

新型黑曲霉液体发酵及对黄曲霉毒素 B₁ 的脱除

张晓雪¹, 孙秀兰^{*1}, 张银志²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对经紫外照射诱变制备的新型黑曲霉 FS-UV1 在马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中的 pH、蛋白质质量浓度、蛋白酶活性变化以及脱除机制进行了研究。在发酵过程中, pH 值不断下降, 由初始 pH 5.9 下降为 1.83。蛋白质质量浓度在发酵 48 h 后达到最大, 为 10.07 g/L, 而酸性蛋白酶活性则在 72 h 达到最高, 为 0.98 U/mL。新型黑曲霉 FS-UV1 孢子悬液对 AFB₁ 无脱除效果, 而菌丝体对 AFB₁ 具有吸附作用, 发酵液则对 AFB₁ 具有降解作用, 其中发挥降解作用的可能是蛋白质。对 FS-UV1 在 pH 7 的模拟肠道环境中脱除黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 的效果进行了评价。脱除 48 h 时, 在 pH 7 的模拟肠道环境中对 AFB₁ 的脱除率为 87.3%。

关键词: 新型黑曲霉; 紫外诱变; AFB₁; 生物脱除

中图分类号: TS 201.3 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)03-0266-05

AFB₁ Decontamination and Fermentation of the Novel *Aspergillus niger* FS-UV1

ZHANG Xiaoxue¹, SUN Xiulan^{*1}, ZHANG Yinzh²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the changes in pH, protein, protease activity and the degradation mechanism of the new *Aspergillus Niger* FS - UV1 which was induced by ultraviolet irradiation in potato glucose liquid medium (PDB) were studied. It is found that the pH value is declining in fermentation process, which dropped from the initial 5.9 to 1.83. The protein content showed the maximum of 10.07 g/L at 48 h, and protein activity reached the highest at 72 h with 0.98 U/ mL. The experimental results showed that AFB₁ could be decontaminated by mycelium and culture filtrate, and the spores had effect on AFB₁. In addition, FS - UV1 degraded aflatoxin B₁ (AFB₁) effect was evaluated in simulation intestinal environment of pH= 7 and the degradation rate was 87.3%.

Keywords: novel *Aspergillus niger*, ultraviolet irradiation, AFB₁, biodegradation

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB720804)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976—), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全监测方面的研究。

Email: sxlzz@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张晓雪, 孙秀兰, 张银志. 新型黑曲霉液体发酵及对黄曲霉毒素 B₁ 的脱除[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(03): 266-270.

霉菌及其产生的毒素对食品及动物饲料的污染已然成为现今不可忽视的世界性难题,而霉菌所产生的次级代谢产物即毒素会引起动物体重减轻,影响肝脏肾功能,免疫抑制等严重疾病甚至死亡。而黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁ 简称为 AFB₁)作为公认毒性最强的毒素会引发肝癌及遗传毒性^[1-2]。近年来,物理、化学、生物脱除毒素方法成为主要的脱毒方式^[3-5]。而生物脱除方法因其与物理、化学方法相比脱除条件相对比较温和,不易对食品等原材料的营养成分及风味产生变化和友好型等优点受到关注与推崇。研究表明,某些真菌及细菌甚至生物碱能够有效抑制黄曲霉毒素 B₁ 的产生并对其具有降解作用,其中包括平菇、枯草芽孢杆菌、某些药用真菌等^[6-8],而这些真菌对 AFB₁ 的脱除机制与它们在发酵过程中产生的胞外酶密切相关,研究发现,某些胞外酶可以破坏 AFB₁ 结构中的双呋喃环从而改变 AFB₁ 的荧光性质及毒性,并且已有研究人员成功纯化获得了胞外酶^[9]。黑曲霉作为能够有效抑制黄曲霉毒素的产生及降解 AFB₁ 的微生物,已被报道并受到广泛关注^[10]。作者对诱变获得的新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基中 pH 等指标的变化进行了研究,并对其降解 AFB₁ 的效果进行了评价。早期为了研究对毒素的脱除效果所进行的体外试验大多是在中性环境下进行的,但考虑到实际应用中肠道环境的复杂性及方法的简便性,模拟肠道成了一种既简便又能最大程度上还原实际肠道环境的有效方法。作者使用模拟肠道来评价新型黑曲霉 FS-UV1 对 AFB₁ 的脱除效果,不仅为后期的体内动物实验提供了参考,还为实际应用的可行性提供了可靠的数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新型黑曲霉菌株 FS-UV1: 保藏于武汉微生物保藏中心, 编号 CCTCC M2013553; AFB₁ 标准品: Sigma 公司; 乙腈: 质谱纯, 美国 TEDIA 公司。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基): 马铃薯 300 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20g、氯霉素 0.1 g、蒸馏水 1 L, 自然 pH, 121 °C 高压灭菌 15 min。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB 培养基): 马铃薯 300 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L、自然 pH, 121 °C 高压灭菌 15 min。计数培养基: 胰蛋白胨 5.0 g, 酵母浸膏 2.5 g, 葡萄糖 1.0

