

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

李春玲^{1,4}, 贺婧^{2#}, 王立元¹, 李翠英¹, 龙凯¹, 翁美芝¹, 冯驰^{3*}, 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. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006
4. 广州医科大学附属第六医院 泌尿外科, 广东 清远 511500

摘要: 目的 对淡豆豉炮制过程中产黄曲霉毒素(aflatoxins, AFTs)的微生物(简称产毒菌)进行筛选鉴定、定量分析和产毒能力测定。方法 运用紫外荧光法初筛淡豆豉炮制中各样本的产毒菌并菌落计数;对初筛菌株的 18S rDNA 序列进行 PCR 扩增、测序,测序结果经 NCBI 同源性比对、MEGA 7.0 软件构建系统发育树进行分子生物学鉴定;应用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测各产毒菌培养液中 AFTs 含量,确定各产毒菌的产毒能力。结果 紫外荧光法结合分子生物学共筛选鉴定出 15 株产毒菌株,为黄曲霉和溜曲霉;“黄衣上遍”阶段产毒菌菌落数逐渐增多,至发酵第 6 天时最多,为 $1 \times 10^{6.30}$ CFU/g,进入“再闷”阶段产毒菌数量逐渐减少,从再闷第 9 天开始至第 15 天均未检测到产毒菌;经 UPLC-MS/MS 法确定 15 株菌中有 5 株不产毒,10 株产毒,且产毒能力各不相同并均低于 5 ng/mL,远低于黄曲霉标准株(654.90 ng/mL)。结论 淡豆豉炮制过程中存在产 AFTs 能力不同的黄曲霉、溜曲霉且产毒菌数量呈现先升后降,将为探讨淡豆豉炮制中 AFTs 消长机制奠定基础,并首次从安全性角度证实了淡豆豉“再闷”的重要作用和“再闷”时间的合理性。

关键词: 淡豆豉; 炮制过程; 黄曲霉毒素; 产毒能力; 超高效液相色谱-串联质谱技术; 黄曲霉; 溜曲霉

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)05-1411-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.016

Screening, identification and toxin-producing ability analysis of aflatoxin-producing strains in processing of *Sojae Semen Preparatum*

LI Chun-ling^{1,4}, HE Jing², WANG Li-yuan¹, LI Cui-ying¹, LONG Kai¹, WENG Mei-zhi¹, FENG Chi³, XIE Xiao-mei¹

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, China
3. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China
4. Department of Urology, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan 511500, China

Abstract: Objective Aflatoxins (AFTs) producing strains (referred to as toxin-producing microorganism) during the processing of *Sojae Semen Preparatum* (SSP) were screened, identified, quantitatively analyzed, and tested for their toxin-producing ability.

Methods Preliminary screening of various toxin-producing microorganism in SSP processing by ultraviolet fluorescence method, then count the colonies; Analyse the 18S rDNA of those strains by PCR amplification and sequencing. The sequences are compared by NCBI homology, and the phylogenetic tree be constructed by MEGA 7.0 for molecular biology identification; Ultra performance liquid

收稿日期: 2021-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060709); 国家自然科学基金项目(81660664); 江西省重点研发计划一般项目(20192BBGL70051); 江西省教育厅科技研究项目(GJJ190634); 江西省科技计划项目(20203BAAW208025)

作者简介: 李春玲(1994—), 女, 广西桂平人, 实习研究员, 硕士, 从事泌尿系统疾病防治研究。

Tel: 19970044053 E-mail: 2084073573@qq.com

***通信作者:** 谢小梅(1964—), 女, 江西永新人, 教授, 博士, 研究生导师, 从事微生物学研究。

Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

冯驰(1981—), 男, 江苏常州人, 主治医师, 硕士, 从事泌尿外科临床工作。Tel: 13970006959 E-mail: 306583866@qq.com

