

黑曲霉降解黄曲霉毒素 B₁ 的研究及转录组分析

杨 阳^{1,2}, 邱天宇¹, 袁 晓³, 孙嘉笛¹, 张银志¹, 孙秀兰^{*1}, 纪 剑¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 新疆农业大学 食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

3. 广州广电计量检测股份有限公司, 广东 广州 510627)

摘要: 为探究黑曲霉 FS10 对 AFB₁ 的降解机制, 使用黑曲霉 FS10 的不同组分(菌悬液、发酵液、孢子、菌丝体)对 AFB₁ 进行降解, 并研究了 AFB₁ 刺激对黑曲霉 FS10 降解效果的影响; 利用扫描电子显微镜观察降解过程中黑曲霉菌丝体的形态变化; 用转录组学技术探究 AFB₁ 可能的降解机理。结果表明: 黑曲霉 FS10 能有效降解 AFB₁, 72 h 时菌悬液的对 AFB₁ 脱除率高达 98.65%; 黑曲霉 FS10 孢子对 AFB₁ 无明显脱除作用, 但菌丝体对 AFB₁ 有一定的吸附能力, 发酵液对 AFB₁ 有明显脱除效果; 经过 AFB₁ 诱导刺激后黑曲霉 FS10 降解效果有明显提升, 表明 AFB₁ 处理能显著提升黑曲霉 FS10 对 AFB₁ 的降解能力。微观结构分析表明 AFB₁ 处理在一定程度上影响黑曲霉 FS10 的形态, 但随着时间的延长这种影响逐渐减小。此外, 转录组学分析表明 AFB₁ 处理降低了一些能量代谢基因的水平, 这可能是黑曲霉 FS10 的一种自我保护机制, 同时蛋氨酸的合成基因上调, 推测 AFB₁ 的降解可能与蛋氨酸的合成有关。

关键词: 黑曲霉 FS10; 黄曲霉毒素 B₁; 降解; 微观结构; 转录组学

中图分类号: TS 201.6 文章编号: 1673-1689(2021)09-0016-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.09.003

Biodegradation of Aflatoxin B₁ by *Aspergillus niger* and Transcriptome Analysis

YANG Yang^{1,2}, QIU Tianyu¹, YUAN Xiao³, SUN Jiadi¹, ZHANG Yinzhil¹, SUN Xiulan^{*1}, JI Jian¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Sciences and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Guangzhou GRG Metrology and Test Co., Ltd., Guangzhou 510627, China)

Abstract: Among the known mycotoxins, aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most toxic, and its impact on food safety has caused widespread concern. To explore the degradation mechanism of AFB₁ by *Aspergillus niger* FS10, different fractions of *A.niger* FS10 (suspension, fermentation, spores, mycelium) were used to degrade AFB₁. The effects of AFB₁ stimulation on the degradation of *A.niger* FS10 were studied and the morphological changes of *A.niger* FS10 mycelium during the degradation process were observed under scanning electron microscope. Finally, the possible mechanism of AFB₁ degradation was explored by transcriptome technology. The results showed that AFB₁ could be effectively degraded by *A.niger* FS10, and the removal rate of AFB₁ was 98.65% after

收稿日期: 2020-11-05

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFC1604206); 国家自然科学基金项目(31801660, 31772069)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全与质量研究。E-mail: sxlzzz@jiangnan.edu.cn

72 h treatment. The spores of *A.niger* FS10 insignificantly affected the AFB₁ removal, but the mycelium had a certain adsorption capacity for AFB₁ and the fermentation broth had obvious effect on the removal of AFB₁. After the induced stimulation of AFB₁, the degradation effect of *A.niger* FS10 was significantly improved, indicating that AFB₁ treatment could significantly improve the degradation ability of *A.niger* FS10 to AFB₁. The microstructure analysis showed that AFB₁ treatment affected the morphology of *A.niger* FS10 to a certain extent, but this effect gradually decreased with the treated time. Moreover, the transcriptomic analysis showed that AFB₁ treatment decreased the levels of some energy metabolism-related genes, which might be a self-protection mechanism of *A.niger* FS10. And the up-regulation of methionine synthesis genes suggested that the degradation of AFB₁ might be related to the methionine synthesis process.

Keywords: *Aspergillus niger* FS10, aflatoxin B₁, degradation, microstructure, transcriptome

黄曲霉毒素(aflatoxins,AFT)是一种有毒的真菌次级代谢产物,其主要由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等产生^[1]。在真菌毒素中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)的毒性最大,其污染事件在各种食品和饲料中频繁发生,严重威胁着人和动物的健康^[2-5]。研究表明,全球每年新增的肝癌病例中有 2.52 万~15.50 万例与黄曲霉毒素污染有关,2017 年世界卫生组织将毒性最强的 AFB₁ 列为 I 类致癌物^[6-7]。我国南方地区高温高湿的环境,特别是长江中下游地区每年的梅雨季节为霉菌的生长和产毒提供了更为便利的条件^[8-10]。2011 年在我国出口欧盟的花生中多次检测出黄曲霉毒素超标,其超标量达 2~240 μg/kg,不仅造成了巨大的经济损失,还严重影响了我国花生在国际市场上的竞争力。因此,对黄曲霉毒素脱毒的研究具有重大意义。

黄曲霉毒素的脱除方法有物理、化学和生物方法^[11-14]。与物理和化学方法相比,生物方法是一种环保、高效、安全的脱毒方法^[15],它利用生物体自身对毒素的吸附或代谢物对毒素的降解作用达到减少或去除黄曲霉毒素的目的。Hernandez-mendoza 等^[16]筛选了一株干酪乳杆菌,对黄曲霉毒素有很好的吸附作用,并能形成一种稳定性很好的菌体-黄曲霉毒素复合物。阴佳璐等^[17]研究了一株对 AFB₁ 有降解效果的浑浊红球菌,并发现其培养液对 AFB₁ 的降解率为 93.24%,而胞内提取物的降解率仅为 9.82%。Zhang 等以香豆素为唯一碳源,从饲料原料中筛选得到的一株黑曲霉菌株可在 24 h 内降解 58.2%的 AFB₁,且发酵液降解活性显著高于菌丝体和菌丝体提取液^[18]。李冰分离出一株对黄曲霉毒素

