共培养体系下米曲霉与产毒黄曲霉的相互影响

徐丹[1]， 王洪新[1]， 张银志[2]， 杨振东[1]， 孙秀兰[1]

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

摘要：研究了在共培养体系中，产毒黄曲霉对米曲霉产蛋白酶、淀粉酶的影响及米曲霉对黄曲霉产黄曲霉毒素 B_1（AFB_1）的影响，还分析了米曲霉降解 AFB_1 的能力。结果发现黄曲霉对米曲霉产蛋白酶和 α-淀粉酶有明显的抑制作用，而对 β-淀粉酶的分泌无影响，培养 10 d 后，酸性蛋白酶活性、中性蛋白酶活性、碱性蛋白酶活性和 α-淀粉酶活性分别降低了 3.1、3.2、4.1 和 6.9 倍；同时发现在整个培养过程中，米曲霉能有效抑制黄曲霉合成 AFB_1 的能力，抑制率达 75～90.91%，而对 AFB_1 无降解作用。

关键词：米曲霉；黄曲霉；AFB_1；蛋白酶；淀粉酶；抑制；降解

中图分类号：TS 201.3　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673－1689(2012)06－0587－05

Interaction Between *Aspergillus Oryzae* and Toxigenic *Aspergillus Flavus* in Co-Incubation

XU Dan[1]， *WANG Hong-xin*[1]， *ZHANG Yin-zhi*[2]， *YANG Zhen-dong*[1]， *SUN Xiu-lan*[*1]

(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: The aim of this study is to elucidate the effect of *A. flavus* on protease and amylase production by *A. oryzae* and the influence of *A. oryzae* on the biosynthesis of AFB_1 by *A. flavus*. In addition, the ability of A. oryzae to degrade AFB1 was evaluated. Results reveal that after 10 days, the enzyme activity of acid protease, neural protease, alkali protease and α-amylase produced by *A. oryzae* were reduced 3.1, 3.2, 9.1 and 6.95 time by *A. flavus*, respectively. It was found that the production of AFB_1 was efficient restrained by *A. oryzae* with the inhibition percentage from 75% to 90.91% during the incubation time. However, *A. oryzae* can not degrade AFB_1.

Key words: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, AFB_1, protease, amylase, inhibit, degrade

米曲霉能产生丰富的酶系，是中国酱和酱油等发酵调味品的生产菌株，其所产的蛋白酶和淀粉酶等酶系使得传统发酵调味品富含氨基酸、抗氧化物质和芳香酯等多种营养成分及风味物质[1-2]。而黄曲霉是植物、动物和昆虫的病原菌，同时它还能产生黄曲霉毒素[3-4]，其中以 AFB_1 毒性最强，具有致

收稿日期：2011－10－21

基金项目：国家自然基金资助项目(20806033)；国家"十一五"科技支撑计划项目(2007BAK36B06)；2010 年度公益性行业(农业)科研专项项目(201003008－08)。

作者简介：徐丹(1981－)，女，贵州铜仁人，博士研究生，主要从事食品安全研究。E-mail：xudan0325@163.com

*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，主要从事食品安全研究。E-mail：sxlzzz@yahoo.com.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

突变、致癌、免疫抑制等毒性作用，并且已经被IARC列为Ⅰ类致癌物质。

虽然现在发酵调味品已经采用了纯培养技术制曲，以保障发酵食品的安全性和营养价值，但大多数生产工艺仍是在一个完全开放的环境中进行的，因此在生产中极易受到黄曲霉的污染[5-6]，则就有可能影响米曲霉的生长和代谢，进而影响调味品的营养和风味；同时米曲霉也可能影响黄曲霉的生长、繁殖和产毒。目前已发表的研究成果只涉及了发酵工艺条件对米曲霉产酶及调味品品质的影响，而发酵过程中产毒曲霉菌对米曲霉代谢的影响未见报道。为此，本研究采用微生物共培养的模式，分析黄曲霉对米曲霉产蛋白酶、淀粉酶的影响，同时研究了米曲霉对黄曲霉产 AFB_1 的影响及米曲霉降解 AFB_1 的能力，从而为提高发酵调味品营养、风味和安全性研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 *菌株* 黄曲霉 CGMCC 3.4408 购于中国普通微生物菌种保藏中心；米曲霉 GIM3.31 购于广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.2 *培养基* 马铃薯葡萄糖固体培养基(g/L)：马铃薯 200，葡萄糖 20，琼脂 20；察氏培养基(g/L)：硝酸钠 3，磷酸氢二钾 1，七水硫酸镁 0.5，氯化钾 0.5，硫酸亚铁 0.01，蔗糖 30。