#并列第一作者: 贺婧(1990—), 女, 江西南昌人, 讲师, 博士, 从事微生物学研究。Tel: 15972204520 E-mail: 876401812@qq.com

chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were used to detect the AFTs content in the culture solution of each strain to determine their toxin-producing ability. **Results** Fifteen toxin-producing strains were screened and identified by ultraviolet fluorescence & molecular biology analyze, which were *Aspergillus flavus* or *A. tamarii*; During the processing of SSP, the toxin-producing microorganism gradually increased during the 'yellow cladding' stage, and it became the maximum at the 6th day, which was $1 \times 10^{6.30}$ CFU/g, then it gradually decreased in the 'secondary fermentation' stage, even no toxin-producing strains be found during day 9 to day 15; With UPLC-MS/MS, we found that five strains did not produce toxin, 10 strains produced toxin. Though they can make toxin, all the toxin the microorganism made below 5 ng/mL. It's much lower than *A. flavus* standard strain (654.90 ng/mL). **Conclusion** In the processing of SSP, some *A. flavus* and *A. tamarii* with different toxin-producing ability were found, and these strains increased at first and decreased later. This study will lay the foundation for studying the law and mechanism of AFTs content changing in SSP processing. It also proved the importance of 'secondary fermentation' and the rationality of 'secondary fermentation' time, from the perspective of safety for the first time.

Key words: *Sojae Semen Praeparatum*; processing; aflatoxins; toxin production capacity; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus tamarii*

淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* (SSP) 为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 成熟种子的发酵加工品, 以黑色种皮品系大豆为主料, 桑叶、青蒿为辅料经自然发酵而成。被历代本草和历版《中国药典》收录, 列入卫生部首批药食两用名单, 其味苦、辛, 性凉, 归肺、胃经, 具有解表、除烦、宣发郁热之功, 在心血管疾病、糖尿病、骨质疏松、乳腺癌及女性更年期综合征、抑郁症等重大疾病的预防和控制中有广阔应用前景^[1-3]。

黄曲霉毒素 (aflatoxins, AFTs) 是由黄曲霉 *Aspergillus flavus*、寄生曲霉 *A. parasiticus*、溜曲霉 *A. tamarii* 等曲霉产生的一类化学结构相似的次生代谢产物, 目前发现 AFTs 有 20 多种, 主要有黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (AFG₂), 其中以 AFB₁ 毒性最强。研究表明, 人和牲畜长期暴露于 AFTs 会导致其免疫抑制、营养代谢不良、不孕、先天畸形、内分泌紊乱以及严重的肝细胞癌变等, 并不是所有的黄曲霉、溜曲霉都产生 AFTs, 产毒黄曲霉占自然界中黄曲霉的 30%~60%, 非产毒黄曲霉常作为曲种应用于食品、中药等发酵工业中^[4-5]。

淡豆豉炮制时间较长, 一般 20 d 左右, 经过“黄衣上遍”和“再闷”2 个主要阶段, 在完全开放的炮制中每个过程都有可能污染黄曲霉、溜曲霉并产生 AFTs。本课题组前期已发现在淡豆豉炮制中 AFTs 含量呈动态变化, 并存在黄曲霉和溜曲霉^[6-8], 但未对它们是否产毒及产毒能力进行研究, 迄今仍无淡豆豉炮制中 AFTs 产毒菌的相关研究报道。本研究对淡豆豉炮制中 7 个不同时间点样本的产 AFTs 微生物进行筛选鉴定、菌落计数和产 AFTs 能力测定。研究结果将为揭示淡豆豉炮制过程中 AFTs 消长机

制奠定基础, 并对规范淡豆豉炮制工艺和保障其安全性有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MJ-150I 霉菌培养箱, 上海一恒科技有限公司; PTC-200 普通 PCR 仪, BIO-RAD 公司; Nexera X2 超快速液相色谱仪, 日本岛津公司; AB Sciex QTRAP 4500 三重四极杆线性离子阱串联质谱仪, 美国 AB Sciex 公司。

1.2 材料

1.2.1 实验菌株 产毒黄曲霉标准株, 购于中国普通微生物菌种保藏中心, 编号 CGMCC3.4408。

1.2.2 试剂 曲霉素琼脂培养基, 批号 20191026, 青岛高科技海博生物技术有限公司; AFTs 混合对照品 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂), 批号 CRM46300, 质量浓度分别为 1.0、0.3、1.0、0.3 μg/mL, 质量分数 ≥ 98.0%, Supelco 公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR master Mix, 批号 Cat#DP305-02、Cat.CW0632S, 北京天根生化科技有限公司; 2,6-二甲基-β-环糊精 (批号 402G021)、琼脂糖 (批号 1209B022), 索莱宝生物科技有限公司; Hypersil Gold (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 赛默飞世尔科技有限公司; 甲醇、乙腈, 批号 2003191、20022221, 上海易恩化学技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 淡豆豉炮制过程中各时间点样本制备和取样