降解率可达 93.28%的黑曲霉,研究同样表明降解活性物质主要是来自黑曲霉胞外的代谢产物,证明黑曲霉产生的胞外降解酶对 AFB₁ 有降解作用^[19]。

黑曲霉被公认为是安全的工业发酵微生物,在有机酸和工业酶的生物生产中有着广泛应用^[20-23]。作者所在研究小组先前从大豆酱醅中分离出的食品级安全菌株黑曲霉 FS10 可以有效抑制黄曲霉的生长和 AFB₁ 的生物合成^[24]。与其他降解菌株不同,黑曲霉 FS10 不仅显示出较强的 AFB₁ 降解能力,而且在食品工业发酵中起着重要作用。作者将在先前的研究基础上进一步进行探索,分别研究了黑曲霉 FS10 的菌悬液、孢子、菌丝体和发酵液对 AFB₁ 的脱除效果,并通过微观结构和转录组学的研究,探究在 AFB₁ 刺激下黑曲霉 FS10 降解 AFB₁ 能力的变化。该研究中不仅更好地了解了黑曲霉 FS10 各组分对 AFB₁ 的降解特性,还提出了 AFB₁ 对降解菌株影响的新思路,为后期黄曲霉毒素脱除的研究和实际应用提供了理论和实践参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

1.1.1 菌株 黑曲霉 FS10(*Aspergillus niger* FS10)由作者所在实验室从大豆酱醅中分离筛选并保藏于中国典型培养物保藏中心,编号为 CCTCC NO M2013703。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖培养基(PDB 培养基):马铃薯 300 g,葡萄糖 20 g,氯霉素 0.1 g,蒸馏水 1 L;121 ℃高压灭菌 20 min。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基):PDB 培养基,琼脂 20 g;121 ℃高压灭菌 20 min。

1.2 试剂与仪器

AFB₁ 标准品(质量分数≥99%):新加坡普瑞邦生物工程有限公司产品;甲醇、乙腈(色谱纯):美国 TEDIA 公司产品;三氯甲烷(分析纯):上海国药集团化学试剂有限公司产品;体积分数 2.5%戊二醛溶液、磷酸盐缓冲液(PBS):上海碧云天生物公司产品;总 RNA 提取试剂盒:天根生化科技有限公司。

WATERS MALDI SYNAPT Q-TOF-MS:美国沃特世公司产品;VB-40 立式高温高压灭菌锅:德国 SYSTEC 公司产品;BSC-1300 超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司产品;SHP-150 生化培养箱:上海森信实验仪器有限公司产品;THZ-D 台式恒温振荡器:上海百典仪器设备有限公司产品;EX-OHUS 电子天平、旋涡振荡仪:美国奥豪斯公司产品;Scientz-10N 台式冷冻干燥机、Scientz-10LS 真空离心浓缩仪、SB-5200DT 超声波清洗机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;Eppendorf 离心机:德国艾本德公司产品;Milli-Q 超纯水仪:美国 Millipore 公司产品;日立 SU8020 扫描电镜:日本日立公司产品。

1.3 菌株活化及菌丝体、发酵液、孢子悬液制备

从-80℃取出黑曲霉 FS10 进行复苏,接种于 PDA 培养基中 28℃培养 5 d 后,用含 0.05%(体积分数)吐温 80 的无菌生理盐水将孢子洗下,调整孢子浓度为 10⁶ CFU/mL,作为黑曲霉 FS10 孢子悬液备用。

接种 2%(体积分数)的黑曲霉 FS10 孢子悬液于 PDB 培养基中,置于恒温培养箱中在 28℃、150 r/min 的条件下分别培养 12、24、36、48、60、72 h 后,在无菌低温条件下用快速真空抽滤,将菌丝体和滤液分别收集。所收集的菌丝体用 PBS 洗涤 3 次,再高温灭活后放入无菌 EP 管中备用;所收集的滤液过 0.22 μm 的无菌滤膜除去杂菌后,作为黑曲霉 FS10 发酵液备用。

1.4 AFB₁ 的提取与检测

取 1 mL 待测样品溶液于分液漏斗中,加入等体积氯仿并上下振荡 5 min 后静置分层,收集下层氯仿层溶液,重复上述提取操作 3 次后将收集的液体合并,再将合并的液体通过 AFB₁ 免疫亲和柱净化,用真空冷冻干燥机将收集的洗脱液挥干,用 1 mL 甲醇水(V(甲醇):V(水)=1:1)溶液复溶,充分振荡混匀后,通过 0.22 μm 有机滤膜过滤,保存于

棕色进样瓶中待检测。

采用 WATERS MALDI SYNAPT Q-TOF-MS 对 AFB₁ 进行检测,色谱条件为:BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相:A 为乙腈,B 为甲酸铵溶液;进样量:5 μL;流量:0.3 mL/min;柱温:45℃;梯度洗脱如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱表

Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流量/(mL/min)	流动相体积分数/%	
		A	B
0.0	0.3	10	90
0.1	0.3	10	90
6.0	0.3	60	40
6.1	0.3	10	90
7.1	0.3	10	90

称取适量的 AFB₁ 标准品,用色谱级甲醇配成 100 μg/mL 的标准储备液,再用甲醇水溶液分别稀释制得质量浓度梯度为 10、20、50、100、200、500、1 000 ng/mL 的系列标准溶液。按上述色谱条件检测,结果如图 1 所示,所得标准曲线方程为 $y=21.964x+466.86$, $R^2=0.9955$,其中 x 为 AFB₁ 质量浓度, y 为峰面积, R^2 相关系数。AFB₁ 在 10~1 000 ng/mL 线性良好。