g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L, pH(7.0±0.2), 121 °C 高压灭菌 15 min。

1.2 设备

DGG-9123AD 电热恒温鼓风干燥箱: 上海森信实验仪器有限公司; LS-B50L 立式圆形压力蒸汽灭菌器: 上海医用核子仪器厂; SW-CJ-1D 洁净工作台: 苏州净化设备厂生产; MJ-180B 霉菌培养箱: 上海跃进医疗器械厂; AB204-N 电子天平: 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司; 安捷伦 1100 高效液相色谱系统: 美国安捷伦公司; PB-10/C 标准型 PH 计: 上海精密仪器有限公司; WFH-203B 三用紫外分析仪: 上海精科实业有限公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 新型黑曲霉 FS-UV1 的液体发酵 将 PDA 斜面上黑曲霉菌株点接到固体平板中央, 进行菌体活化, 30 °C 恒温培养箱培养 5 d, 取出放于 4 °C 冰箱保存备用。用适量的生理盐水洗脱斜面培养基中的孢子, 在预先灭菌的带玻璃珠的三角瓶中充分摇匀, 并用灭菌的脱脂棉过滤以除去菌丝, 稀释成 5×10⁶ 个/mL 孢子悬液。将上述菌悬液接种到种子培养基中, 30 °C、150 r/min 霉菌培养箱中培养至直径为 2 mm 左右的菌丝球出现, 并按照 10% 的接种体积分数接种至 5 L 发酵罐发酵 48 h。

1.3.2 发酵过程中 pH 的测定 测定灭菌后 PDB 培养基的 pH, 并在发酵过程中每隔 6 h 取样 15 mL, 测定发酵液中 pH 值, 记录发酵过程中的 pH 值的变化。

1.3.3 发酵过程中蛋白质质量分数的测定 测定灭菌后 PDB 培养基的蛋白质质量分数, 并在发酵过程中每隔 6 h 取样 15 mL, 考马斯亮蓝法测定发酵液中蛋白质质量分数, 记录比较发酵过程中的蛋白质质量分数的变化。

1.3.4 发酵过程中酸性蛋白酶活性的测定 测定灭菌后 PDB 培养基的酸性蛋白酶活性, 并在发酵过程中每隔 6 h 取样 15 mL, 根据 GB/T23527-2009 测定发酵液中酸性蛋白酶活性, 记录比较发酵过程中的酸性蛋白酶活性的变化。蛋白酶活性(活力)为 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 即为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

1.3.5 新型黑曲霉 FS-UV1 在模拟肠道中对 AFB₁ 的脱除效果 准确称取 KH₂PO₄ (6.805 g) NaOH (0.896 g) 溶解于 1 L 去离子水中, 并调节 pH 为

7±0.2^[11]。取 10 mL pH (7±0.2) 的肠道模拟液, 向其中加入等体积的新型黑曲霉 FS-UV1 48 h 发酵液, 然后加入 AFB₁ 标准液使其终质量浓度为 8.0 μg/mL, 测定不同降解时间新型黑曲霉 FS-UV1 对 AFB₁ 的脱除率。