1.1.3 *试剂* AFB_1 标准品购于美国 Sigma 公司；酪氨酸、麦芽糖均为分析纯。

1.2 实验仪器与设备

LS-B50L 立式圆形压力蒸汽灭菌器：上海医用核子仪器厂生产；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生产；ZHWY-2102 型回转式恒温调速摇瓶柜：上海智城分析仪器制造有限公司生产；UNICO7200 可见分光光度计：尤尼柯(上海)仪器有限公司生产；MK3 酶标仪：赛默飞世尔(上海)有限公司产品；AFB_1 酶联免疫定量测试盒：江苏省苏微微生物研究有限责任公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 *霉菌孢子悬浮液的制备* 将黄曲霉(AF)与米曲霉(AO)分别接种于马铃薯葡萄糖斜面培养基上，于 28 ℃培养 7 d，加入一定量的无菌生理盐水，用接种针挑取斜面上的孢子，然后将含有霉菌孢子的生理盐水通过纱布滤去菌丝体，并将孢子浓度调整为 107 CFU/mL，备用。

1.3.2 *共培养时米曲霉与黄曲霉的相互作用* 将米曲霉与黄曲霉以 1:1 的比例各吸取 1mL 孢子悬浮液接种于 50 mL 察氏培养基中，于 28 ℃、150 r/min、摇床培养 12 d，每 2 d 检测培养液酸性蛋白酶活、中性蛋白酶活、碱性蛋白酶活、α-淀粉酶活、β-淀粉酶活、AFB_1 含量；同时单独培养米曲霉、黄曲霉作为对照组。

1.3.3 *米曲霉降解 AFB_1 的能力* 将 1 mL 米曲霉孢子悬浮液与 AFB_1 同时接入 50 mL 察氏培养基中，于 28 ℃、150 r/min、摇床培养 5 d，检测 AFB1 含量；同时以只含 AFB_1 的察氏培养基作为对照组。

1.3.4 *蛋白酶活的测定* 发酵液通过抽滤的方法除去菌丝体，然后直接测定发酵液的蛋白酶活。酸性蛋白酶活、中性蛋白酶活、碱性蛋白酶活参照 SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定方法进行测定[7]，酶活定义：在 40 ℃下每分钟水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位；其中酪氨酸的标准曲线如图 1 所示。

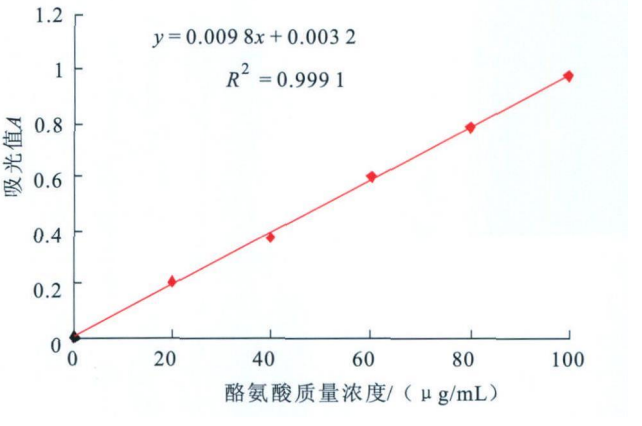


图 1 酪氨酸的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of tyrosine

1.3.5 *淀粉酶活的测定* 发酵液通过抽滤的方法除去菌丝体，然后直接测定发酵液的淀粉酶活。α-淀粉酶活、β-淀粉酶活参照《生物化学实验指导》中淀粉酶活力测定方法进行测定[8]，酶活定义：在 40℃下每分钟水解淀粉产生 1mg 麦芽糖为 1 个酶活单位；其中麦芽糖的标准曲线如图 2 所示。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

