

淡豆豉炮制过程中环境因素对黄曲霉毒素产生的影响

金 云^{1,3}, 翁美芝^{1#}, 戴家齐¹, 汪玉军⁴, 王立元¹, 龙 凯¹, 谢小琴¹, 杨安金¹, 贺 婧^{2*}, 谢小梅^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 南昌大学转化医学研究院, 江西 南昌 330031

3. 江西省皮肤病专科医院, 江西 南昌 330001

4. 浙江桐君堂中药饮片有限公司, 浙江 杭州 311500

摘要: **目的** 探讨淡豆豉炮制过程中环境因素对黄曲霉毒素 (AFs) 含量的影响。**方法** 依据《中国药典》2020 年版记载的淡豆豉制法, 设置不同的温度、湿度、是否水封“再闷”环境条件下的 6 个组进行自然炮制, 检测各组炮制至不同时间豆粒的温度、水分活度 (AW)、含氧量; 采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 检测各组在“黄衣上遍”第 3 天 (F3)、第 6 天 (F6) 和“再闷”第 6 天 (Z6)、第 12 天 (Z12) 样品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 含量, 分析淡豆豉自然炮制中影响 AFs 产生的主要环境因素; 模拟淡豆豉自然炮制, 通过纯培养考察炮制原料、“再闷”环境 (低含氧量) 对产毒黄曲霉菌标准株 (简称: 产毒株) 产 AFB₁ 的影响, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测产毒株产毒关键基因 (*aflR*、*aflD*、*aflM*、*aflO*、*aflQ*) mRNA 相对表达量。**结果** 自然炮制过程中湿度与 AFs 含量呈显著性相关 ($r=0.435$, $P<0.05$), 且组 6 (湿度为 90%) 中 F6、Z6、Z12 的 AFs 含量均最高 (分别为 159.11、45.43、8.78 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); 纯培养实验中, 产毒株在黑豆基质上比马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB) 培养基上的产毒量减少 95.31% 及以上, 在密封罐内培养比罐外培养的产毒量减少 99.93% 及以上, 均以 *aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达下调更显著 ($P<0.001$)。**结论** 淡豆豉自然炮制过程中湿度是影响 AFs 含量的主要因素, 炮制原料、“再闷”环境可显著降低产毒株的产毒量。

关键词: 淡豆豉; 黄曲霉毒素 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂); 温度; 湿度; “再闷”; 产毒黄曲霉菌标准株; 产毒关键基因 (*aflR*、*aflD*、*aflM*、*aflO*、*aflQ*)

中图分类号: R283.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0919-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.013

Effects of environmental factors on production of aflatoxins in processing of *Sojae Semen Preaparatum*

JIN Yun^{1,3}, WENG Meizhi¹, DAI Jiaqi¹, WANG Yujun⁴, WANG Liyuan¹, LONG Kai¹, XIE Xiaoqin¹, YANG Anjin¹, HE Jing², XIE Xiaomei¹

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, China

3. Dermatology Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330001, China

4. Zhejiang Tongjuntang Decoction Pieces Co., Ltd., Hangzhou 311500, China

Abstract: **Objective** The effects of environmental factors on the content of aflatoxins (AFs) in the processing of *Sojae Semen Preaparatum* (SSP) were investigated. **Methods** According to the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, six groups were naturally processed under different temperature, humidity, and whether they were sealed with water or not in the process of the “secondary fermentation” stage. Conventional methods were used to detect the temperature, water activity (aw), and oxygen content of each group

收稿日期: 2024-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360772); 国家自然科学基金资助项目 (82060709); 国家自然科学基金资助项目 (82060699); 南昌大学香樟育才计划; 江西省自然科学基金资助项目 (20242BAB26173); 江西省自然科学基金资助项目 (20232BAB206161)

作者简介: 金 云 (1984—), 女, 主管检验师, 硕士研究生, 从事中药药理、微生物检验。E-mail: jinyun-8420@163.com

共同第一作者: 翁美芝 (1982—), 女, 教授, 博士, 主要从事中药溶栓研究。E-mail: meizhiweng@whu.edu.cn

***通信作者:** 谢小梅 (1964—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事微生物学研究。E-mail: jxmx1964@sina.com

贺 婧 (1990—), 女, 博士, 讲师, 主要从事微生物学研究。E-mail: whuncuhejing@qq.com

at different processing times. The contents of AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) in the samples of each group on the 3rd day (F3) and the 6th day (F6) of the "yellow cladding" stage, the 6th day (Z6) and the 12th day (Z12) of the "secondary fermentation" stage were detected by method of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The main environmental factors affecting the production of AFs in natural processing of SSP were analyzed. Simulating the natural processing of SSP, the effects of processing raw materials and the environment of the "secondary fermentation" stage on the production of AFB₁ by the standard strain of *Aspergillus flavus* (abbreviated as toxigenic strain) were investigated through pure culture. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of the key genes *aflR*, *aflD*, *aflM*, *aflO* and *aflQ* of toxigenic strains. **Results** There was a significantly positive correlation between humidity and AFs content during natural processing ($r = 0.435$, $P < 0.05$), and the AFs content of F6, Z6 and Z12 in group 6 (humidity of 90%) was the highest (159.11, 45.43 and 8.78 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively). In pure culture experiments, the toxin amount produced by toxigenic strain was reduced by 95.31% or more on black bean substrate compared to PDB medium; and by 99.93% or more in sealed jar compared to out of jar culture. The mRNA expression of *aflM*, *aflO*, and *aflQ* was significantly inhibited ($P < 0.001$). **Conclusion** Humidity was the main factor affecting the content of AFs during the natural processing of SSP. Processing raw material and the environment of the "secondary fermentation" stage can significantly reduce the amount of toxic production.