1.3.6 新型黑曲霉 FS-UV1 脱除机制研究 向无菌试管中分别加入方法 1.3.1 制备的孢子悬液 9 mL, 之后向试管中加入 1 mL AFB₁ 使其终质量浓度为 0.5 μg/g, 混匀后于 30 °C、150 r/min 避光反应 48 h, 测定 AFB₁ 脱除率。取发酵 48 h 的发酵液纱布过滤后获得菌丝体, 并将其分为以下两组: 121 °C 处理 20 min 和未做处理。两组的菌丝体于无菌试管中, 各加入 10 mL 生理盐水-AFB₁ (终浓度为 0.5 μg/g) 溶液悬浮起来, 摇匀后于 30 °C、150 r/min 避光反应 48 h, 测定 AFB₁ 的脱除率。将上述过滤获得的发酵液并将其分为以下两组: 硫酸铵沉淀处理和未处理组; 加入 AFB₁ (质量浓度为 0.5 μg/g) 混匀后于 30 °C、150 r/min 避光反应 48 h, 测定 AFB₁ 脱除率^[5]。

1.3.7 AFB₁ 的提取与测定 吸取 1 mL 滤液, 用 3 倍体积的氯仿提取滤液中 AFB₁, 静置分层, 收集氯仿层, 氮气吹干, 加入 100 μL 三氟乙酸和 200 μL 正己烷, 混匀后于 40 °C 避光反应 15 min, 再次氮气吹干, 1 mL 流动相 (乙腈:水=20:80) 溶解 AFB₁ 的衍生物, 0.22 μm 膜过滤, 保存于棕色瓶, 待测。高效液相色谱检测条件参考文献^[12]测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 新型黑曲霉 FS-UV1 的液体发酵过程中 pH 的变化

新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基发酵过程中 pH 的变化见图 1。pH 由初始培养基中的 pH 5.9 下降为 1.83 并趋于平衡。发酵过程中 pH 值的变化是微生物代谢反应的综合结果, pH 与培养基的组成及微生物的代谢途径均有着密切的关系。pH 的下降可能是由菌体对培养基中糖的利用并产生有机酸造成的; 而在发酵后期菌体发生自溶 pH 会随之下降, 与此同时菌体蛋白酶的活跃致使 pH 值又呈上升趋势, 二者综合作用致使总的 pH 值没有发生明显的变化并趋于平衡^[13]。

2.2 新型黑曲霉 FS-UV1 的液体发酵过程中蛋白质质量浓度的变化

图 2 中显示了新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培

养基发酵过程中蛋白质质量浓度的变化。发酵液中的蛋白质质量浓度在 48 h 时达到最大, 为 10.07 g/L, 之后蛋白质质量浓度呈现下降趋势并在 72 h 趋于平衡^[14-15]。蛋白质质量浓度变化与脱除率的关系见图 2。可以看出, 当蛋白质质量浓度达到最高时, 脱除率也达到最大, 可知蛋白质与脱除率密切相关。

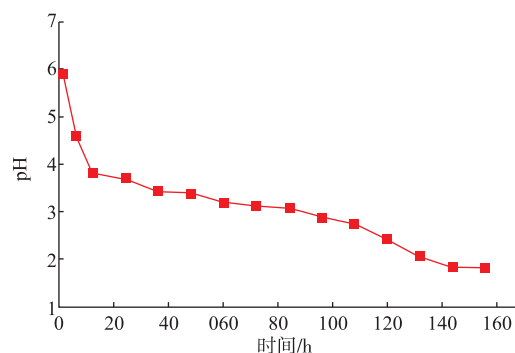


图 1 新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基发酵过程中 pH 的变化

Fig. 1 pH change during the permentation of the new *Aspergillus niger* FS-UV1 in PDB medium

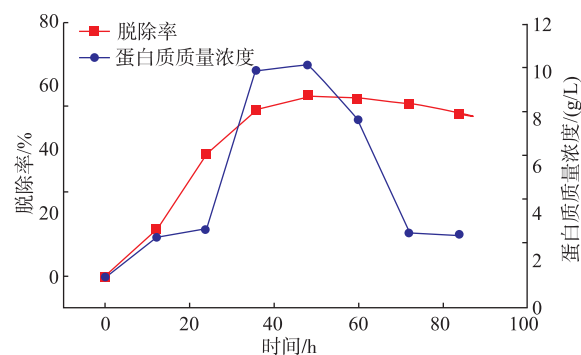


图 2 新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基发酵过程中蛋白质质量浓度变化及对 AFB₁ 的脱除效果