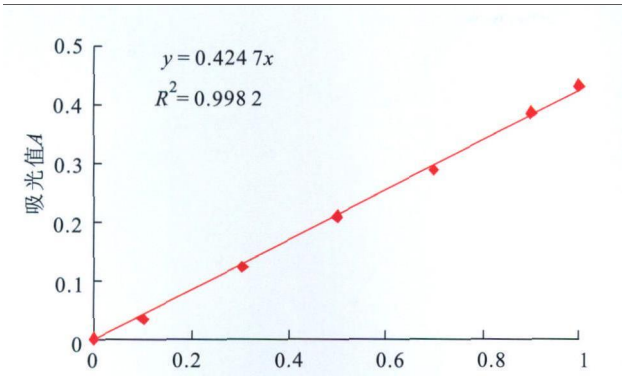


图 2 麦芽糖的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of maltose

1.3.6 AFB_1 分析 AFB_1 分析采用 GB/T5009.22-2003 中酶联免疫分析方法(ELISA)进行测定[9]，测得数据用 Ridasoft Win 软件处理。

1.3.7 数据分析 所有数据均采用 Origin 8.0 分析处理。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉对米曲霉产胞外蛋白酶的影响

将米曲霉与黄曲霉按照 1∶1 的体积比例混合培养，分析黄曲霉对米曲霉产胞外蛋白酶的影响，从图 3 可以看出，单独培养米曲霉时，其酸性蛋白酶活随着培养时间的延长呈上升趋势，且在 8 d 后有显著升高；而混合培养时，8 d 后有缓慢上升，在第 10 d 达到最大值后下降。从培养的第 2 d 至第 8 d，两组实验中酸性蛋白酶活都很低，相差不大，无显著性差异($p>0.05$)；培养 10 d 后两组有显著性差异($p<0.05$)，且第 10 d 和第 12 d 单独培养的酶活分别是混合培养的 3.1 倍和 9.1 倍。

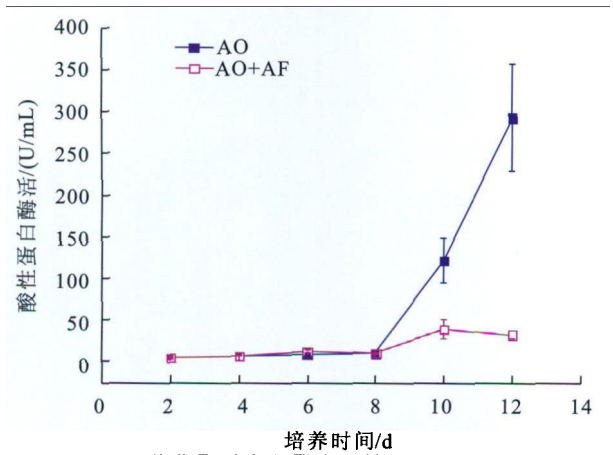


图 3 黄曲霉对米曲霉产酸性蛋白酶的影响

Fig. 3 Effect of *A. flavus* on the acid protease production by *A. oryzae*

从图 4 可以看出，单独培养米曲霉时，其中性蛋白酶活随着培养时间的延长呈上升趋势，且在 8 d 后有显著升高；混合培养时也随培养时间延长呈上升趋势，但相对于单独培养来说上升趋势缓慢。培养的第 4 天至第 6 天，混合培养的中性蛋白酶活较单独培养时，提高了 1.26～1.60 倍，两组实验有显著性差异($p<0.05$)；但 10 d 后，单独培养米曲霉时中性蛋白酶活明显升高，是混合培养的 3.2～8.2 倍，两组之间有显著性差异($p<0.05$)。