Key words: *Sojae Semen Preaparatum*; aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂); temperature; humidity; "secondary fermentation" stage; standard strain of *A. flavus* producing toxins; toxigenic gene (*aflR*, *aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflQ*)

《中国药典》2020 版记载, 淡豆豉以黑色种皮品系大豆为主料, 桑叶、青蒿为辅料, 经前酵(“黄衣上遍”)以及后酵(“再闷”)炮制而成^[1], 但炮制中的温度、湿度、“再闷”等关键因素并未具体描述。目前, 研究者大多参考《中国药典》2020 年版制法进行炮制, 炮制条件却各有不同^[2-3]。

本课题组已建立规范的淡豆豉炮制工艺, 已明确水封“再闷”是炮制中不可缺少的重要环节。还发现炮制过程中黄曲霉毒素 (AFs) 含量呈动态变化, 至炮制后期和成品阶段, AFs 未被检出, 同时分离出了产毒能力不同的黄曲霉菌^[4-6]。AFs 是一种毒性极强的致毒致癌物质, 主要由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生。近年来, 发酵豆制品中 AFs 污染问题越来越受到人们的重视^[7-8]。温度、水分活度 (AW)、基质、氧化胁迫均是影响黄曲霉菌产毒能力的重要因素, 且目前针对淡豆豉炮制环境因素对 AFs 含量影响的研究相对匮乏。鉴于此, 本研究通过设定不同的炮制温度、湿度并对比是否水封“再闷”方式, 开展淡豆豉自然炮制实验, 旨在探究影响 AFs 产生的主要因素。同时通过纯培养方式, 考察炮制原料、“再闷”含氧量对产毒黄曲霉菌标准株 (以下简称: 产毒株) 产毒能力的影响。研究结果将为揭示淡豆豉炮制中 AFs 的形成机制、防控策略以及深入理解炮制机制提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

AB Sciex QTRAP 4500 型三重四极杆线性离子

阱串联质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; VW-3A 型智能水分活度测量仪, 维科美拓科技有限公司; CY-12 型便携式智能气体分析仪 (测氧仪), 杭州建德曙康器械有限公司; LCD-100 型数显温度计, 横水创纪仪器表有限公司; ABI-7500 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 药材与试剂

黑豆、桑叶、青蒿, 均购于安国冷背药材有限公司, 由江西中医药大学附属医院杨安金主任中药师鉴定, 分别为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子, 桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。产毒黄曲霉菌标准株, 购于中国普通微生物菌种保藏中心, 编号 CGMCC3.4408。

AFs 总量免疫亲和柱 (批号 Z2D00C21)、AFs 混合对照品 (批号 2C01B05, 其中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 质量分数分别为 2.0、0.5、2.0、0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 青岛普瑞邦生物工程有限公司; M5 Plant RNeasy Plus Mini Kit (批号 23GB0613), 北京聚合美生物有限公司; Prime Script TMRT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect Real Time) (批号 ANF1097A)、TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (批号 AN70909A), 宝生物工程 (大连) 有限公司。

2 方法与结果

2.1 设置不同条件下的淡豆豉自然炮制和取样

参照本课题已建立的方法进行操作^[4-6], 整个炮制过程设置温度为 (30±2) °C、湿度为 (70±5) %、

水封“再闷”条件下进行。据此本研究设置不同的温度、湿度、是否水封“再闷”共 6 个组进行淡豆豉自然炮制, 分组情况见表 1。其中组 1 为本实验室规范的淡豆豉炮制条件。在炮制过程中, 温度每日记录 1 次, 含氧量、AW 每 3 天测量 1 次, 前酵阶段的第 0、3、6 天分别标记为 F0、F3、F6, 后酵阶段的第 3、6、9、12、15 天依次标记为 Z3、Z6、Z9、Z12、Z15。每个实验组均设 3 个平行样本, 以保证实验结果的可靠性。本课题组前期研究表明, 在前酵阶段的 F3、F6 以及后酵阶段的 Z6、Z12 这 4 个时间点是淡豆豉炮制中 AFs 含量明显变化的关键时间点^[6], 因此, 本实验通过检测各组在这 4 个时间点样品中 AFs 含量, 来考察在不同条件下, 淡豆豉自然炮制过程中的环境因素对 AFs 产生的影响。

表 1 设置不同条件下淡豆豉自然炮制的实验分组

Table 1 Experimental group of natural processing of SSP under different conditions