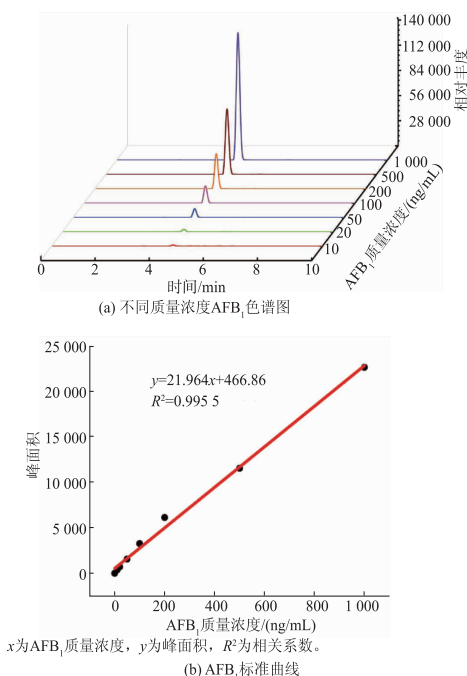


图 1 不同质量浓度 AFB₁ 色谱图和 AFB₁ 标准曲线

Fig. 1 Chromatogram of AFB₁ in different concentrations and standard curve of AFB₁

1.5 黑曲霉 FS10 不同组分对 AFB₁ 降解效果的研究

将 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉 FS10 孢子悬液按 2% (体积分数)接种量接种至含有 AFB₁ 的 PDB 培养基中 (AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL),同时以含有相同 AFB₁ 质量浓度的无菌 PDB 溶液作为空白对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养,分别培养 12、24、36、48、60、72 h 后取样,提取 AFB₁ 后测定 AFB₁ 残留量,计算 AFB₁ 残余率,方法如下:

$$I=I_0/I_1 \times 100\%$$

式中: I 为 AFB₁ 残余率,%; I_0 为降解前 AFB₁ 质量浓度,μg/mL; I_1 为降解后 AFB₁ 质量浓度,μg/mL。

将 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉 FS10 孢子悬液分别吸取 0、1、3、5、7、9 mL,再分别加入相应质量浓度 AFB₁ 和相应体积无菌生理盐水使 AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL、终体积均为 10 mL。混匀后置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养 24 h 后取样,提取 AFB₁ 后测定 AFB₁ 残留量,计算 AFB₁ 残余率。

将不同培养时间灭活后的黑曲霉 FS10 菌丝体重悬于含有 AFB₁ 的 PDB 培养基中 (AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL),同时以含有相同 AFB₁ 质量浓度的无菌 PDB 溶液作为空白对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养 24 h 后取样,提取 AFB₁ 后测定 AFB₁ 残留量,计算 AFB₁ 残余率。

将不同培养时间的黑曲霉 FS10 发酵液吸取 990 μL 置于 EP 管中,并加入 10 μL 终质量浓度为 100 μg/mL AFB₁ 标准储备液,同时以含有相同 AFB₁ 质量浓度的无菌 PDB 溶液作为空白对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养 24 h 后取样,提取 AFB₁ 后测定 AFB₁ 残留量,计算 AFB₁ 残余率。

1.6 AFB₁ 诱导黑曲霉 FS10 降解能力的研究

将 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉 FS10 孢子悬液按 2% (体积分数)接种量接种至含有 AFB₁ 的 PDB 培养基中 (AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL),作为诱导组。同时以不含 AFB₁ 的 PDB 培养基作为未诱导对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养 24 h 后取样,在无菌低温条件下进行快速真空抽滤,分离诱导组和未诱导组上层菌体和下层发酵液,将上层菌体用 PBS 洗涤 3 次后重悬于含有 1 μg/mL AFB₁ 的 PBS 溶液中;将下层发酵液 990 μL

置于 EP 管中,并加入 10 μL 终质量浓度为 100 μg/mL AFB₁ 标准储备液,同时以含有相同 AFB₁ 质量浓度的无菌 PDB 溶液作为空白对照组。全部样品置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下分别培养 12、24、36 h,提取 AFB₁ 后测定 AFB₁ 残留量,计算 AFB₁ 残余率。

1.7 黑曲霉 FS10 扫描电镜样品的制备

将 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉 FS10 孢子悬液按 2% (体积分数)接种量接种至含有 AFB₁ 的 PDB 培养基中 (AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL) 和不含 AFB₁ 的 PDB 培养基中,分别为处理组和对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下分别培养 24、36、48 h 后取样,在低温无菌条件下快速真空抽滤去除发酵液,用预冷过的 PBS 溶液洗涤菌体 3 次后取适量菌体转移至 EP 管中,加入 1 mL 4 ℃预冷的 2.5% (体积分数) 戊二醛溶液,在 4 ℃下固定过夜,吸出固定剂,用 0.2 mol/L PBS 溶液浸洗 2 次,10 min/次,再用 4 ℃预冷的 1% (体积分数) OsO₄ 溶液在 4 ℃条件下固定 1 h,用 0.2 mol/L PBS 溶液浸洗 2 次,10 min/次。然后用梯度乙醇溶液 (体积分数分别为 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%) 脱水,每个梯度乙醇溶液脱水 2 次,15 min/次。采用真空喷镀法,将样品安置于离蒸发源 10~15 cm 处的真空喷镀仪的样品台进行喷金 (10 kV、220 s),喷镀均匀后通过扫描电镜观察并拍摄。

