

“粮油真菌毒素控制与营养品质调控” 特约专栏文章之四

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.05.004

降解黄曲霉毒素 B₁ 土曲霉发酵工艺优化的研究

宁梦鸽, 谢岩黎✉, 孙淑敏, 马卫宾, 李 倩, 卫 敏, 何保山, 任文洁

(河南工业大学 粮油食品学院, 河南省粮油食品安全检测与控制重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘 要: 对黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)降解菌土曲霉 (*Aspergillus terreus*) HNGD-TM15 降解 AFB₁ 发酵工艺进行优化。在单因素实验基础上, 运用 Box-Behnken 设计原理, 对降解 AFB₁ 影响显著的 HNGD-TM15 发酵工艺参数碳源 (葡萄糖)、pH 和温度设计响应面实验, 结果表明: 模型 ($P=0.0028$) 在 1% 水平上具有极显著性, 失拟项不显著 ($P=0.0635>0.05$), 其 $R^2=0.9299$, $R^2_{Adj}=0.8399$, 说明该模型拟合程度良好, 可以模拟 92.99% 的 AFB₁ 降解率变化, 其中 pH 对 AFB₁ 降解率的影响最大。确定 HNGD-TM15 发酵主要参数: 葡萄糖 0.7%, 发酵液起始 pH 为 3.0, 发酵温度为 34 °C, 接种量为 0.006% 的菌悬液, 装液量为 100 mL/250 mL, 发酵时间为 72 h。优化后 AFB₁ 降解率从接种量为 5% 的 98.30% 提高到接种量为 0.006% 的 99.94%。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 发酵工艺; 优化; 响应面设计; 降解

中图分类号: TS209 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)05-0018-06

网络首发时间: 2020-08-21 08:42:17

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20200820.1346.008.html>

Study on Optimization of Fermentation Process of Aflatoxin B₁ Degradation by *Aspergillus terreus*

NING Meng-ge, XIE Yan-li✉, SUN Shu-min, MA Wei-bin, LI Qian, WEI-Min, HE Bao-shan, REN Wen-jie
(College of Cereals, Oils and Foods, Henan Key Laboratory of Cereals, Oils and Foods Safety Inspection and Control, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: The fermentation process of Aflatoxin B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁) degrading bacteria *Aspergillus terreus* HNGD-TM15 to degrade AFB₁ was optimized. Based on the single-factor experiment, the Box-Behnken design principle was used to design the response surface experiment for the HNGD-TM15 fermentation process parameters, including carbon source (glucose), pH and temperature, which can significantly affect the degradation of AFB₁. The results showed that the model ($P=0.0028$) was extremely significant at 1% level, and the lack-of-fit term is not significant ($P=0.0635>0.05$) with $R^2=0.9299$ and $R^2_{Adj}=0.8399$, indicating that the model fits well, and it can simulate 92.99% of AFB₁ degradation rate changes, in which pH has the greatest effect on the degradation rate of AFB₁. The fermentation parameters of HNGD-TM15 were determined as follows: glucose was 0.7%, the initial pH of the fermentation broth was 3.0, the fermentation temperature was 34 °C, the inoculation volume was 0.006% of the bacterial suspension,

收稿日期: 2020-07-05

基金项目: 河南省高校科技创新团队计划资助 (20IRTSTHN023); 河南省重点研发与推广专项 (192102310254)

作者简介: 宁梦鸽, 女, 1992 年出生, 在读硕士研究生, 研究方向为食品安全检测与控制。Email: nmgning@163.com.

通讯作者: 谢岩黎, 女, 1971 年出生, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为食品加工过程中安全及品质控制。Email: ylxie@haut.edu.cn.

and the filling volume was 100 mL/250 mL, fermentation time was 72 h. After optimization, the degradation rate of AFB₁ was increased from 98.30% with an inoculation volume of 5% to 99.94% with an inoculation volume of 0.006%.