组别	温度/℃	湿度/%	“再闷”阶段是否水封
1	30±2	70±5	水封
2	30±2	70±5	不水封
3	25±2	70±5	水封
4	35±2	70±5	水封
5	30±2	50±5	水封
6	30±2	90±5	水封

2.2 自然炮制过程豆粒的温度、含氧量、AW

2.2.1 温度 将 3 个数显温度计的探头置于发酵物内部两端及中间 3 个不同位置, 温度计的显示器置于发酵竹篓(前发酵过程)或发酵罐(“再闷”过程)外, 每日同一时间点记录温度值, 取平均值作为该时间点的温度测量结果。

各组不同时间点温度测得值见图 1。组 1 的前酵阶段豆粒温度由室温逐渐升高至 35℃左右, 后酵阶段温度稳定在 30.5~31.3℃; 组 2 的 F3 取出翻动时气温低, 至 F4 温度有所下降, 组 4 和组 6 在 F3 达到最高温度, 分别为 37.8℃和 38.2℃, F4 至 F6 温度逐渐下降; 组 3 和组 5 前酵阶段的温度变化趋势与组 1 相似, 但各时间点的温度都更低; 在后酵阶段, 组 1、组 3~6 后酵阶段的豆粒温度均与各组设置温度基本一致, 组 2 后酵(不水封)过程中, Z1 温度急剧升高至 42.1℃, 之后逐渐下降。综合以上情况可以发现, 设置不同的温度、湿度、含氧量条件下, 各时间点的温度差异较大。

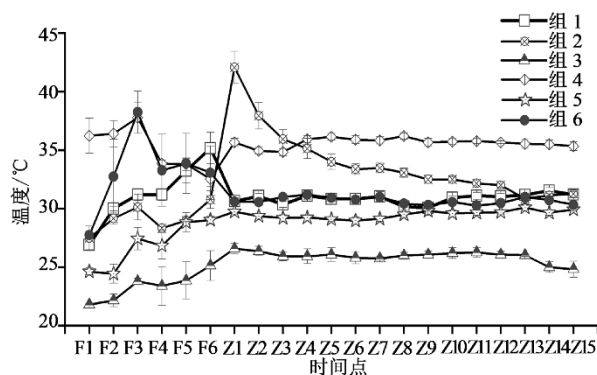


图 1 各组每天温度变化

Fig. 1 Daily temperature changes in each groups

2.2.2 含氧量 按仪器使用说明进行操作。检测前先标定显示器上数据为 21.0%, 然后将检测装置快速接入发酵罐外端的通气孔, 缓慢抽动检测装置的另一根通气管 2~3 次后, 待测氧仪显示器读数稳定后读取含氧量, 取平均值作为该时间点的含氧量测量结果。组 1 前酵阶段的发酵物内含氧量稳定在 20.6%~20.8%, 后酵水封“再闷”阶段的罐内各组不同时间点含氧量在 0.7%~2.0%; 组 3~6 整个炮制过程中的含氧量检测值与组 1 均一致; 组 2 后酵阶段罐内含氧量为 20.5%~20.7%。以上结果表明, 水封“再闷”为低含氧量环境, 不水封“再闷”为高含氧量环境。

2.2.3 AW 设置室温为 (25±1)℃, 使用氯化镁饱和溶液 (25℃, 标准 AW 为 0.328) 以及氯化钠饱和溶液 (25℃, 标准 AW 为 0.753) 校正水分活度仪。将待测豆粒样品置于 25℃室温平衡 0.5 h 再检测, 取平均值作为该时间点的 AW 测量结果。各组不同时间点 AW 值见图 2。组 1 在 F0、F3、F6 时 AW 分别为 0.959、0.948、0.928; 后酵阶段 AW 从 0.938 逐渐降至 0.877。其他组 AW 变化趋势与组 1 基本一致; 组 4、组 5 在 F6 时的 AW 下降更明显, 组 2、组 3 后酵阶段的 AW 明显高于其他组。

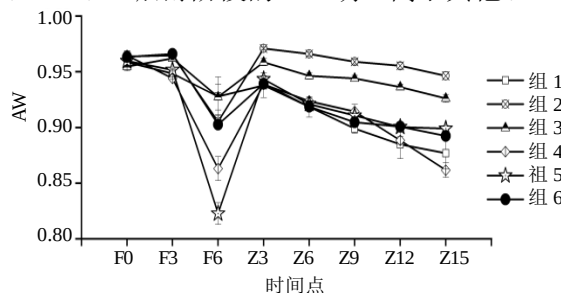


图 2 各组不同时间点 AW 值

Fig. 2 AW at different time points in each group

2.3 UPLC-MS/MS 法检测 AFs

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD-CN16-G034 (100 mm×2.1 mm, 3 μm); 柱温 40 °C; 流动相为甲醇 (A) -0.1%甲酸水 (B) 溶液; 洗脱梯度: 0~0.5 min, 40% B; 0.5~2.5 min, 60% B; 2.5~6.0 min, 95% B; 6.0~7.0 min, 40% B, 体积流量 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 1 μL。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源, ESI⁺扫描模式, 多反应监测方式检测; 喷雾电压为 5.5 kV; 离子源温度为 550 °C; 4 种 AFs 成分质谱分析参数见表 2。