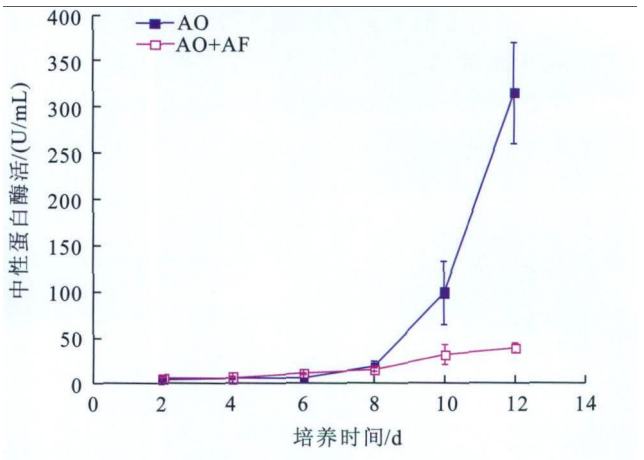


图 4 黄曲霉对米曲霉产中性蛋白酶的影响

Fig. 4 Effect of *A. flavus* on the neural protease production by *A. oryzae*

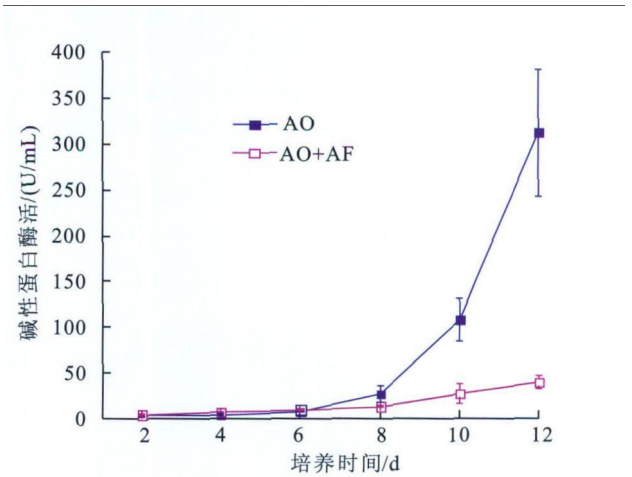


图 5 黄曲霉对米曲霉产碱性蛋白酶的影响

Fig. 5 Effect of *A. flavus* on the alkali protease production by *A. oryzae*

如图 5 所示，两组发酵液中碱性蛋白酶酶活在 6 d 后随培养时间的延长成上升趋势，与单独培养相比，混合培养升高的趋势较缓慢。培养的第 6 天，混合培养的碱性蛋白酶活略高于单独培养的；但 8d 后，单独培养米曲霉时碱性蛋白酶活明显升

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高，是混合培养的 2.02～7.83 倍，两组之间有显著性差异（$p<0.05$）。

从图 3～5 中可知，液体发酵时，米曲霉分泌的胞外蛋白酶主要产生于发酵后期，在与黄曲霉的共培养体系下，发酵初期由于黄曲霉也能产生胞外蛋白酶，使得蛋白酶活性略有升高；但在发酵后期，黄曲霉对米曲霉的产酶能力有明显地抑制作用，影响蛋白酶的分泌，极大地降低了酶活。

2.2 黄曲霉对米曲霉产胞外淀粉酶的影响

将米曲霉与黄曲霉按照 1∶1 的体积比例混合培养，分析黄曲霉对米曲霉产胞外淀粉酶的影响，由图 6 和图 7 可以看出米曲霉分泌的淀粉酶较少，且以产 α-淀粉酶为主。