1.8 黑曲霉 FS10 转录组学分析

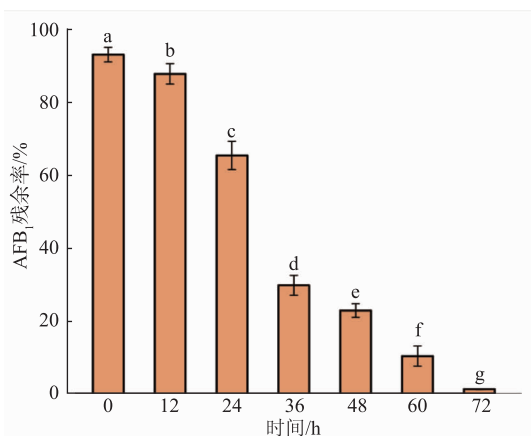
将 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉 FS10 孢子悬液按 2% (体积分数)接种量接种至含有 AFB₁ 的 PDB 培养基中 (AFB₁ 终质量浓度为 1 μg/mL) 和不含 AFB₁ 的 PDB 培养基中,分别为处理组和对照组,均置于恒温培养箱中在 28 ℃、150 r/min 的条件下培养 36 h 后取样。在低温无菌条件下快速真空抽滤去除发酵液,用预冷过的 PBS 溶液洗涤菌体 3 次后取适量菌体转移至 EP 管中。将菌丝体破碎后,使用试剂盒提取 RNA。将质量合格的 RNA 保存在异丙醇中,委托南京派森诺基因科技有限公司进行样品的转录组测序,测序平台为基于二代测序的 Illumina 平台。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉 FS10 菌悬液对 AFB₁ 脱除作用

黑曲霉 FS10 在 PDB 培养基生长期间可显著降

解AFB₁(见图2)。在12 h后 AFB₁ 质量浓度开始降低, 其中在12~36 h的降解速率最快, AFB₁ 残余率从85.08%降至29.78%。在72 h时AFB₁ 残余率仅为1.35%。结果表明, 黑曲霉 FS10 菌株在生长过程中可以有效脱除 AFB₁。



不同字母表示差异性显著($P < 0.05$)。

图2 黑曲霉 FS10 菌悬液对 AFB₁ 脱除作用

Fig. 2 Removal of AFB₁ by the fungal suspension of *Aspergillus niger* FS10

2.2 黑曲霉 FS10 孢子对 AFB₁ 脱除作用

由图3可以看出黑曲霉 FS10 孢子悬液对 AFB₁ 的脱除效果与对照组相比无明显差异, AFB₁ 质量浓度基本不随孢子浓度的增加而变化, 表明黑曲霉 FS10 孢子对 AFB₁ 无任何脱除作用, 故而推测正常生长状态下的菌体及其发酵液可能具有脱除能力。

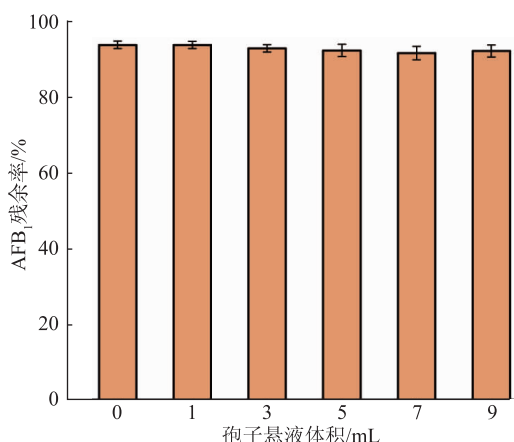
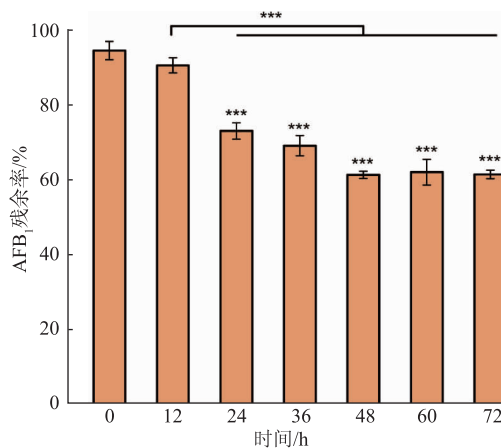


图3 黑曲霉 FS10 孢子悬液对 AFB₁ 脱除作用

Fig. 3 Removal of AFB₁ by the spores of *Aspergillus niger* FS10

2.3 黑曲霉 FS10 菌丝体对 AFB₁ 的吸附作用

随着培养时间的延长, 菌丝体的生长量越多, 对 AFB₁ 的脱除效果越好。经高温灭活处理的菌丝体对 AFB₁ 有一定的脱除作用, 这种作用可能是菌丝体具有一定的吸附能力引起的(见图4)。已有研究表明微生物可通过与 AFB₁ 结合, 形成菌体和 AFB₁ 复合物, 该复合物整体趋于稳定, 且不易被动物机体吸收, 从而易排出体外, 降低了 AFB₁ 对动物的危害^[25]。钱潘攀等^[26]研究表明麝香草酚可诱导酵母细胞发生裂解, 导致细胞壁上肽聚糖的结构发生变化并增强其对 AFB₁ 的吸附能力。但黑曲霉 FS10 吸附能力有限, 与菌悬液脱除效果相比还存在较大差异, 因此需对黑曲霉 FS10 发酵液组分进行研究。



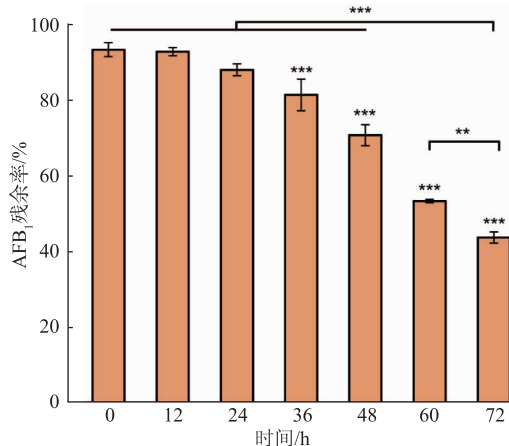
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 代表与对照组比有显著性差异。