本课题组前期参照《中国药典》2010 年版已建立规范的淡豆豉炮制工艺 (历版《中国药典》记载的淡豆豉制法相同, 含 2020 年版)^[6-9]。淡豆豉炮制过程中每 3 天取样 1 次, “黄衣上遍”阶段分别记为发酵初始、发酵 3 d、发酵 6 d, “再闷”阶段分别

记为再闷 3 d、再闷 6 d、再闷 9 d、再闷 12 d、再闷 15 d 和蒸后成品, 编号分别为 F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15、SSP。成品性状和各项理化指标均符合《中国药典》2020 年版要求。各样品尽快置于 4 ℃ 保存, 1 周内完成检测。

2.2 淡豆豉炮制过程中 AFTs 产毒菌的筛选、菌落计数

2.2.1 含 2,6-二甲基-β-环糊精的曲霉素琼脂培养基的配制 45.6 g 曲霉素琼脂培养基加入 2,6-二甲基-β-环糊精 6 g, 置 1000 mL 蒸馏水中加热溶解, 121 ℃ 灭菌 20 min。

2.2.2 AFTs 产毒菌的筛选和菌落计数 整个过程无菌操作。定量称取淡豆豉炮制过程中不同时间点样本, 研磨, 取研磨后的各样品 1 g 加 9 mL 无菌生理盐水制成 1:10 的稀释液, 充分振荡 30 min, 取 1 mL 稀释液加入另 1 支装有 9 mL 无菌生理盐水的离心管中, 依次进行 10 倍稀释, 使之分别成为 0.1、0.01、0.001、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 稀释液, 依据培养平板上的菌落数(肉眼可计数范围), 选择合适的 3 个不同浓度稀释液, F3、Z3、Z6 选择 0.001、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 稀释液, F6 选择 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 稀释液, Z9、Z12、Z15 选择 0.1、0.01、0.001 稀释液, 分别吸取 100 μL 稀释液注入含 2,6-二甲基-β-环糊精的曲霉素琼脂培养基平皿中, 用涂布棒涂布均匀, 每个稀释度重复 3 个平皿。于 28 ℃ 霉菌培养箱培养 5~8 d。

将长出菌落的平皿置紫外灯(波长 365 nm)下观察, 如菌落周围的培养基中出现蓝紫色或黄绿色荧光初步定为 AFTs 产毒菌, 对产生蓝紫色或黄绿色荧光的菌落进行计数, 挑取产荧光菌落再次划线分离、纯培养。用液体石蜡斜面保存初筛产毒菌株并编号, 如在“黄衣上遍”阶段第 3 天初筛到的产毒菌株编号为 F3-1、F3-2、F3-3 等, 第 6 天初筛到的产毒菌株编号为 F6-1、F6-2、F6-3 等; 在“再闷”

阶段第 3 天初筛到的产毒菌株编号为 Z3-1、Z3-2、Z3-3 等, 第 6 天初筛到的产毒菌株编号为 Z6-1、Z6-2、Z6-3 等。

2.2.3 淡豆豉炮制中各样本产荧光菌的菌落计数结果 炮制过程中产荧光的菌落数呈现先上升后下降的趋势, “黄衣上遍”阶段的发酵第 6 天时(F6)菌落数最多, 达 $1 \times 10^{6.30}$ CFU/g, 之后产荧光菌落数逐渐减少, 至再闷第 9 天后已没有产荧光菌, 表明产毒菌数量随炮制过程中生存环境的改变发生规律性变化; 且都是蓝紫色荧光的菌落, 可见产毒菌产生的 AFTs 以 AFB₁ 或 AFB₂ 为主, 各菌产 AFTs 的种类和含量还需用 UPLC-MS/MS 法验证, 结果见表 1 和图 1。

2.3 产 AFTs 菌株的鉴定

按植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取各菌株 DNA, 用 18S rDNA 通用引物 ITS1/ITS4 进行扩增, 引物序列为 ITS1: 5'-CTTGGTCATTAGAG-GAAGTAA-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系: 模板 DNA 2 μL, 上下游引物各 1 μL(浓度 10 μmol/L), 2×Taq PCR master Mix 12.5 μL, 补充 ddH₂O 至 25 μL。反应程序: 94 ℃、1 min; 94 ℃、30 s, 56 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 30 个循环; 72 ℃、10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将 PCR 产物送测序公司测序。测序结果在 NCBI 网站上比对、下载同源性高的序列及模式