Key words: aflatoxin B₁; fermentation process; optimization; response surface design; degradation

黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AFT) 是一组由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. nomius*、*A. parasiticus*、*A. tamarii*) 等多种真菌经过聚酮作用途径产生的次级代谢产物, 且包含多种衍生物, 目前已分离鉴定出 20 余种, 主要有黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂、P₁、Q₁、H₁、黄曲霉毒醇等。使用波长为 365 nm 的紫外光照射 AFT 时, AFB 发出蓝色 (Blue) 荧光, AFG 发出绿色 (Green) 荧光, AFM 是 AFB 在动物肝脏内经过羟化而衍生的代谢产物, 分泌到乳汁 (Milk) 中, 故而得名^[4-6]。其中黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 毒性最强、分布范围最广且化学性质最稳定, 双呋喃环上双键极易与 DNA 和 RNA 结合, 抑制蛋白质的合成, 从而抑制免疫机能, 也是致畸致癌致突变的主要功能基团^[7-8]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 和 IARC 人类致癌风险评价工作组分别将 AFB₁ 认定 IA 级危险物和 I 类致癌物, 对人和动物具有强烈的致癌性、致毒性、致突变性、抑制免疫力、肝损伤等毒害作用^[9-10]。

前期研究发现实验室保存的菌株土曲霉 (*Aspergillus terreus*) HNGD-TM15 具有降解 AFB₁ 的能力, 通过优化发酵工艺, 可提高其降解 AFB₁ 的能力, 主要包括培养基种类、培养基成分和发酵条件。培养基种类: 牛肉膏蛋白胨葡萄糖培养基、马铃薯葡萄糖培养基、葡萄糖蛋白胨培养基; 培养基成分: 碳源、氮源; 发酵条件: 接种量、装液量、起始 pH、温度, 并更好地了解其降解特性和分析降解机理。在单因素实验基础上, 运用 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 采用响应面设计, 对 HNGD-TM15 发酵条件进行优化, 以获得最佳发酵参数, 提高菌株 HNGD-TM15 降解 AFB₁ 的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株土曲霉 HNGD-TM15 (*Aspergillus terreus*):

实验室保存。

AFB₁ 标准品: 美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈: 色谱级, 天津市四友精细化学品有限公司。

Agilent 1260 高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司。

种子培养基 (L⁻¹): 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, pH 7.0。

发酵培养基 1 (L⁻¹): 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 6 g 葡萄糖, 5 g NaCl, pH 7.0。

发酵培养基 2 (马铃薯葡萄糖培养基, 简称 PDB) (L⁻¹): 200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, pH 自然。

发酵培养基 3 (L⁻¹): 20 g 葡萄糖, 10 g 蛋白胨, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 AFB₁ 检测

AFB₁ 检测方法参考文献^[11-12]。反应结束后, 取反应体系 1 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 3 mL 的二氯甲烷涡旋震荡萃取 60 s, 将水层取出弃去, 将二氯甲烷层置于氮吹仪中, 35 °C 下氮气缓慢吹干, 用 0.5 mL 流动相 (水: 甲醇: 乙腈=6: 2: 2) 溶解残余物 (浓缩一倍), 涡旋震荡 60 s, 0.22 μm 有机相滤膜过滤, 混匀进样。

液相色谱条件如下: 色谱柱为 Agilent Proshell120 (4.6 μm × 150 mm, 4 μm), 流动相为水: 乙腈: 甲醇=60: 20: 20 (V/V/V), 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min, 进样量: 20 μL。检测器: 荧光检测器, 激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm。

AFB₁ 降解率的计算方法如下公式^[13-14]:

降解率=

$$\frac{\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量} - \text{实验组 AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量}} \times 100\%$$