2.3.3 对照品溶液的制备 混合对照品溶液 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 质量浓度分别为 2.0、0.5、2.0、0.5 μg·kg⁻¹), 精密稀释得质量浓度分别为 500.0、250.0、100.0、50.0、25.0、20.0、10.0、5.0、2.5、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1 ng·mL⁻¹ (均以 AFB₁ 质量浓度为例) 的混合对照品溶液。

2.3.4 供试品溶液的制备 参考本课题组已建立的方法制备供试品溶液^[6]。

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.3”项下各混合对照

表 2 4 种 AFs 的质谱参数

Table 2 Mass spectrometric parameters of four AFs

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/ V	碰撞电压/ V
AFB ₁	313	285	110	33
		270	110	38
		257	110	33
AFB ₂	315	287	110	37
		259	110	40
AFG ₁	329	243	100	37
		283	100	34
AFG ₂	331	285	110	39
		257	110	45

品溶液, 按“2.3.1”“2.3.2”项下方法检测, 以对照品质量浓度为横坐标 (*X*), 对应峰面积作纵坐标 (*Y*) 绘制标准曲线。因各样品中测得的 AFB₁、AFB₂ 质量浓度差异较大, 均绘制了低浓度、高浓度范围的标准曲线方程, 测得样品中的 AFG₁、AFG₂ 质量浓度均很低, 均只绘制了低浓度范围的标准曲线方程, 并以 *S/N*=3 时的质量浓度作为检测限, *S/N*=10 时的质量浓度为定量限, 结果见表 3。

表 3 回归方程、线性范围及检测线、定量限

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linearity ranges, LODs and LOQs

名称	线性方程	相关性 (<i>r</i>)	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检出限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
AFB ₁	Y=8 102.6 X-293.16	0.999 7	0.2~10.0	0.06	0.21
	Y=6 263.2 X+48950	0.999 3	10~500		
AFB ₂	Y=5 961.4 X+482.45	0.999 3	0.50~6.25	0.10	0.35
	Y=5 535.2 X+2 589.9	0.999 7	2.5~62.5		
AFG ₁	Y=5 219.4 X-207.25	0.999 1	0.5~10.0	0.09	0.32
AFG ₂	Y=1 200.1 X+179.81	0.999 6	0.5~12.5	0.13	0.41

2.3.6 精密度考察 取 AFs 混合对照品溶液按“2.3.1”“2.3.2”项下方法连续进样 6 次, 计算 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 峰面积的 RSD 分别为 1.70%、1.59%、2.49%、0.64%, 表明仪器精密度良好。

2.3.7 重复性考察 平行取空白 F0 样品粉末 7 份, 各加入混合对照品溶液 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 质量浓度分别为 10.0、2.5、10.0、2.5 ng·g⁻¹), 按“2.3.4”项下方法制备供试品溶液, 取其中 6 份供试品溶液, 按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样检测, 计算各样品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 平均质量分数分别为 9.39、2.33、9.35、2.36 ng·g⁻¹, RSD 分别为 1.44%、1.37%、1.58%、2.30%, 表明方法重复性良好。

2.3.8 稳定性考察 取“2.3.7”项下 F0 供试品溶液 1 份, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 计算样品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 平均质量分数分别为 9.38、2.34、9.33、2.35 ng·g⁻¹, RSD 分别为 1.39%、2.96%、2.59%、2.14%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.9 加样回收率考察 平行取空白 F0 样品粉末 9 份, 分别精密加入低、中、高 3 种质量浓度的 AFs 混合对照品溶液 (1.0、5.0、10.0 ng·g⁻¹, 均以 AFB₁ 为例), 每种质量浓度各 3 份, 按“2.3.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样检测, 计算 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 加样回收率分别为 92.81%、89.85%、90.50%、91.20%, RSD 分

别为 3.21%、3.50%、3.33%、3.69%，表明方法准确度良好。

2.3.10 样品检测 分别精密称取各组样品，按“2.3.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样，进行含量测定，根据样品检测的浓度值范围，将峰面积值代入相应线性范围内的标准

曲线方程中，计算得到相应的浓度值。结果见图 3 和表 4。

自然发酵各组样品中的 AFs 以 AFB₁ 为主，其次是 AFB₂，而 AFG₁、AFG₂ 在所有样品中均未被检出；各组不同时间点 AFs 含量呈先上升后下降的趋势，仅组 4 在 Z12 时含量略有升高。