表 1 淡豆豉炮制过程中不同时间点样本中产荧光的菌落数
Table 1 Colony number of fluorescence in samples at different time points during processing of SSP

样品	产生荧光的菌落数/ (CFU·g ⁻¹)	样品	产生荧光的菌落数/ (CFU·g ⁻¹)
F3	$1 \times 10^{4.52}$	Z9	0
F6	$1 \times 10^{6.30}$	Z12	0
Z3	$1 \times 10^{5.37}$	Z15	0
Z6	$1 \times 10^{3.52}$		

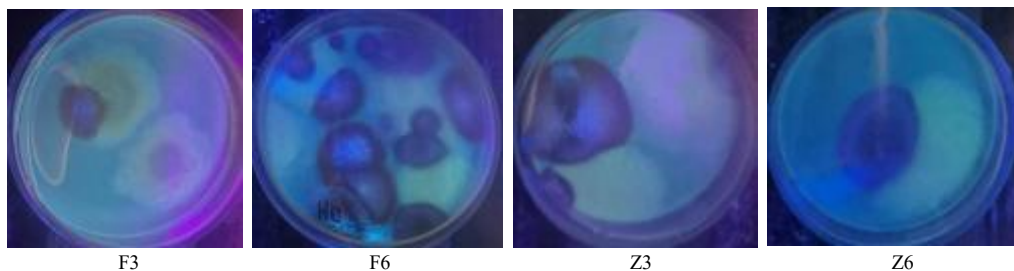


图 1 各样本培养皿中产生荧光现象的菌落

Fig. 1 Colonies producing fluorescence in each sample plate

菌株的序列在 MEGA 7.0 软件上建系统发育树。

扩增产物经测序、测序结果提交至 NCBI 的 GenBank 数据中进行 Blast 比对发现, F6-1、F6-2、F6-3、F6-4、F6-5、F6-6、F3-1、Z6-1、Z3-2、Z3-5 与黄曲霉的同源性达 100%, Z3-1、Z3-3、Z3-4、Z3-6、Z3-7 与溜曲霉的同源性达 100%。选取同源性较高的模式菌株序列, 采用 MEGA 7 软件中的 NJ 法构建系统发育树, F6-1、F6-2、F6-3、F6-4、F6-5、F6-6、F3-1、Z6-1、Z3-2、Z3-5 与黄曲霉聚于一支, 亲缘关系最近, 鉴定为黄曲霉; Z3-1、Z3-3、Z3-4、Z3-6、Z3-7 与溜曲霉聚于一支, 亲缘关系最近, 鉴定为溜曲霉。“黄衣上遍”阶段中发酵第 3、6 天为黄曲霉, “再闷”阶段为黄曲霉和溜曲霉, 可见淡豆豉炮制过程中产 AFTs 菌以黄曲霉和溜曲霉为主。见表 2 和图 2。

2.4 UPLC-MS/MS 法测定产毒菌的产 AFTs 能力

2.4.1 色谱条件 Hypersil Gold (100 mm×2.1 mm, 3 μm); 柱温 25 °C; 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈; 梯度洗脱: 0~1.0 min, 35%乙腈; 1.0~2.5 min,

表 2 产荧光现象微生物 NCBI 基因序列比对结果

Table 2 Results of NCBI gene sequence alignment of fluorescence producing microorganisms

菌株编号	基因序列长度/bp	菌株名称	相似度/%	登录号
F3-1	553	<i>A. flavus</i>	100	MW699670
F6-1	549	<i>A. flavus</i>	100	MW699671
F6-2	550	<i>A. flavus</i>	100	MW699672
F6-3	568	<i>A. flavus</i>	100	MW699673
F6-4	551	<i>A. flavus</i>	100	MW699674
F6-5	460	<i>A. flavus</i>	100	MW699675
F6-6	550	<i>A. flavus</i>	100	MW699676
Z3-1	567	<i>A. tamarii</i>	100	MW699677
Z3-2	460	<i>A. flavus</i>	100	MW699678
Z3-3	566	<i>A. tamarii</i>	100	MW699679
Z3-4	565	<i>A. tamarii</i>	100	MW699680
Z3-5	547	<i>A. flavus</i>	100	MW699681
Z3-6	556	<i>A. tamarii</i>	100	MW699682
Z3-7	550	<i>A. tamarii</i>	100	MW699683
Z6-1	547	<i>A. flavus</i>	100	MW699684