1.2.2 发酵工艺的优化

1.2.2.1 不同葡萄糖添加量对 AFB₁ 降解率的影响 在前期培养基种类、碳源、氮源、接种量、

装液量、初始 pH、发酵温度、发酵时间等单因素优化的基础上（如图 1 所示）选出对 AFB₁ 降解率影响显著的因素为碳源、初始 pH 和发酵温度，

以下对着三个因素进行详细描述。首先对最佳碳源葡萄糖的添加量进行优化，其添加量梯度设为：0.3%、0.5%、0.7%、1.0%、1.3%和 1.5%。

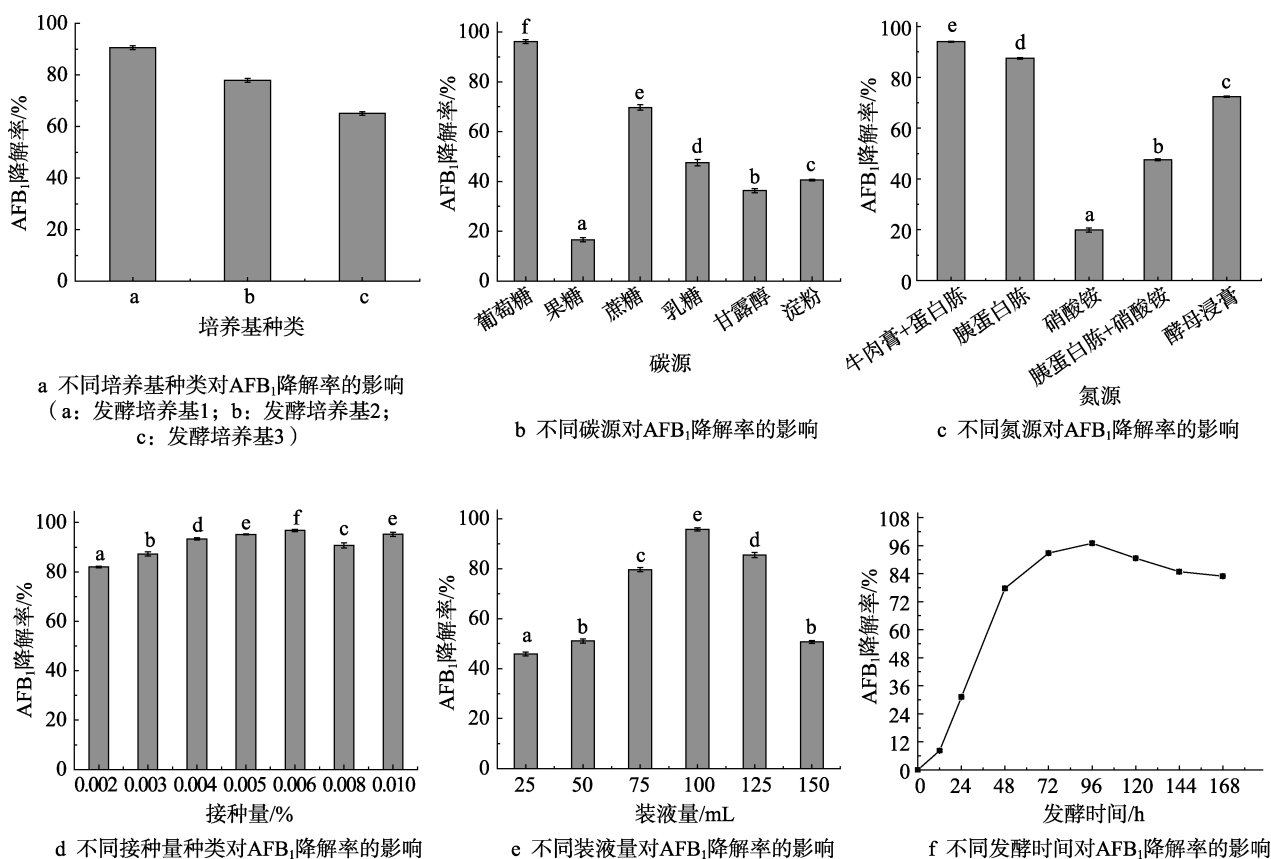


图 1 不同因素对 AFB₁ 降解率的影响

1.2.2.2 不同发酵温度对 AFB₁ 降解率的影响
温度设为 25、30、35、40、45、50 °C，菌悬液接种量为 0.006%，于 37 °C 下发酵 72 h，其它条件参照 1.2.2。

1.2.2.3 发酵液不同初始 pH 对 AFB₁ 降解率的影响
发酵培养基起始 pH 值设为 2、3、4、5、6、7、8，菌悬液接种量为 0.006%，于 37 °C 下发酵 72 h，其它条件参照 1.2.2。

1.2.3 发酵工艺的响应面优化设计

根据单因素实验的结果，在 Design-Expert 8.0 软件中，运用 Box-Behnken 设计原理，以葡萄糖（A）、pH（B）和温度（C）设计响应面实验，以 AFB₁ 降解率为响应值，对发酵条件进行最优化分析，并验证此条件下的 AFB₁ 降解率，同时反映不同条件间的交互作用。各因素及变量水平见表 1。