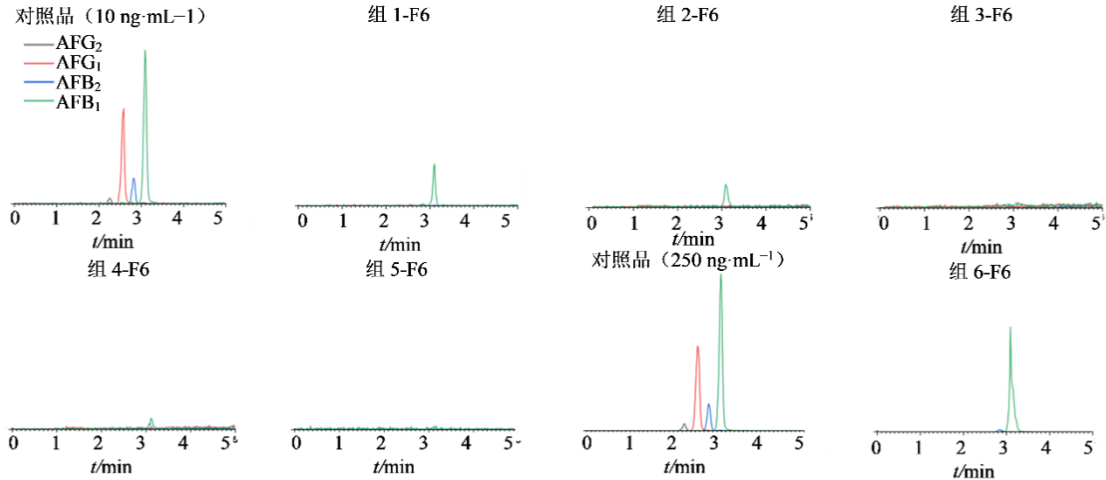


图 3 对照品及各组 F6 样品的液-质色谱图
Fig. 3 HPLC-MS/MS chromatogram of control and F6 samples from each group

表 4 各组 4 个时间点的 AFB₁、AFB₂ 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 4 Content of AFB₁ and AFB₂ at four time points in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	时间	AFB ₁ /(μg·kg ⁻¹)	AFB ₂ /(μg·kg ⁻¹)	样品	时间	AFB ₁ /(μg·kg ⁻¹)	AFB ₂ /(μg·kg ⁻¹)
组 1	F3	0.45±0.10	0.00±0.00	组 4	F3	0.17±0.05	0.00±0.00
	F6	3.68±0.40	0.93±0.09		F6	1.05±0.12	0.00±0.00
	Z6	1.33±0.14	0.33±0.05		Z6	0.71±0.05	0.00±0.00
	Z12	0.00±0.00	0.00±0.00		Z12	1.28±0.13	0.00±0.00
组 2	F3	0.27±0.06	0.00±0.00	组 5	F3	0.18±0.04	0.00±0.00
	F6	2.55±0.39	0.26±0.00		F6	0.29±0.07	0.00±0.00
	Z6	0.40±0.12	0.00±0.00		Z6	0.00±0.00	0.00±0.00
	Z12	0.21±0.08	0.00±0.00		Z12	0.00±0.00	0.00±0.00
组 3	F3	0.47±0.11	0.00±0.00	组 6	F3	0.28±0.06	0.00±0.00
	F6	0.76±0.14	0.00±0.00		F6	129.44±17.13	29.67±3.32
	Z6	0.00±0.00	0.00±0.00		Z6	37.92±2.20	7.51±1.18
	Z12	0.00±0.00	0.00±0.00		Z12	7.13±0.82	1.65±0.13

2.3.11 单因素方差分析 以组 1 为标准组，考察不同环境条件对淡豆豉自然炮制过程中不同时间点 AFB₁ 含量的影响。不同温度、湿度、是否水封“再闷”条件下各时间点 AFB₁ 含量均有不同程度的显著性差异 P 值见表 5，由表 4 和 5 可知：AFB₁ 含量在 F6、Z6 时组 1 显著高于组 3、组 4、组 5，而低于

组 6，表明温度过低或过高均不利于 AFs 的产生，而湿度越高越利于 AFs 的产生。组 1 的 AFB₁ 含量显著高于组 2，由图 1 可知，组 2 前酵阶段的豆粒温度低于组 1，而后酵阶段的豆粒温度又高于组 1 许多，温度仍然可能是导致两组 AFs 含量差异的重要原因之一。组 1、组 3、组 5 的 Z12 时 AFs 含量均为 0，

表 5 不同环境条件下炮制淡豆豉中的 AFB₁ 含量单因素方差分析结果 (P 值)

Table 5 Analysis results by ANOVA of AFB₁ content in SSP under different processing conditions (P value)

时间	不同温度			不同湿度			是否水封“再闷”
	组 1vs 组 3	组 1vs 组 4	组 3vs 组 4	组 1vs 组 5	组 1vs 组 6	组 5vs 组 6	组 1vs 组 2
F3	0.797	0.009**	0.007**	0.005**	0.030*	0.172	0.056
F6	<0.001***	<0.001***	0.212	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.022*
Z6	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***
Z12	1.000	<0.001***	<0.001***	1.000	<0.001***	<0.001***	0.009**

各组间两两比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001。

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs different group.