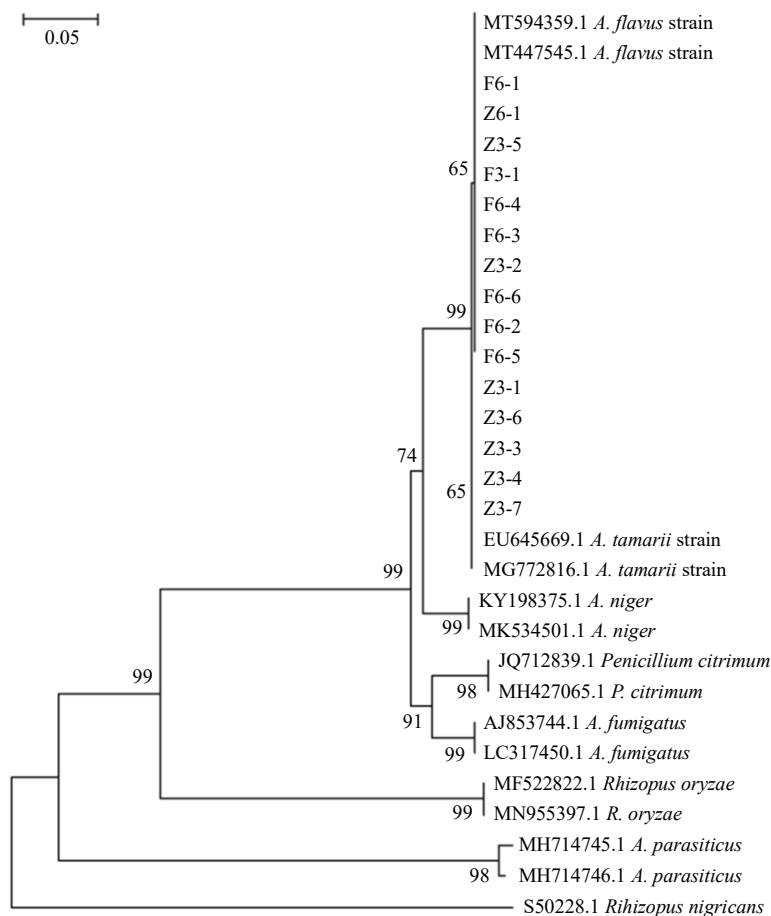


图 2 产荧光现象的曲霉菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Aspergillus* producing fluorescence

35%~50%乙腈; 2.5~3.0 min, 50%~80%乙腈; 3.0~3.1 min, 80%~35%乙腈; 3.1~5.0 min, 35%乙腈; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正离子模式; 离子喷射电压 (ion spray voltage, IS) 4.5 kV; 离子源温度 (ion source temperature, TEM) 500 $^{\circ}$ C; 雾化气 (nebulizer gas, GS1) 压力 310.264 kPa (45 psi), 加热气 (heater gas, GS2) 压力 344.738 kPa (50 psi), 帘幕气体 (curtain gas, N₂), 压力 241.316 kPa (35 psi)。扫描方式为多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。4 种黄曲霉毒素质谱分析参数见表 3。

表 3 4 种 AFTs 的其他质谱分析参数

Table 3 Mass spectrum analysis parameters of four types of AFTs

分析 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	313.0	285.1	150	32
		254.0	150	32
AFB ₂	315.0	287.1	156	35
		259.0	156	35
AFG ₁	329.0	243.0	150	36
		283.1	150	36
AFG ₂	331.1	285.1	60	37
		314.0	60	37

2.4.3 对照品溶液的制备 精密吸取 AFTs 混合对照品 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 质量浓度分别为 1.0、0.3、1.0、0.3 μ g/mL) 溶液 0.5 mL 于 1 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为储备液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱避光保存, 备用。

2.4.4 供试品溶液的制备 将保存的产毒菌和黄曲霉标准株分别进行活化, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 加入适量的无菌生理盐水洗脱孢子, 无菌纱布滤过以滤除菌丝球, 得到孢子悬浮液, 血球计数板计数, 调整孢子浓度为 $1 \times 10^{6.59}$ CFU/mL。吸取 2 mL $1 \times 10^{6.59}$ CFU/mL 各曲霉孢子悬浮液于 25 mL 液体发酵培养基中, 置 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 摇床中培养 5 d。分别吸取 1.5 mL 发酵液于 2 mL 离心管中, 10 000 $\times$ g 离心 10 min, 取 1 mL 各发酵上清液用氮气吹至近干, 加甲醇复溶, 12 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜滤过, 上机测定。