图4 黑曲霉 FS10 菌丝体对 AFB₁ 脱除作用

Fig. 4 Removal of AFB₁ by the mycelium of *Aspergillus niger* FS10

2.4 黑曲霉 FS10 发酵液对 AFB₁ 脱除作用

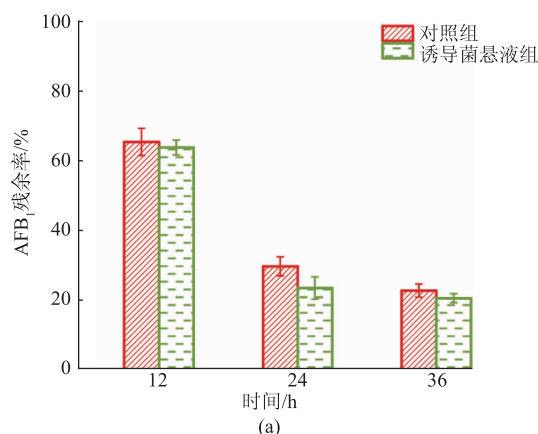
不同培养时间的发酵液在一定时间内对 AFB₁ 脱除作用有明显差异(见图5)。可以推测出黑曲霉 FS10 培养时间越长, 其发酵液对 AFB₁ 脱除效果越好, 说明随着时间的延长, 黑曲霉 FS10 发酵液中脱除 AFB₁ 的物质随之增加。在36 h后, 具有降解能力物质大量产出, AFB₁ 的残余率显著下降。现有报道部分微生物对真菌毒素的降解作用是由于其分泌了有特异性的胞外酶。Wang 等^[27]采用白腐真菌的过氧化物锰酶(MnP)降解 AFB₁, 培养48 h后 AFB₁ 的最大消除率达到86.0%。为了研究 AFB₁ 处理是否对黑曲霉 FS10 脱除能力有积极的影响, 作者进一步研究了 AFB₁ 诱导后黑曲霉 FS10 的脱除变化。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 代表与对照组比有显著性差异。

图 5 黑曲霉 FS10 发酵液对 AFB₁ 脱除作用

Fig. 5 Removal of AFB₁ by the culture filtrate of *Aspergillus niger* FS10



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 代表与对照组比有显著性差异。

图 6 AFB₁ 对黑曲霉 FS10 脱除能力诱导作用

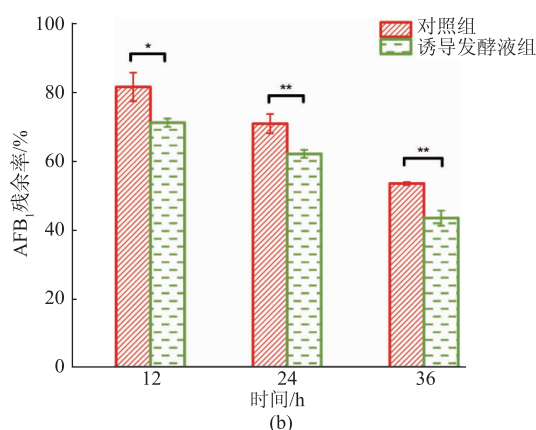
Fig. 6 Induction effect of AFB₁ on *Aspergillus niger* FS10 removal ability

2.6 AFB₁ 对黑曲霉 FS10 微观形态的影响

为了进一步研究黑曲霉 FS10 在 AFB₁ 降解过程中的变化, 分别选取了 24、36、48 h 3 个 AFB₁ 降解速率最快的时间点进行黑曲霉 FS10 微观结构的分析。如图 7 所示, 可以观察到 24 h 时, 相较于对照组, AFB₁ 处理组出现了明显的皱缩, 这表明 AFB₁ 刺激对黑曲霉 FS10 正常生长产生了一定的影响; 36 h 时, AFB₁ 处理组相较于对照组虽然仍有明显皱缩, 但与 24 h 时相比这种皱缩现象明显减弱; 而 48 h 时相较于对照组而言, 处理组并未发现明显的皱缩现象。出现这种现象的原因可能是: 1) 黑曲霉 FS10 对毒素环境已经产生了一定的适应能力; 2) 毒素被

2.5 AFB₁ 对黑曲霉 FS10 脱除能力的诱导作用

如图 6(a) 所示, AFB₁ 刺激诱导 24 h 后的黑曲霉 FS10 对比未做处理的黑曲霉 FS10 发现, 菌体诱导组对 AFB₁ 脱除效果有一定提升, 但效果不显著, 可能由于短时间 AFB₁ 刺激对黑曲霉 FS10 生长有一定抑制作用导致黑曲霉 FS10 菌体数量有限, 其吸附能力在此时变小, 但诱导组比未诱导组提前适应毒素环境, 大胆猜测可能 AFB₁ 进入黑曲霉 FS10 菌株内并参与了该菌株的代谢促进产出更多有降解能力的物质。而图 6(b) 所示, 诱导黑曲霉 FS10 后发酵液对 AFB₁ 的脱除作用明显得到提升, 36 h 后脱除率提升了 10.01%。从菌株降解能力层面来看, AFB₁ 的刺激对黑曲霉 FS10 产生了积极的影响。本研究结果充分说明了在 AFB₁ 刺激下, 黑曲霉 FS10 菌株发酵液脱除 AFB₁ 能力上升, 推断 AFB₁ 处理可以使黑曲霉产生更多的胞外降解蛋白。

