酒中 OTA 含量极低, 低于 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。当然, 本实验所取样品虽具有代表性但并不全面, 并不能完全证明整个浓香型白酒行业中 OTA 的含量的安全性, 因此, 整个白酒行业的生产还需要规范化, 并且需要尽快建立健全白酒行业的安全准则, 为中国白酒行业的长盛不衰以及加快国际化进程奠定坚实的基础。

参考文献

[1] 时瑾,黄飏,孙蔚榕,等.ELISA 法检测赭曲霉毒素 A 的改进研究[J].食品科学,2007,28(8):425-428

- [2] 褚庆华,郭德华,王敏,等.谷物和酒类中赭曲霉毒素 A 的测定[J].中国国境卫生检疫杂志,2006,29(2):109-112,117
- [3] 丁建英,韩建众.赭曲霉毒素 A 的研究进展[J].食品研究与开发,2006,27(3):112-115
- [4] 许焯,马荣山,李军.高效液相色谱法测定酒中的赭曲霉毒素 A[J].酿酒,2006,33(2):40-42
- [5] 章英,许杨.谷物类食品中赭曲霉毒素 A 分析方法的研究进展[J].食品科学,2006,27(12):767-771
- [6] 谢春梅,王华.葡萄与葡萄酒中赭曲霉毒素 A 检测方法研究进展[J].酿酒科技,2007,153(3):92-96
- [7] 彭运平,齐维,唐海波,等.应用酶联免疫法检测鱼肉,蜂蜜中氯霉素的残留量[J].现代食品科技,2010,26(12):1414-1417
- [8] 梁迪思,李建生.酶联免疫法(ELISA)测定婴幼儿配方奶粉中的黄曲霉毒素 M1 方法改进[J].现代食品科技,2010,26(12):1421-1423
- [9] 杨明泉.酶联免疫分析在调味料安全质量检测中的应用[J].现代食品科技,2008,24(5):479-482
- [10] 黄树强,唐小波,陈丽萍,等.贵州湄窖人工老窖技术探索[J].酿酒科技,2012,8:63-64,67
- [11] 王文宗,康福建,李恒,等.酿酒丢糟转化为高蛋白饲料的研究[J].酿酒科技,2008,2:103-105
- [12] 王小军,敖宗华,沈才萍,等.浓香型大曲酒丢糟用于制曲的研究进展[J].酿酒科技,2011,8:104-106
- [13] GB/T23502-2009,食品中赭曲霉毒素 A 的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法[S].北京:中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局中国国家标准化管理委员会,2009