2.4.5 线性关系考察 从储备液中精密吸取 0.1 mL

于 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为工作液。精密量取工作液, 用甲醇稀释成建立标准曲线所用系列质量浓度的对照品溶液, 混匀, 上机测定。将质量浓度作为横坐标 (*X*), 各质量浓度对应的峰面积作纵坐标 (*Y*), AFB₁ 的标准曲线方程为 $Y=35\,783X+12\,495$, $r=0.999\,6$; AFB₂ 的标准曲线方程为 $Y=38\,106X+3\,381.7$, $r=0.999\,6$; AFG₁ 的标准曲线方程为 $Y=22\,839X+7\,820.1$, $r=0.999\,5$; AFG₂ 的标准曲线方程为 $Y=9\,212.8X+1\,372.9$, $r=0.999\,6$ 。AFB₁、AFG₁ 在 0.80~25.60 ng/mL 线性关系良好, AFB₂、AFG₂ 在 0.24~7.68 ng/mL 线性关系良好。

2.4.6 精密度考察 配制 AFTs 混合对照品溶液 (AFB₁ 和 AFG₁ 质量浓度为 5 ng/mL, AFB₂ 和 AFG₂ 质量浓度为 1.5 ng/mL), 按“2.4.1”“2.4.2”项条件, 连续重复进样 6 次, 计算峰面积, 结果 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 峰面积的 RSD 分别为 1.58%、2.51%、1.07%、1.27%, 表明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性考察 取无菌发酵液 1 份, 加 AFT 混合对照品 (AFB₁ 和 AFG₁ 加入量为 5 ng/mL, AFB₂ 和 AFG₂ 加入量为 1.5 ng/mL), 按“2.4.4”项方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”“2.4.2”项条件, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 测定, 以 4 种 AFT 含量来计算, RSD 分别为 1.64%、2.66%、1.16%、2.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性考察 平行取无菌发酵液 6 份, 精密加 AFTs 混合对照品 (AFB₁、AFG₁ 为 5 ng/mL, AFB₂、AFG₂ 为 1.5 ng/mL) 溶液, 按“2.4.4”项方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”“2.4.2”项条件, 分别进样 2 μ L 进行测定, 以 4 种 AFTs 质量分数来计算。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的 RSD 分别为 2.08%、3.50%、1.18%、1.66%, 表明该方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率考察 平行取无菌发酵液 6 份, 分别精密加入低、高 2 种质量浓度的 AFTs 混合对照品溶液 (AFB₁ 和 AFG₁ 分别添加 2、5 ng/mL 2 种质量浓度, AFB₂ 和 AFG₂ 分别添加 0.6、1.5 ng/mL 2 种质量浓度), 每种质量浓度各 3 份, 按“2.4.4”项方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”“2.4.2”项条件测定, 计算加样回收率, 4 种 AFTs 的加样回收率介于 91.47%~94.87%, RSD 在 1.01%~2.47%。

2.4.10 各菌产 AFTs 能力 按“2.4.4”项方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”“2.4.2”项条件测定, 计算各菌产 AFTs 的能力, 结果表明有 5 株菌不产 AFTs, 其中 3 株为黄曲霉, 2 株为溜曲霉; 有 10 株菌产

AFTs, 但它们产毒能力各不相同, 均在 5 ng/mL 以下, 远低于黄曲霉标准株 (CGMCC3.4408) 的产毒量 (654.90 ng/mL), 产毒菌仅产 AFB₁。结果见表 4 和图 3, 可见初筛的产毒菌其产毒能力各不相同。本实验初筛的 15 株产荧光菌经 UPLC-MS/MS 验证有 5 株菌未检测出 AFTs。