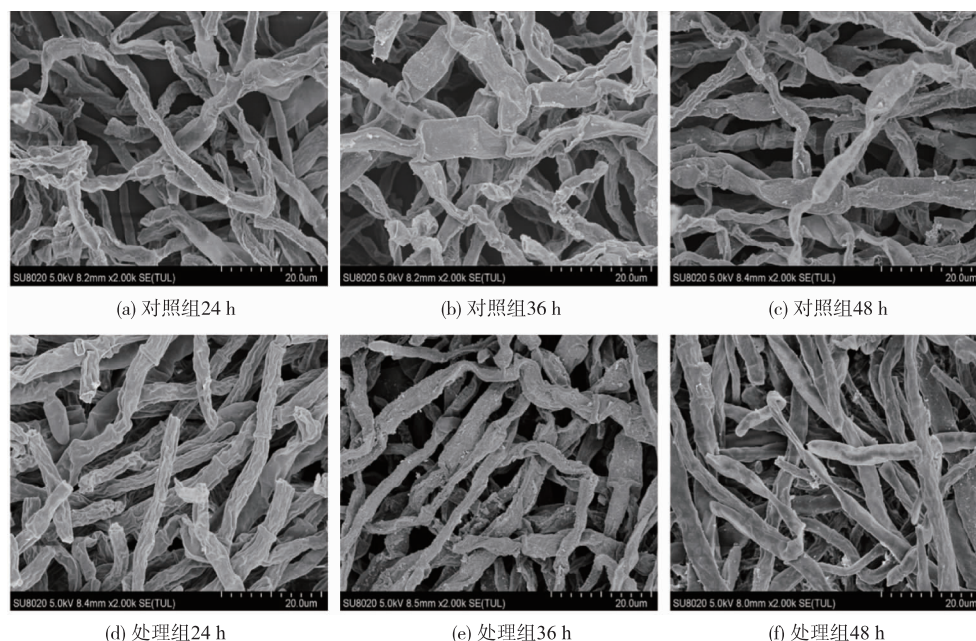
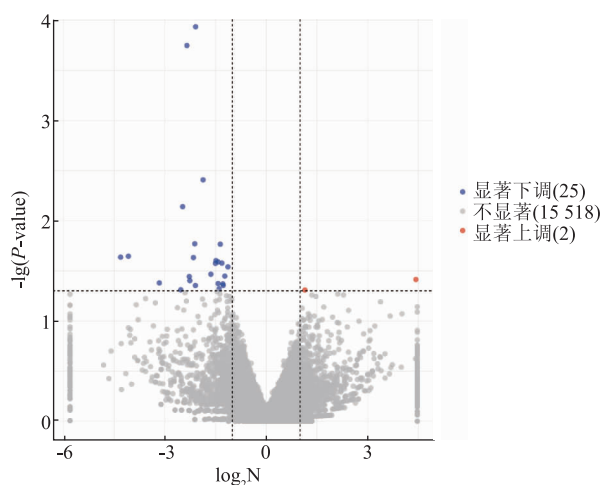


降解, 毒素含量有明显降低从而对其影响减小。

2.7 AFB₁ 对黑曲霉 FS10 转录组学分析

2.7.1 差异基因表达分析 火山图展示的是基因分布情况及基因的表达倍数差异和显著性的结果, 正常状况下, 该图左右差异基因分布应大致对称。如图 8 所示, 左侧为 AFB₁ 处理组相比于对照组的下调基因, 右侧为 AFB₁ 处理组相比于对照组的上调基因。对照组和处理组共有差异基因 15 545 个, 其中显著表达的差异基因有 27 个, 显著上调的基因为 2 个, 显著下调的基因为 25 个。

2.7.2 差异基因功能富集分析 GO 富集分析主要包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能

图 7 AFB₁ 对黑曲霉 FS10 形态的影响Fig. 7 Effect of AFB₁ on *Aspergillus niger* FS10 morphology

N 为变化倍数。

图 8 差异基因火山图

Fig. 8 Volcano map of differentially expressed genes

(molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 3 类^[28], GO 富集分析结果显示, 15 545 个差异基因中共有 8 221 个差异基因被显著富集到 183 个 GO 条目, 占有差异基因转录本的 52.8%。如图 9 所示, 挑选每个 GO 分类中 P -value 最小, 即富集最显著的前 10 个 GO 条目进行展示, 在细胞组分类别中, 细胞的胞外区、膜的组成部分、膜的固有成分等是最有代表性的 GO 术语; 在分子功能类别中苹果酸酶活性、苹果酸脱氢酶活性、血红素结合

等富集较为显著; 在生物过程类别中, L -蛋氨酸生物合成过程、苹果酸代谢过程、腺嘌呤生物合成过程、细胞对过氧化氢的反应等较为显著。

KEGG 是一个整合了基因组信息、生化系统功能信息和化学信息的综合性数据库^[29]。结合 KEGG 数据库对差异显著基因参与的相关代谢通路进行富集, 由图 10 可知差异基因共富集到 11 个相关的代谢通路, 其主要参与了丙酮酸代谢、硒化合物代谢、色氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、MAPK 信号通路、氧化磷酸化等。

三羧酸循环是生物体内普遍存在的代谢途径, 丙酮酸是进入三羧酸循环的关键代谢物^[30], 与丙酮酸生成有关基因 *PPSA*、*MAEB* 的下调, 可能会减少丙酮酸的生成, 从而导致三羧酸循环通量降低, 减小能量产生; 氧化磷酸化有关基因 *COX3* 的下调同样会造成能量生产的减少。这可能是 AFB₁ 对黑曲霉的生长造成一定的影响, 从而导致黑曲霉产生一种自我保护机制。CAT 是细胞防御体系重要的抗氧化酶, 能够催化氧化还原反应清除活性氧, 抵御氧化性损伤^[31], AFB₁ 处理会造成黑曲霉 FS10 氧化性损伤的产生, 但随着 AFB₁ 被降解, 氧化损伤得以缓解, 从而造成 36 h 时 CAT 的下调, 这一推测与图 7 中的微观形态研究结果相一致。*MetE* 编码的蛋氨酸合酶和 *MetH* 编码的甲硫氨酸合酶是蛋氨酸合成的