表明发酵过程中合适的温度、湿度以及严格的水封“再闷”对淡豆豉中 AFs 污染防控均非常关键。

2.3.12 不同炮制环境与 AFs 的相关性分析 采用 SPSS21.0 对各组不同时间点样品的 AFs 含量与各样品所处的温度、湿度值以及是否水封“再闷”条件进行 Pearson 相关性分析。结果见表 6, 发酵豆粒中 AFB₁、AFB₂ 含量只与湿度呈显著性正相关 (P<0.05), 说明湿度对淡豆豉发酵过程中的 AFs 含量影响最大。且由表 4 可知, 6 个组中仅组 6 的 F6、Z6、Z12 中 AFB₁ 含量均超过了《中国药典》中药饮片限量标准 (5 μg·kg⁻¹)。可见湿度是影响淡豆豉炮制过程中 AFs 含量的主要因素。

表 6 AFs 含量与培养温度、湿度以及是否水封“再闷”的相关性分析

Table 6 Correlation analysis of AFs content with culture temperature, humidity and whether "secondary fermentation" sealed

AFs	相关性		
	温度	湿度	是否水封“再闷”
AFB ₁	-0.002	0.437*	0.119
AFB ₂	0.000	0.425*	0.120

*P<0.05

2.4 模拟自然炮制条件考察炮制原料、“再闷”含氧量对产毒黄曲霉菌标准株产 AFB₁ 能力的影响

2.4.1 设定不同条件培养产毒标准黄曲霉菌 按本课题组自然炮制方法制备青蒿、桑叶药汁^[4], 吸取 8 mL 药汁于 10.0 g 已灭菌的黑豆中, 置 4 °C 冰箱 48 h 至药汁吸收达饱和状态; 用马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 活化产毒株, 配制 1×10⁷ CFU·mL⁻¹ 的孢子悬液。吸取 100 μL 孢子悬液分别接种至浸泡了药汁的黑豆固体培养基 (以 S 表示) 和 25 mL 的马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB) 培养基 (黄曲霉菌常规产毒培养基) 中 (以 P 表示), 每种接种产毒株的培养基各平行制备 12 份。

随机取 S、P 各 6 份置于发酵罐内发酵中的豆粒上方 (用 N 表示), 记为 S-N、P-N, 模拟淡豆豉自然发酵“再闷”环境中培养; 剩余 S、P 置罐外 (用 W 表示), 记为 S-W、P-W, 为“再闷”环境对照样品。密封的发酵罐和罐外的培养瓶均置于温度 30 °C、湿度 70% 的恒温培养箱避光培养, 第 3 天取出所有的培养瓶, 并翻动罐内发酵的豆粒, 罐内培养的培养瓶放回密封罐中, 所有培养瓶放回培养箱中继续培养 3 d。培养结束后, 每种培养瓶各取 3 份用于测 AFB₁ 含量, 剩余样品用于提取菌株 RNA。

2.4.2 观察各纯培养瓶中黄曲霉菌生长情况 各样品中, 罐外 P-W、S-W 生长菌丝后并产生了大量孢子, 而罐内 P-N、S-N 生长量相比罐外更少, 且肉眼和显微镜下均未见分生孢子的产生。各培养瓶内菌株生长情况见图 4。



图 4 各纯培养样品中黄曲霉菌生长情况

Fig. 4 Growth status of *Aspergillus flavus* in each pure culture sample

2.4.3 各纯培养物样品中 AFB₁ 含量的检测 黑豆培养基培养的样本参照马书伟等^[6]方法制备供试品, PDB 培养瓶中样本参照李春玲等^[5]方法制备供试品。按照“2.3”项方法学检测并计算 AFB₁ 质量浓度, 结果见表 7。

与常规产毒培养基中培养的 P-W 样品中产毒总量相比, P-N 中 AFB₁ 减少 99.93%。S-W 中 AFB₁ 减少 95.31%, S-N 中 AFB₁ 减少 99.97%, 可见炮制原料 (浸泡了药汁的黑豆) 和水封“再闷”环境均

能很大程度地抑制标准黄曲霉菌的产毒量。

2.4.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测关键基因相对表达量 用 Oligo 7 软件设计相应基因的引物, 以 β -*tub* 基因为内参基因, 各基因引物序列见表 8。

取“2.4.1”项下各培养瓶剩余 3 份样品中菌体用液氮研磨, 用 M5 Plant RNeasy Plus Mini Kit 试剂提取总 RNA; 参照本课题组已建立的 qRT-PCR 法检测各基因的 C_t 值^[9]。

以 P-W 为参考对照, qRT-PCR 检测的 C_t 值结果使用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量值, (组间

比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义), 结果见表 7。由表 7 可知, 与 P-W 中各关键基因相比较的结果表明, P-N 中, *aflR*、*aflD* mRNA 表达量无显著变化 ($P>0.05$), *aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达量显著下调 ($P<0.001$); S-W 中 *aflR*、*aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达显著下调 ($P<0.05$ 、 0.001), *aflD* mRNA 表达显著上调 ($P<0.001$); S-N 中 *aflD*、*aflR*、*aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达均显著下调 ($P<0.05$ 、 0.001), 且以 *aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达下调更显著。

表 7 纯培养各样品中 AFB ₁ 含量以及各基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)						
Table 7 AFB ₁ content and mRNA relative expression of each gene in pure culture samples ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)						
样品	AFB ₁ / (P-ng·mL ⁻¹ ; S-μg·kg ⁻¹)	<i>aflR</i> /β- <i>tub</i>	<i>aflD</i> /β- <i>tub</i>	<i>aflM</i> /β- <i>tub</i>	<i>aflO</i> /β- <i>tub</i>	<i>aflQ</i> /β- <i>tub</i>
P-W	4 495.50±62.60	1.000±0.016	1.000±0.080	1.000±0.030	1.000±0.09	1.000±0.103
P-N	3.06±0.13	1.001±0.033	0.954±0.388	0.021±0.008***	0.004±0.002***	0.002±0.001***
S-W	527.13±7.98	0.677±0.129*	1.928±0.113***	0.047±0.007***	0.142±0.014***	0.024±0.005***
S-N	3.34±0.12	0.236±0.016***	0.804±0.023*	0.019±0.002***	0.013±0.002***	0.008±0.001***

与 P-W 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs P-W.