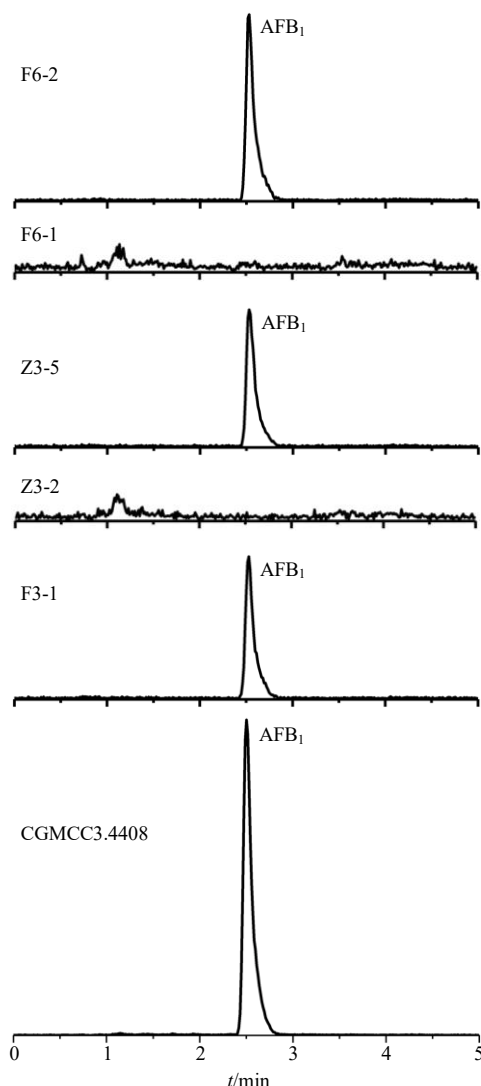
表 4 各菌产 AFB₁ 能力Table 4 AFB₁ production capacity of each microorganism

菌株编号	菌株名称	AFB ₁ /(ng·mL ⁻¹)
CGMCC3.4408	黄曲霉标准株	654.90
F6-2	黄曲霉	2.90
F6-3	黄曲霉	2.00
F6-4	黄曲霉	3.08
F6-6	黄曲霉	2.85
F3-1	黄曲霉	2.21
Z6-1	黄曲霉	4.10
Z3-5	黄曲霉	2.25
Z3-1	溜曲霉	2.14
Z3-4	溜曲霉	4.05
Z3-6	溜曲霉	3.19
F6-1	黄曲霉	0
F6-5	黄曲霉	0
Z3-2	黄曲霉	0
Z3-7	溜曲霉	0
Z3-3	溜曲霉	0

3 讨论

检测产 AFT 微生物目前有免疫学方法、化学方法和生物学方法。本实验采用紫外荧光法初筛产毒菌。根据 AFT 在紫外光照射下可发出荧光的原理, 将各样本接种于曲霉素琼脂培养基中, 培养 5~8 d, 黄曲霉等菌产生的 AFT 便浸入培养基中, 在紫外灯光照射下会产生特殊的荧光, AFB₁、AFB₂ 发蓝紫色荧光, AFG₁、AFG₂ 发绿色荧光。本实验在培养基加入了可增强荧光强度的化学物质环糊精, 可提高辨识度。此法操作较简单、便捷, 且成本低^[4], 可快速检测出大批量样品中是否有产 AFTs 的菌株。

通过紫外荧光检测法对 7 个不同炮制时间点样本中的产 AFTs 菌进行初筛并计数, 结果显示产荧光现象的微生物数量在淡豆豉炮制过程中呈现先上升后下降的趋势, “黄衣上遍” 阶段产荧光菌落数逐渐增加, 至发酵第 6 天时 (F6) 达到最大值, 为 $1 \times 10^{6.30}$ CFU/g, 之后开始下降, 至 “再闷” 第 9 天

图 3 各菌产 AFB₁ 能力液质色谱图Fig. 3 UPLC-MS/MS chromatogram of AFB₁ producing ability of each strain

(Z9) 后未检测到产荧光微生物。呈现这一趋势的原因可能是淡豆豉炮制过程中有多种微生物共同参与, 不同炮制时间点存在不同的优势菌^[6-8,10]。已有许多文献报道一些细菌和真菌具有抑制产 AFTs 菌生长繁殖的作用^[11-13]。

本实验室前期从淡豆豉炮制过程中分离的枯草芽孢杆菌、鲑色锁掷酵母菌、黑曲霉菌、屎肠球菌、鸟肠球菌对产 AFTs 黄曲霉的生长繁殖均有抑制作用, 并对 AFB₁ 有降解作用, 其中屎肠球菌、鸟肠球菌和枯草芽孢杆菌对产毒黄曲霉的抑制率均达 30% 以上, 鲑色锁掷酵母菌对产毒黄曲霉生长抑制作用最强达 64.29%, 降解 AFB₁ 效果最好, 达 43.65%^[10]。