Fig. 2 Protein content change and AFB₁ removal effect during the permentation of the new *Aspergillus niger* FS-UV1 in PDB medium

2.3 新型黑曲霉 FS-UV1 的液体发酵过程中酸性蛋白酶活性的变化

图 3 所示为新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基发酵过程中酸性蛋白酶活性的变化。酸性蛋白酶活性在 72 h 时达到最大, 为 0.98 U/mL, 并在 144 h 趋于平衡。

2.4 新型黑曲霉 FS-UV1 在模拟肠道中对 AFB₁ 的脱除效果

结果表明: 新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基中发酵 48 h 后, 对 AFB₁ 的脱除效果见图 4。新型黑

曲霉 FS-UV1 对 AFB₁ 的脱除率随着时间的延长而升高,并在 48 h 达到 87.3%,见图 4。

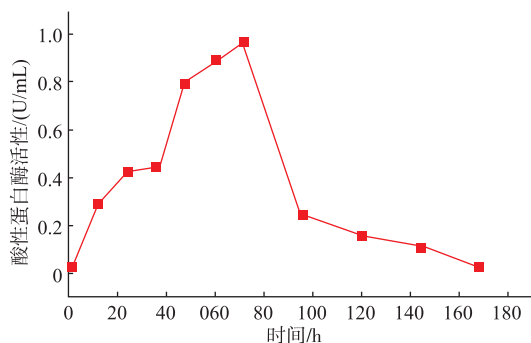


图 3 新型黑曲霉 FS-UV1 在 PDB 培养基发酵过程中酸性蛋白酶活性的变化

Fig. 3 Acid protease activity change during the fermentation of the new *Aspergillus niger* FS-UV1 in PDB medium

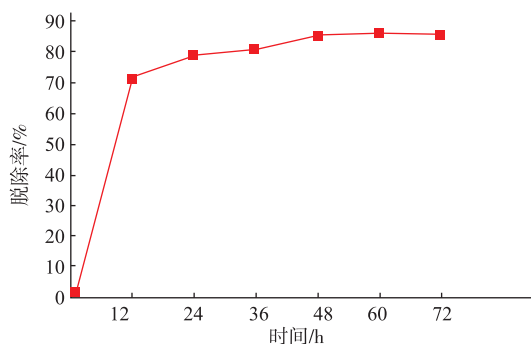


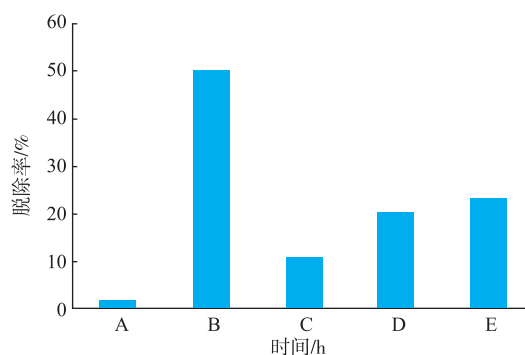
图 4 新型黑曲霉 FS-UV1 在模拟肠道中不同降解时间对 AFB₁ 的脱除效果

Fig. 4 AFB₁ removal effect of the new *Aspergillus niger* FS-UV1 by different times in simulated intestinal tract

2.5 新型黑曲霉 FS-UV1 对 AFB₁ 脱除机制研究

为了研究 FS-UV1 对 AFB₁ 的脱毒作用机制,分别对孢子悬液、菌丝体、发酵液对 AFB₁ 的脱毒作用进行了研究^[16-17],结果见图 5。其中孢子悬液对 AFB₁ 几乎没有脱除作用,而菌丝体及发酵液可有效的脱除 AFB₁,脱除率分别达到 20.01%、50.1%;而在

热处理前后菌丝体对 AFB₁ 的脱除能力未发生显著变化,说明菌丝体是通过物理吸附达到对 AFB₁ 的脱除,而发酵液在经过硫酸铵沉淀后对 AFB₁ 的脱除能力发生了显著性变化,由 50.1%下降到 10.9%,说明发酵液中发挥脱毒作用的很可能是蛋白质。