表 1 响应面设计的各因素及变量水平
Table 1 Various factors and variable levels of response surface design

因素	变量水平		
	-1	0	1
A 葡萄糖/%	0.6	0.7	0.8
B pH	2.5	3.0	3.5
C 温度/°C	32.5	35.0	37.5

2 结果与讨论

2.1 发酵工艺单因素分析

由图 1 可知，在单因素优化实验中，最佳碳源为葡萄糖，最佳氮源为（牛肉膏+蛋白胨）0.3%，发酵液起始 pH 为 3.0，发酵温度为 34 °C，接种量为 0.006% 的菌悬液，装液量为 100 mL/250 mL，发酵时间为 72 h。以下对三个影响显著的因素（碳源、pH 和发酵温度进行单独描述。首先对最佳碳源葡萄糖添加量进行优化。

2.1.1 不同葡萄糖添加量对 AFB₁ 降解率的影响

在发酵过程中,碳源不仅为微生物生长、繁殖、代谢提供所需能量,还可以在在一定程度上诱导菌体产酶。在发酵过程中不同的碳源会影响微生物的生长、酶活性和产酶量,即使同一种碳源不同浓度对菌体形态和所需产物产量也会有很大影响。所以说碳源的选择和其用量的确定对微生物发酵的代谢产物的量的多少有一定的关系^[15]。前期的研究表明对于菌株 HNGD-TM15,采用葡萄糖作为碳源时降解率最高,达到 96.13%。由图 2 可知,当葡萄糖的添加量为 0.7%,发酵液对 AFB₁ 的降解率最高,达到了 99.19%。

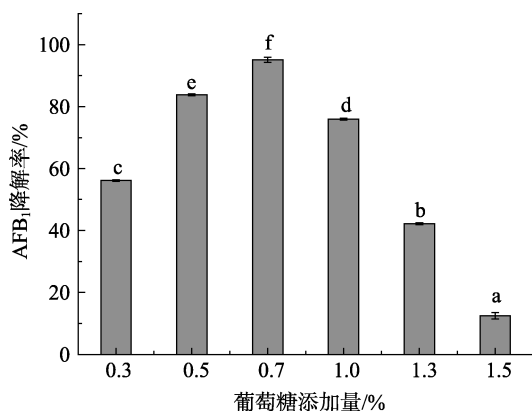


图 2 不同葡萄糖添加量对 AFB₁ 降解率的影响

2.1.2 不同发酵温度对 AFB₁ 降解率的影响

温度是影响微生物生长繁殖的重要环境因素之一。温度通过影响微生物细胞膜的液晶结构、酶和蛋白质的合成和活性、RNA 结构及转录等影响微生物的生命活动。每种微生物基本上都有一个适应温度范围,过高或过低的温度都会对微生物的生长繁殖造成不利的影响。当温度低于最低生长温度时,微生物的生长停止。超过了微生物生长的最高温度会引起细胞内的蛋白质凝固,使酶变性失活,代谢停滞而死亡。在发酵过程中,温度影响微生物细胞的生长和代谢产物的合成量,因此,需要找出发酵的最适温度,不仅能够促进微生物的生长和繁殖,也能较大程度上促进所需代谢产物的合成^[16]。如图 3 所示,HNGD-TM15 在温度为 35 °C 时,AFB₁ 降解率最高达到了 99.19%。