紫外荧光法检测中发现只出现了产蓝紫色荧光

的菌落,未出现产绿色荧光的菌落,推测在淡豆豉炮制过程中存在的产毒菌以产生 AFB₁ 或 AFB₂ 为主,而使用 UPLC-MS/MS 法检测初筛产毒菌的产毒能力的结果显示,筛选到的产毒菌只产生 AFB₁,这与 AFB₁ 在自然界中产量最高、分布最广泛相一致。通过紫外荧光法对产 AFTs 菌进行初筛,共筛选出 15 株菌,并鉴定为黄曲霉和溜曲霉,其中黄曲霉占大多数,与自然界产 AFTs 菌中以黄曲霉为主相吻合。因此,在淡豆豉 AFTs 污染防控上,可以以筛选抑制黄曲霉生长繁殖和降解 AFB₁ 的菌株为主。

本研究通过 UPLC-MS/MS 法检测初筛产毒菌的产毒能力,结果显示,15 株初筛产毒菌中,有 5 株未检测到产 AFTs,表明通过紫外荧光法初筛的产 AFTs 菌可能会出现错判,更精确的判断和定量还需要使用更精密的仪器检测,如液质联用技术等,紫外荧光检测法适合于大批量筛除非 AFTs 产毒菌。另外的 10 株产毒菌的产毒能力各不相同,均在 5 ng/mL 以下,远低于黄曲霉标准株 CGMCC3.4408 的产毒量 654.90 ng/mL。各菌株产毒能力的不同,可能与它们的自身生理特性或不同的炮制环境等因素有关,这些因素会导致产毒相关基因突变和表达,AFTs 生物合成至少包括 21 步酶促反应,有 30 多个基因共同参加^[14]。研究发现,黄曲霉产毒基因簇有大片段基因缺少、重排等多种变异形式,使产毒能力降低或失去产毒能力^[15-17]。本实验室后期将从生理生化和分子生物学等层面进一步研究它们的产毒或不产毒机制,为淡豆豉炮制过程中 AFTs 的防控提供科学依据。

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: 342-343.
[2] 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.
[3] 林王敏,翁倩倩,邓爱平,等. 淡豆豉的发酵工艺沿革及过程控制概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 222-232.

[4] 孙素群. 食品毒理学 [M]. 武汉: 武汉理工大学出版社, 2017: 202-203.
[5] 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.
[6] 熊京京,任佳秀,周姝含,等. 淡豆豉炮制过程中产 γ -氨基丁酸微生物的筛选和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2266-2273.
[7] 朱海针,龙凯,梁永红,等. Biolog 技术监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 14-17.
[8] 朱海针,谢卫华,龙凯,等. PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1757-1765.
[9] 李刚,梁永红,龙凯,等. 再闷过程影响淡豆豉炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1083-1088.
[10] 李春玲,贺婧,王立元,等. 淡豆豉炮制过程中拮抗菌对黄曲霉毒素 B₁ 的拮抗能力考察 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3544-3551.
[11] 彭漪,杨继鸿,梁凤英,等. 豆瓣酱产毒黄曲霉高效拮抗菌筛选鉴定 [J]. 中国调味品, 2018, 43(2): 58-63.
[12] 饶胜其,陈素雅,高璐,等. 一株黄曲霉拮抗细菌 F1 的筛选、鉴定及其抑菌特性 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 99-105.
[13] Zhao Y, Zhang C, Folly Y M E, et al. Morphological and transcriptomic analysis of the inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production [J]. *Toxins*, 2019, 11(11): 636.
[14] Caceres I, Khoury A A, Khoury R E, et al. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review [J]. *Toxins*, 2020, 12(3): 150.
[15] Bhatnagar D, Ehrlich K C, Cleveland T E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(2): 83-93.
[16] Wei D D, Zhou L, Selvaraj J N, et al. Molecular characterization of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected in China [J]. *J Microbiol*, 2014, 52(7): 559-565.
[17] Donner M, Atehnkeng J, Sikora R A, et al. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria [J]. *Food Addit Contam: Part A*, 2010, 27(5): 576-590.

[责任编辑 郑礼胜]