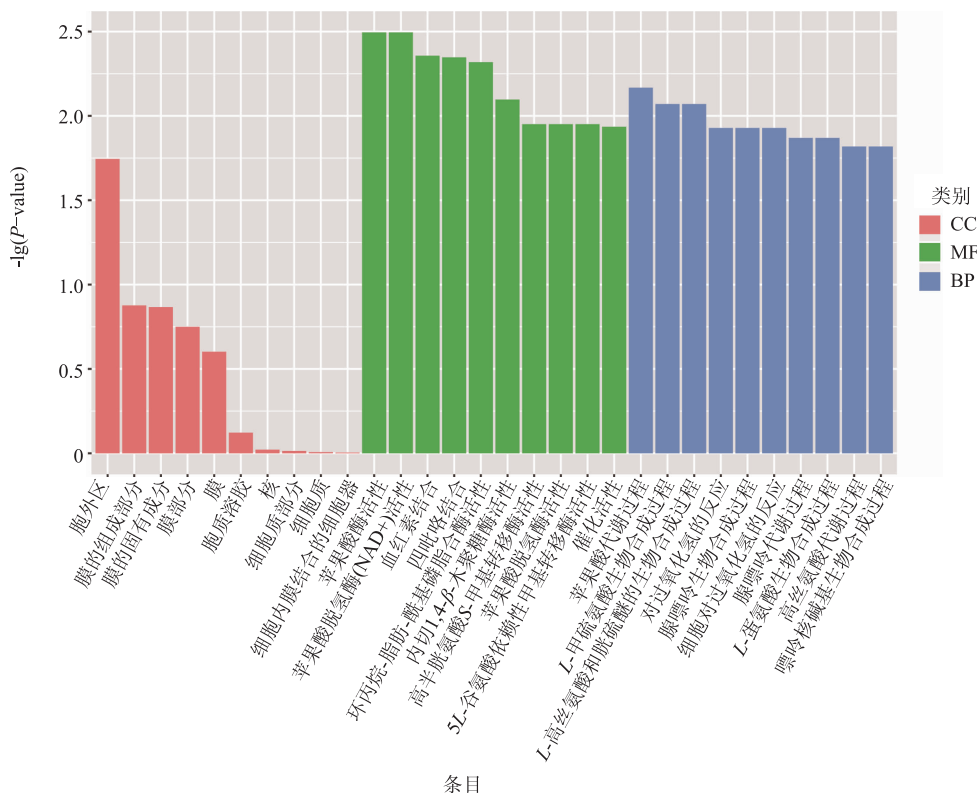


图9 差异基因 GO 富集柱状图

Fig. 9 GO enrichment histogram of differentially expressed genes

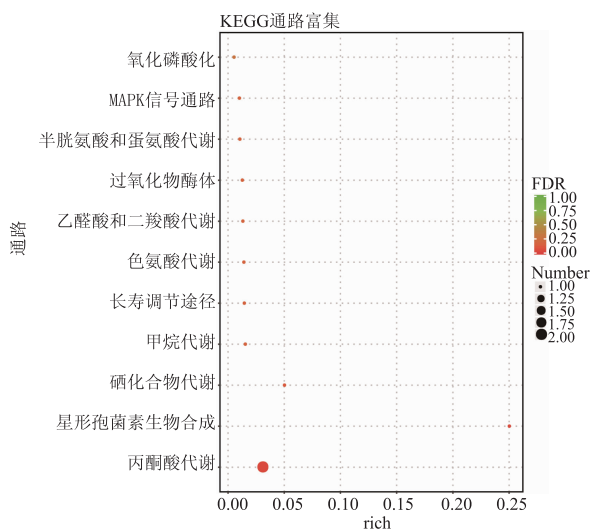


图10 差异基因 KEGG 富集散点图

Fig. 10 KEGG enrichment scatter plot of differentially expressed genes

关键酶,这两个基因的上调表明 AFB₁ 的降解可能与蛋氨酸的合成有一定的关系。研究表明 *MetE* 和 *MetH* 都能与 Zn²⁺ 结合来激活同型半胱氨酸(Hcy),

Hcy 是蛋氨酸生物合成的最后一步^[32],先前作者所在课题组在黑曲霉 FS10 降解玉米赤霉烯酮(ZEN)的研究中发现,整合掉发酵液中金属离子后降解效果明显减弱^[33],这为作者的猜想提供了一定的依据。

3 结 语

通过对黑曲霉 FS10 不同组分脱除 AFB₁ 作用进行研究,发现黑曲霉 FS10 菌悬液对 AFB₁ 脱除效果最好,72 h 时 AFB₁ 残余率仅剩 1.35%,即脱除率高达 98.65%。黑曲霉 FS10 孢子对 AFB₁ 无明显脱除作用,但菌丝体对 AFB₁ 有一定的吸附作用。黑曲霉 FS10 发酵液中可能存在某种对 AFB₁ 有降解能力的特异性物质,因此黑曲霉 FS10 发酵液对 AFB₁ 有明显脱除效果。经过 AFB₁ 提前刺激诱导黑曲霉 FS10,其发酵液脱除 AFB₁ 能力有明显的提升,36 h 后脱除率提升了 10.01%,推测可能由于 AFB₁ 进入黑曲霉 FS10 菌株内并参与了该菌株的代谢,促进其产出更多有降解能力的物质。不同 AFB₁ 刺激时间下黑曲霉 FS10 的微观形态表现出随着 AFB₁ 刺激时间的延长,黑曲霉 FS10 菌体表面皱缩会向正

常方向好转,推测黑曲霉 FS10 已经适应毒素环境或者此时毒素含量有明显降低从而对其影响减小。转录组学分析表明,AFB₁ 主要引起能量代谢基因和抗氧化酶基因的下调,这可能是黑曲霉 FS10 受

AFB₁ 刺激后产生的一种自我保护反应。蛋氨酸合成基因的上调表明 AFB₁ 的降级可能与蛋氨酸的合成有一定的关系,但具体的黑曲霉 FS10 降解 AFB₁ 的机理还需要进一步探究。

参考文献:

- [1] SHI H, COOPER B, STROSHINE R L, et al. Structures of degradation products and degradation pathways of aflatoxin B₁ by high-voltage atmospheric cold plasma (HVACP) treatment[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017, 65 (30): 6222-6230.
- [2] ALIM M, IQBAL S Z, MEHMOOD Z, et al. Survey of mycotoxins in retail market cereals, derived products and evaluation of their dietary intake[J]. **Food Control**, 2018, 84 (17): 471-477.
- [3] ZHAO X, SCHAFFNER D W, YUE T. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: point and probability risk assessments for aflatoxin B₁[J]. **Food Control**, 2013, 33 (2): 366-377.
- [4] ROCHA M E B D, FREIRE F D C O, MAIA F E F, et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health[J]. **Food Control**, 2014, 36 (1): 159-165.
- [5] 庄振宏, 张峰, 李燕云, 等. 黄曲霉毒素致癌机理的研究进展[J]. **湖北农业科学**, 2011 (8): 20-23.
- [6] LIU Y, WU F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment[J]. **Environmental Health Perspectives**, 2010, 118 (6): 818-824.
- [7] BAAN R, GROSSE Y, STRAIF K, et al. A review of human carcinogens—Part F: chemical agents and related occupations[J]. **The Lancet Oncology**, 2009, 10 (12): 1143-1144.
- [8] 张宸. 我国主要食品中黄曲霉毒素 B₁ 调查与风险评估[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008.
- [9] SELVARAJ J N, WANG Y, ZHOU L, et al. Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: a review[J]. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2015, 32 (4): 440-452.
- [10] BATTILANI P. Recent advances in modeling the risk of mycotoxin contamination in crops[J]. **Current Opinion in Food Science**, 2016 (11): 10-15.
- [11] MAO J, HE B, ZHANG L, et al. A structure identification and toxicity assessment of the degradation products of aflatoxin B₁ in peanut oil under UV irradiation[J]. **Toxins**, 2016, 8 (11): 332-343.
- [12] AGRIOPOULOU S, KOLIADIMA A, KARAIKAKIS G, et al. Kinetic study of aflatoxins' degradation in the presence of ozone [J]. **Food Control**, 2016 (61): 221-226.
- [13] 刘英丽, 毛慧佳, 杨梓妍, 等. 重组漆酶降解黄曲霉毒素 B₁ 分子对接分析及产物结构解析[J]. **食品科学**, 2019, 40 (24): 119-127.
- [14] BRANA M T, SERGIO L, HAIDUKOWSKI M, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by a sustainable enzymatic extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*[J]. **Toxins**, 2020, 12 (1): 49-62.
- [15] JI C, FAN Y, ZHAO L. Review on biological degradation of mycotoxins[J]. **Animal Nutrition**, 2016, 2 (3): 127-133.
- [16] HERNANDEZ-MENDOZA A, GARCIA H S, STEELE J L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2009, 47 (6): 1064-1068.
- [17] 阴佳璐, 唐语谦, 任杰, 等. 浑浊红球菌 PD630 对黄曲霉毒素 B₁ 的生物降解特性研究[J]. **中国食品添加剂**, 2020, 31 (2): 39-46.
- [18] ZHANG W, XUE B, LI M, et al. Screening a strain of *Aspergillus niger* and optimization of fermentation conditions for degradation of aflatoxin B₁[J]. **Toxins**, 2014, 6 (11): 3157-3172.
- [19] 李冰. 黑曲霉对黄曲霉毒素 B₁ 的降解及应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [20] NEIRA-VIELMA A A, ILINA A, ALVAREZ G M, et al. Recovery and purification of *Aspergillus niger* phytase from crude extract using AOT / isooctane reversed micelles[J]. **Biotechnology Reports**, 2020, 26: 1-7.
- [21] LI Q, RAY C S, CALLOW N V, et al. *Aspergillus niger* production of pectinase and α -galactosidase for enzymatic soy processing [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2020, 134: 1-7.
- [22] OZDAL M, KURBANOGU E B. Citric acid production by *Aspergillus niger* from agro-industrial by-products; molasses and

- chicken feather peptone[J]. **Waste and Biomass Valorization**, 2018, 10(3):631-640.
- [23] DIAZ G V, CONIGLIO R O, ALVARENGA A E, et al. Secretomic analysis of cheap enzymatic cocktails of *Aspergillus niger* LBM 134 grown on cassava bagasse and sugarcane bagasse[J]. **Mycologia**, 2020, 112(4):663-676.
- [24] 徐丹. 酿造酱油中黄曲霉毒素 B₁ 的产生及其控制研究[D]. 无锡:江南大学, 2012.
- [25] LEE Y K, EL-NEZAMI H, HASKARD C A, et al. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria[J]. **Journal of Food Protection**, 2003, 66(3):426-430.
- [26] 钱潘攀, 李红波, 赵岩岩, 等. 双效型酵母细胞壁提取物及其对黄曲霉毒素 B₁ 吸附特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 25-29.
- [27] WANG J, OGATA M, HIRAI H, et al. Detoxification of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624[J]. **FEMS Microbiol Letters**, 2011, 314(2):164-169.
- [28] TAKADA S. Gō model revisited[J]. **Biophysics and Physicobiology**, 2019, 16:248-255.
- [29] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. **Nucleic Acids Research**, 2008, 36:480-484.
- [30] 刘维维, 胡森. 丙酮酸对多脏器及组织损伤保护作用的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2012, 13(3):187-189.
- [31] SANI M, SEBAI H, REFINETTI R, et al. Effects of sodium nitroprusside on mouse erythrocyte catalase activity and malondialdehyde status[J]. **Drug and Chemical Toxicology**, 2016, 39(3):350-356.
- [32] PEJCHAL R, LUDWIG M L. Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication[J]. **Plos Biology**, 2005, 3(2):31-43.
- [33] SUN X, HE X, XUE K, et al. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10[J]. **Food Chemical Toxicology**, 2014, 72:76-82.

科 技 信 息

欧盟评估黄原胶作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性

2021 年 7 月 30 日, 据欧盟食品安全局(EFSA)消息, 应欧盟委员会要求, 欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就野油菜黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris strains*)菌株生产的黄原胶(Xanthan gum)作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性发表科学意见。

经过评估, 在缺乏关于评估中的添加剂的充分信息的情况下, 专家小组无法就黄原胶对目标物种、消费者、使用者和环境的安全性得出结论。在建议的使用条件下, 黄原胶被认为是所有动物品种饲料中有效的稳定剂和增稠剂。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估黄原胶作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性[EB/OL]. (2021-8-2). <http://news.foodmate.net/2021/08/601498.html>