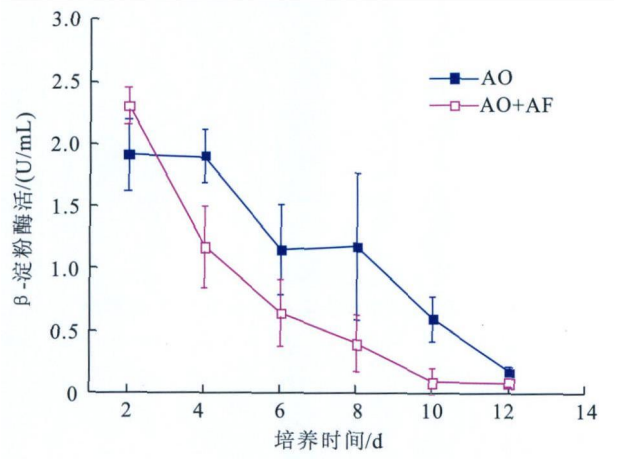


图 6 黄曲霉对米曲霉产 α-淀粉酶的影响

Fig. 6 Effect of *A. flavus* on the α-amylase production by *A. oryzae*

图 6 显示，两实验组的 α-淀粉酶活均随着培养时间的延长呈下降趋势。发酵第 2 天时，混合培养的 α-淀粉酶活略高于单独培养的，但两者之间没有显著性差异（$p>0.05$）；而从发酵第 4 天开始，混合培养的 α-淀粉酶活比单独培养的低，与单独培养相比发酵 10 d 后酶活降低了 6.95 倍，两组实验具有显著性差异（$p<0.05$）。

从图 7 可知，两实验组的 β-淀粉酶活均随着培养时间的延长逐渐下降，且在发酵第 8 天降为 0。在整个发酵过程中，单独培养米曲霉时发酵液中 β-淀粉酶活都高于混合培养的，但两实验组之间无显著性差异（$p>0.05$）。综合分析 α-淀粉酶活和 β-淀粉酶活，发现黄曲霉对米曲霉产 α-淀粉酶有一定影响，但对 β-淀粉酶无显著性影响。

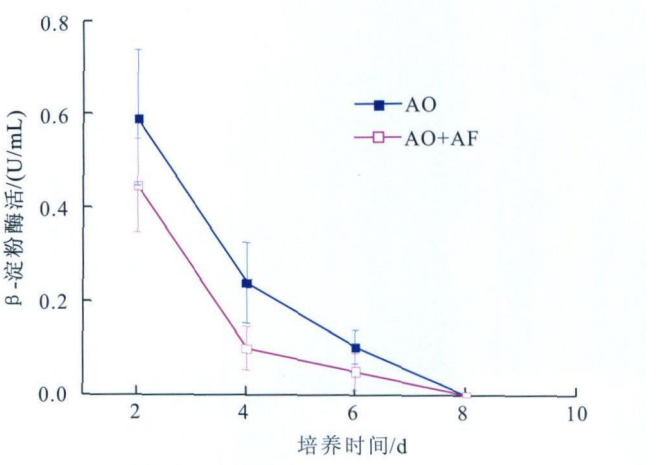


图 7 黄曲霉对米曲霉产 β-淀粉酶的影响

Fig. 7 Effect of *A. flavus* on the β-amylase production by *A. oryzae*

2.3 米曲霉对黄曲霉产 AFB_1 的影响

本实验同时分析了共培养体系中 AFB_1 的含量变化，结果如图 8-9 所示。单独培养黄曲霉时，发酵液中 AFB1 的浓度随发酵时间的延长逐渐增大，在第 6 天时达到最大值，然后逐渐下降，在培养 10 d 后又呈上升趋势。而混合培养时，发酵液中 AFB_1 一直保持一个平稳的水平，且含量明显低于单独培养（$p<0.05$）。

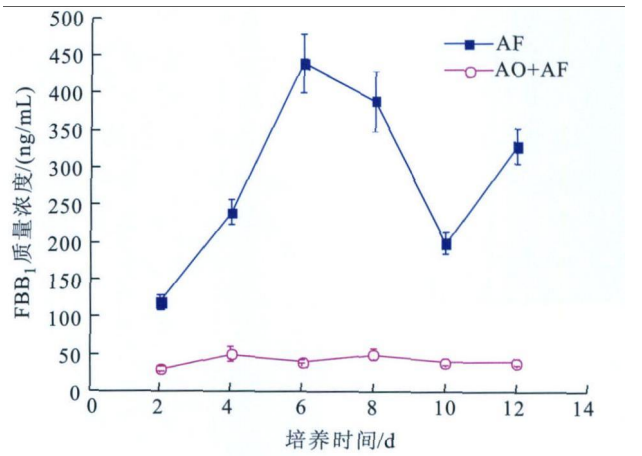


图 8 米曲霉对黄曲霉产 AFB_1 的影响

Fig. 8 Effect of *A. oryzae* on the AFB_1 production by *A. flavus*

图 9 显示与单独培养相比，混合培养时 AFB1 减少了 75～90.91%，抑制率随时间的变化规律与单独培养黄曲霉时 AFB_1 的变化规律一致，随着发酵时间的延长，抑制率呈上升-下降-上升的趋势，在第 6 天达到最大值。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