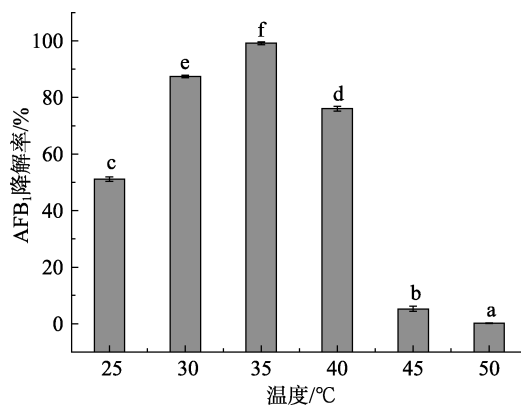


图 3 不同发酵温度对 AFB₁ 降解率的影响

2.1.3 不同初始 pH 对 AFB₁ 降解率的影响

发酵过程中酸碱度对微生物的生命活动有很大影响^[17]。一般来讲,每种微生物的生长都有一个最适生长 pH 范围,不同种类的微生物对环境 pH 适应的范围不同,即使同一种微生物在不同的生长阶段、不同的生理生化过程中,也有不同的最适 pH 值要求。pH 对微生物生长的影响是多方面的,pH 通过引起细胞膜电荷变化、改变营养物质离子化程度,来影响微生物对营养物质的吸收。其次,还可以通过改变培养基中有机物的离子化程度,改变某些化合物分子进入细胞的状态,从而促进或者抑制微生物的生长。除此之外,pH 还对一些生物合成途径有着显著影响,因此,对于同一微生物,pH 不同,形成的发酵产物也会不同。如图 4 所示,菌株 HNGD-TM15 在发酵液起始 pH 为 3 时,AFB₁ 降解率最高,达到了 99.59%。

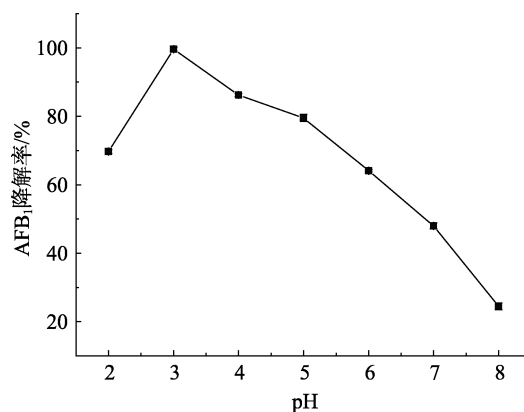


图 4 不同初始 pH 对 AFB₁ 降解率的影响

2.2 发酵工艺响应面分析

2.2.1 发酵工艺响应面结果

在单因素考察的基础上,以葡萄糖(A)、pH

(B) 和温度 (C) 为自变量, AFB₁ 降解率 (R) 为响应值, 响应面分析实验设置为三因素三水平。应用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 数据进行拟合, 回归方程如下:

$$Y=99.87+4.09A+0.0025B+2.28+0.61AB-0.89AC-0.51BC-6.70A^2-1.95B^2-1.88C^2$$

表 2 响应面设计和各实验结果
Table 2 Response surface design and experimental results

序号	A	B	C	R/%
1	-1	-1	0	90.08
2	1	-1	0	95.46
3	-1	1	0	85.76
4	1	1	0	93.58
5	-1	0	-1	83.31
6	1	0	-1	93.88
7	-1	0	1	90.51
8	1	0	1	98.52
9	0	-1	-1	92.63
10	0	1	-1	96.77
11	0	-1	1	96.35
12	0	1	1	98.43
13	0	0	0	99.86
14	0	0	0	99.86
15	0	0	0	99.86
16	0	0	0	99.86
17	0	0	0	99.86

由表 3 的方差分析结果可知, 模型 ($P=0.0028$) 在 1% 水平上具有极显著性, 失拟项不显著 ($P=0.0635>0.05$), 其 $R^2=0.9299$, $R^2_{Adj}=0.8399$, 说明该模型拟合程度良好, 可以模拟 92.99% 的 AFB₁ 降解率变化。各因素对降解率的影响顺序为 $B>A>C$, 即 $pH>$ 葡萄糖添加量 $>$ 温度。

2.2.2 响应面的分析

响应面分析是将体系相应建立成一个或多个因素的函数, 运用图形技术将这种函数关系显示出来, 以供凭借直观的观察来选择实验设计中的最优化条件^[18]。根据回归方程所得出的响应面图, 即可对任何两因素交互作用进行分析和评价, 由图 5 可以直观看出影响因素与响应面之间的关系, 即曲线越陡峭, 在该因素对 AFB₁ 降解率的影响越大。图 4a~c 反映了各因素交互作用对 AFB₁ 降解率的影响, 可以