A:孢子悬液 B:发酵液 C:硫酸铵沉淀后发酵液 D:菌丝体 E:热处理后菌丝体

图 5 新型黑曲霉 FS-UV1 孢子、发酵液及菌丝体对 AFB₁ 的脱毒效果比较

Fig. 5 Comparison of AFB₁ removal effect by the new *Aspergillus niger* FS-UV1 spore, fermentation broth and mycelium

3 结语

1)在发酵过程中,pH 值不断下降,由初始 pH 5.9 下降为 1.83。蛋白质质量浓度在发酵 48 h 达到最大,为 10.07 g/L;而酸性蛋白酶活性则在 72 h 达到最高,为 0.98 U/mL。新型黑曲霉 FS-UV1 发酵过程中 pH、蛋白质量浓度及酸性蛋白酶活性的变化对后期研究提取发酵液中胞外酶的条件提供了参考数据。

2)脱除时间为 48 h 时,在 pH 7 的模拟肠道环境中对 AFB₁ 的脱除率为 87.3%。

3)FS-UV1 孢子悬液对 AFB₁ 无脱除效果,而菌丝体对 AFB₁ 具有吸附作用,发酵液则对 AFB₁ 具有降解作用,其中发挥降解作用的可能是蛋白质。

参考文献:

[1] MENDEZ-ALBORES A, DEL Rio-Garcia J, MORENO-MARTINEZ E, et al. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135: 249-262.

[2] NEEFF D V, LEDOUX D R, ROTTINGHAUS G E, et al. In vitro and in vivo efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B-1[J]. *Poultry Science*, 2013, 92:

131-137.

- [3] TENIOLA O D, ADDO P A, BROST I M, et al. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556T[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2005, 105: 111-117.
- [4] CHENG Ji, ZHAO Lihong. The outlook and research of biodegradation of AFB₁[J]. **Journal of Animal Nutrition**, 2010, 22: 241-245. (in Chinese)
- [5] LI Bing, DONG Zhengying, CHANG Weishan. The degradation and application of AFB₁ by *Aspergillus niger* [J]. **Journal of Feed Exposition**, 2013, 6-10. (in Chinese)
- [6] MOTOMURA M, TOYOMASU T, MIZUNO K, et al. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*[J]. **Microbiological Research**, 2003, 158: 237-242.
- [7] WESENBERG D, KYRIAKIDES I, AGATHOS S N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents[J]. **Biotechnology Advances**, 2003, 22: 161-187.
- [8] ZHAO L H, GUAN S, GAO X, et al. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2011, 110: 147-155.
- [9] ALBERTS J F, GELDERBLOM W C A, BOTHA A, et al. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2009, 135: 47-52.
- [10] XU D, WANG H, ZHANG Y, et al. Inhibition of non-toxicogenic *Aspergillus niger* FS10 isolated from Chinese fermented soybean on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*[J]. **Food Control**, 2013, 32: 359-365.
- [11] THIEU N Q, PETTERSSON H. In vitro evaluation of the capacity of zeolite and bentonite to adsorb aflatoxin B1 in simulated gastrointestinal fluids[J]. **Mycotoxin Research**, 2008, 24: 124-129.
- [12] XU Dan, SUN Xiulan. Inhibition of non-toxicogenic *Aspergillus niger* FS10 isolated from Chinese fermented soybean on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*[J]. **Journal of China Microecology**, 2011, 23: 490-492. (in Chinese)
- [13] LIU Min, OUYANG Jia, YONG Qiang, et al. The preparation of β -glucosidase by fermentation of the *Aspergillus niger* [J]. **Journal of Engineering of Biology and Chemistry**, 2008(5): 5-8. (in Chinese)
- [14] LI Ping, WAN Xiaochun, TAO Wenxi, et al. High yield β -glucosidase of *Aspergillus niger* by compound mutation[J]. **Journal of System of Bacteria**, 2000, 19(1): 117-121. (in Chinese)
- [15] CHEN Xiwei. The discussion of influence in fermentation and regulation control of citric acid by pH[J]. **Journal of Technology of Modern Agriculture**, 2009(5): 11-12, 15. (in Chinese)
- [16] MCLEAN M, DUTTON M F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update[J]. **Pharmacology & Therapeutics**, 1995, 65: 163-192.
- [17] PELTONEN K, EL-NEZAMI H, HASKARD C, et al. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. **Journal of Dairy Science**, 2001, 84: 2152-2156.