表 8 qRT-PCR 引物信息	
Table 8 Primer sequences for qRT-PCR	
引物名称	引物序列 (5'→3')
β- <i>tub</i>	F: TGAGCCCTACAACGCCACT
	R: TGGTTCAGGTCACCGTAAGAGG
<i>aflR</i>	F: CCTTCTCTACTACTCGGGTTT
	R: GCAGGTAATCAATAATGTCGG
<i>aflD</i>	F: GCCTGAGGAGACGGTGTATT
	R: GTGCTTTTGGGACGTTGGAG
<i>aflM</i>	F: ATTGTATCGTTCGGTCACCTG
	R: TCACGCAAGCAGTGTTAGAGC
<i>aflO</i>	F: GAGCAGTGGACCCCTACAAG
	R: GACCAAGGAGTCTGGGAGAAG
<i>aflQ</i>	F: CCGAACGCAATAGGCAAGCA
	R: CAACAAGAACCGTCGAATCCC

3 讨论

本研究结果显示, 不同条件下自然炮制的淡豆豉中, 只检出 AFB₁、AFB₂, 与本课题组前期检测结果一致^[6], 不同来源的黄曲霉菌产毒类有差异^[10], 在淡豆豉炮制过程中的黄曲霉菌可能只产 B 簇 AFs。陈彤等^[11]研究显示相对湿度高于 75.3%时, AFB₁ 含量成倍增加。本实验研究结果表明, 不同温度、湿度、是否水封“再闷”对自然炮制中不同时

间点 AFB₁ 含量均有不同程度的差异, 但以湿度影响最为显著, 且湿度为 90%时, 发酵豆粒中 AFs 含量急剧增加。

黄曲霉菌最适产毒温度为 28~30 ℃, AW 越高越有利于 AFs 毒素的合成, 不同基质中碳源和氮源的差异是影响 AFs 产生的重要原因, 抗氧化环境下能抑制 AFs 的合成, 但 AW、温度、基质等环境因子之间有着非常复杂的互相影响和交互调控作用^[12]。在不同条件下自然炮制淡豆豉过程中的温度、AW、含氧量变化差异较大, 可能存在特有的交互影响作用。组 2 的 Z6 (高含氧量) AFB₁ 含量显著低于组 1 (低含氧量), 而纯培养实验中罐外 (高含氧量) 黑豆基质培养的产毒株产 AFB₁ 含量显著高于罐内 (低含氧量); 组 2 在 Z1~Z6 时温度由 42.1 ℃降至 33.4 ℃, 而温度高于 36 ℃时基本停止产毒^[12], 温度过高可能是影响组 2“再闷”过程中产毒量低的重要原因。从各组自然发酵过程中温度、AW 值的动态变化推测, 外界环境因素设定值的不同可能导致淡豆豉发酵过程中生物、非生物、环境因素改变, 从而导致“再闷”含氧量在自然炮制中与纯种培养时对 AFs 含量的影响出现了相反的结果。

邢福国等^[12]指出施用抗氧化剂, 例如肉桂醛、

丁香酚、抗坏血酸等, 都能够在一定程度抑制 AFs 合成。在纯培养产毒菌的实验中, 水封“再闷”环境下, 产毒量减少了 99.93% 及以上, 并限制了分孢子的产生, 可见低含氧量环境下能抑制黄曲霉菌的生长和产孢, 低含氧量环境的氧化应激可能是水封“再闷”过程中减少产毒量的重要原因。Rao 等^[13]以及 Abd El-Aziz ARM 等^[14]均将 AFs 相关基因分为早期途径基因 (*aflD* 和 *aflR*)、中期途径基因 (*aflM*) 和晚期途径基因 (*aflO*、*aflQ*), 且与产毒株相比, 非产毒株在 AFs 合成的中晚期基因表达中存在缺陷或下调, 表明这些非产毒株可能在 AFs 合成的早期阶段与产毒株相似, 但在中晚期出现差异, 本实验中, 产毒株在黑豆基质上和水封“再闷”环境下均以下调 *aflM*、*aflO*、*aflQ* mRNA 表达量更明显, 可见炮制环境也可能是主要通过抑制中晚期基因的表达而降低黄曲霉菌产毒能力。P-N 中 *aflR*、*aflD* mRNA 表达没有显著变化, S-W 中 *aflR*、*aflD* 分别为显著下调和极显著上调, 但 S-N 中的 *aflR*、*aflD* 分别是极显著下调和显著下调, S-N 有炮制原料和“再闷”环境的双重调控作用, 可能是两者交互作用促进了对 *aflR*、*aflD* 的下调能力。