表 3 回归模型方差分析及显著性检验
Table 3 Regression model analysis of variance and significance test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
总模型	416.41	9	46.27	10.32	0.0028
A	134.15	1	134.15	29.94	0.0009
B	0.00005	1	0.00005	0.0000116	0.9974
C	41.68	1	41.68	9.30	0.0186
AB	1.49	1	1.49	0.33	0.5825
AC	3.13	1	3.13	0.70	0.4307
BC	1.06	1	1.06	0.24	0.6414
A ²	189.01	1	189.01	42.18	0.0003
B ²	16.01	1	16.01	3.57	0.1007
C ²	14.80	1	14.80	3.30	0.1120
残差项	31.37	7	4.48		
失拟项	25.85	3	8.61	5.37	0.0635
误差项	5.51	4	1.38		
总和	447.78	16			
$R^2=0.9299$ $AdjR^2=0.8399$					

注: $P<0.05$ 差异显著; $P<0.01$ 差异极显著

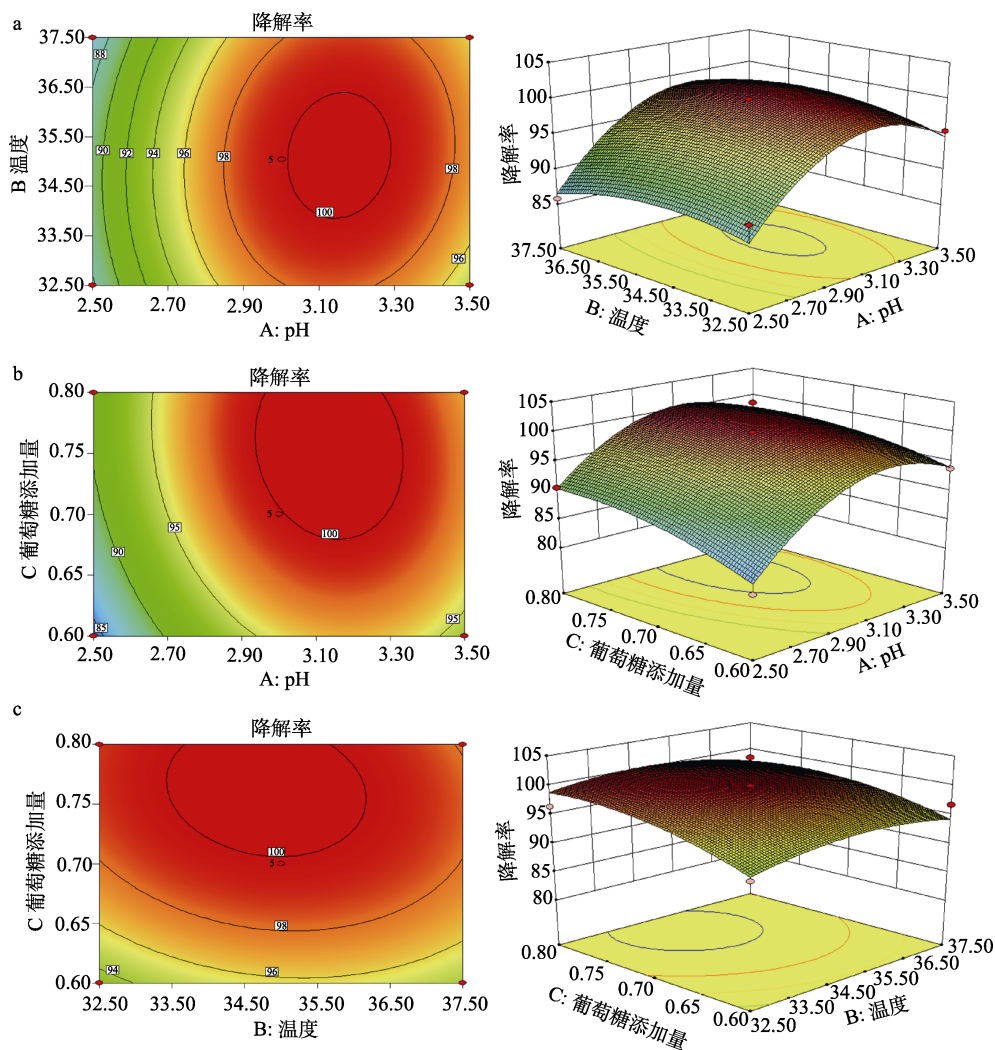
看出因素 A (pH) 对响应值的影响最大, 表现为曲线陡峭, 因素 C (葡萄糖) 和因素 B (温度) 次之, 因素 B 表现的曲线最为平滑, 这与方差分析中的结果一致。