综上所述, 本研究结果表明, 湿度是控制淡豆豉自然炮制过程中 AFs 含量的关键, 炮制原料 (药汁浸泡的黑豆基质) 和密封“再闷”环境均能极大程度地降低产毒株的产毒能力。后续实验中, 本课题组将进一步研究炮制过程中的温度、AW、含氧量等环境因素的交互影响对 AFs 合成的调控作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020. Pharmacopocia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 赵佳琪, 王满元, 陈红, 等. 淡豆豉发酵制备过程异黄酮变化规律研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(10): 1788-1795. Zhao J Q, Wang M Y, Chen H, et al. Changes of isoflavones during fermentation process of *sojae Semen praeparatum* [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(10): 1788-1795.
- [3] 郑宏宇, 陈丽艳, 孙银玲, 等. 黑豆品种及后酵时间对淡豆豉中四种大豆异黄酮含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2158-2161. Zheng H Y, Chen L Y, Sun Y L, et al. Effect of black bean varieties and post-fermentation time on the contents of four soybean isoflavones in *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(9): 2158-2161.
- [4] 陈青峰, 贺婧, 谢小梅, 等. 淡豆豉炮制中 γ -氨基丁酸含量测定及其抗抑郁作用研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 688-694. Chen Q F, He J, Xie X M, et al. Determination of content of γ -aminobutyric acid and its antidepressant effect at different time points during processing of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(4): 688-694.
- [5] 李春玲, 贺婧, 王立元, 等. 淡豆豉炮制中黄曲霉毒素产毒株的筛选鉴定和产毒能力测定 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1411-1417. Li C L, He J, Wang L Y, et al. Screening, identification and toxin-producing ability analysis of aflatoxin-producing strains in processing of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(5): 1411-1417.
- [6] 马书伟, 李春玲, 周鸿, 等. 淡豆豉炮制过程中黄曲霉毒素含量的动态变化规律分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(21): 2216-2219, 2229. Ma S W, Li C L, Zhou H, et al. Analysis of dynamic change law of aflatoxin content in processing of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(21): 2216-2219, 2229.
- [7] 李刚, 李翠英, 戴家齐, 等. 不同产地淡豆豉多指标成分含量测定的质量和安全性评价 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(7): 1738-1741. Li G, Li C Y, Dai J Q, et al. Quality and safety evaluation of multi-compound determination of *Sojae Semen Praeparatum* from homemade and different origins [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(7): 1738-1741.
- [8] 尹宁宁, 周黎明, 刘军田, 等. HPLC 法同时测定 21 种中药饮片 4 种黄曲霉毒素的含量 [J]. 山东中医杂志, 2019, 38(11): 1067-1071. Yin N N, Zhou L M, Liu J T, et al. Simultaneous determination of content of four aflatoxins in 21 kinds of traditional Chinese medicine decocting pieces by high performance liquid chromatography [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2019, 38(11): 1067-1071.
- [9] 戴家齐, 贺婧, 朱晓蓝, 等. 淡豆豉中产 γ -氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌的拮抗作用和毒素合成关键基因 mRNA 表达的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1510-1517. Dai J Q, He J, Zhu X L, et al. Antagonistic effects of γ -amino butyric acid-producing microorganisms existing in the fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* on toxigenic *Aspergillus flavus* and effects on the mRNA expression of key genes for toxin synthesis [J]. Chin Tradit

- Herb Drugs, 2024, 55(5): 1510-1517.
- [10] 魏娜, 张飞龙. 西藏高原粮油作物曲霉菌污染及菌株产毒力研究 [J]. 中国粮油学报, 2024, 39(2): 31-37.
- Wei N, Zhang F L. *Aspergillus* pollution and toxigenicity of grain and oil crops in Tibet [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2024, 39(2): 31-37.
- [11] 陈彤, 王常青, 李小凡, 等. 间接 ELISA 检测不同贮存条件下花生中黄曲霉毒素 B1 [J]. 中国油脂, 2014, 39(9): 88-91.
- Chen T, Wang C Q, Li X F, et al. Determination of aflatoxin B1 in peanut under different storage conditions by indirect ELISA [J]. China Oils Fats, 2014, 39(9): 88-91.
- [12] 邢福国, 李旭, 张晨曦. 黄曲霉毒素的产生机制及污染防控策略 [J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 13-26, 64.
- Xing F G, Li X, Zhang C X. Biosynthesis mechanisms and control strategies of aflatoxin [J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(1): 13-26, 64.
- [13] Raksha Rao K, Vipin A V, Venkateswaran G. Molecular profile of non-aflatoxigenic phenotype in native strains of *Aspergillus flavus* [J]. Arch Microbiol, 2020, 202(5): 1143-1155.
- [14] Abd El-Aziz A R M, Shehata S M, Hisham S M, et al. Molecular profile of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* isolated from stored maize [J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(2): 1383-1391.

[责任编辑 孙英杰]