2.2.3 最优培养基配方的确定

使用 Desgin Expert 8 软件对回归方程进行分析, 得到最佳降解条件为: $pH=3.19$ 、温度为 $36.51\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、葡萄糖为 0.71% , 预测菌株 HNGD-TM15 对 AFB₁ 降解率最高可达 99.96% , 为验证模型预测的准确性, 在采用上述最佳培养基配方, 3 次平行实验得到的实际 AFB₁ 降解率分别为 99.95% 、 99.99% 、 99.89% , 平均降解率为 99.94% , 说明该模型能够较好地预测实际情况。

3 结论

HNGD-TM15 降解 AFB₁ 发酵工艺优化参数: 碳源为 0.7% , 氮源为 (牛肉膏+蛋白胨) 0.3% , 发酵液起始 pH 为 3.0 , 发酵温度为 $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, 接种量为 0.006% 的菌悬液, 装液量为 $100\text{ mL}/250\text{ mL}$, 发酵时间为 72 h 。优化后 AFB₁ 降解率从接种量为 5% 的 98.30% 提高到接种量为 0.006% 的 99.94% , 优化效果明显。

图 5 各因素交互作用对 AFB₁ 降解率的影响的响应面图

参考文献:

- [1] DORNER J W. Simultaneous quantitation of *Aspergillus flavus*/*A. parasiticus* and aflatoxins in peanuts[J]. *Journal of AOAC International*, 2002, 85(4): 911-916.
- [2] KURTZMAN C P, HORN B W, HESSELTINE C W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1987, 53(3): 147-158.
- [3] AMAIKE S, KELLER N P. *Aspergillus flavus*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49(49): 107-133.
- [4] 马良. 黄曲霉毒素 B₁ 高灵敏度检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2007.
- [5] 陆建华, 陆卫中, 陈建国. 黄曲霉毒素检测方法及其应用[J]. *中华医学实践杂志*, 2005, 4(3): 210-212.
- [6] 刘雪芬. 基于环糊精的黄曲霉毒素 B₁ 荧光增敏检测技术研究[D]. 中国农业科学院, 2011.
- [7] NUNEZ O, HENDRICKS J D, FONG A T. Inter-relationships among aflatoxin B₁ (AFB₁) metabolism, DNA-binding, cytotoxicity, and hepatocarcinogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1990, 9(1): 15-23.
- [8] DENISSENKO M F, CAHILL J, KOUDRIAKOVA T B, et al. Quantitation and mapping of Aflatoxin B₁-induced DNA damage in genomic DNA using Aflatoxin B₁-8,9-epoxide and microsomal activation systems[J]. *Mutation Research*, 1999, 425(2): 205-211.
- [9] MOSS M O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs, F, 2002[C]. Elsevier Ltd: 137-142.
- [10] 马卫宾, 张迪, 谢岩黎, 等. 天然食用香料草莓酸对黄曲霉的抑菌作用研究[J]. *粮油食品科技*, 2020, 28(5): 1-6. <https://doi.org/10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.05.002>. (网络首发).
- [11] 张盼. 生物法降解黄曲霉毒素 B₁ 的初步研究[D]. 中国农业科学院, 2015.
- [12] 李超波. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的分离鉴定及其降解特性[D]. 南昌大学, 2012.
- [13] 王威, 谢岩黎. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及鉴定[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(17): 118-121+127.
- [14] 宋娟娟, 谢岩黎, 王威. 细菌 M19 培养条件对降解黄曲霉毒素 B₁ 的影响[J]. *食品科技*, 2018, 43(7): 6-11.
- [15] 陈乾坤. 大型水生植物发酵液应用于反硝化脱氮研究[D]. 南京大学, 2014.
- [16] 尹洪祥. 培养温度对某些微生物的生长与培养特性的影响[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 1981, (1).
- [17] 陈燕飞. pH 对微生物的影响[J]. *太原师范学院学报(自然科学版)*, 2009, 8(3): 121-124+131.
- [18] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. *实验室研究与探索*, 2015, 34(8): 41-45. 

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.journal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。

(审核: 伍松陵)