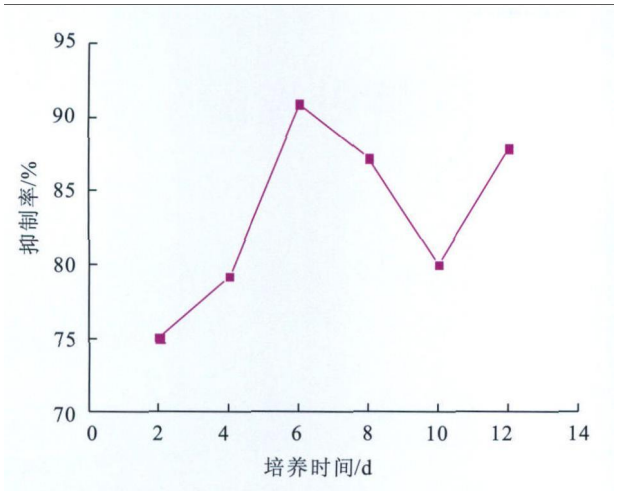


图 9　米曲霉对黄曲霉产 AFB_1 的抑制率

Fig. 9　Inhibition of AFB_1 biosynthesis by *A. oryzae*

Maing[10] 研究发现在酱油酿造过程中，米曲霉、德氏乳杆菌与寄生曲霉同时培养时，能降低 AFB_1 的含量，这说明米曲霉可能具有抑制 AFB_1 的合成或降解 AFB_1 的能力，使得 AFB_1 的污染降低。

2.4　米曲霉对 AFB1 的作用

为了进一步分析共培养体系下 AFB_1 质量浓度降低的原因，本实验还分析了米曲霉降解 AFB_1 的能力，结果如图 10 所示，实验组和对照组中 AFB_1 质量浓度相差不大，无显著性差异（$p>0.05$），表明米曲霉不具备降解 AFB_1 的能力，则进一步说明与黄曲霉共培养时，发酵液中 AFB_1 质量浓度减少是由于米曲霉抑制 AFB_1 的生物合成引起的。

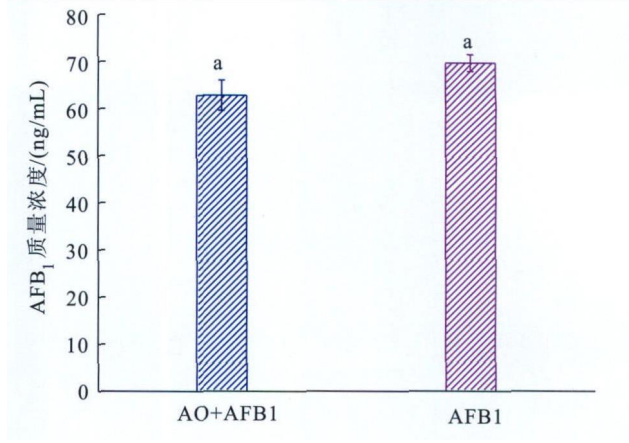


图 10　米曲霉对 AFB_1 的降解效果

Fig. 10　Ability of *A. oryzae* to degrade AFB_1

3　结　语

本论文研究了共培养体系下米曲霉与产毒黄曲霉之间的相互影响，结果发现黄曲霉能明显降低米曲霉分泌酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和 α-淀粉酶的能力；同时发现米曲霉能够有效抑制黄曲霉合成 AFB_1。因此，在调味品的发酵过程中要严格控制产毒菌的污染，以保证发酵调味品的安全性，提高食品的营养价值和风味；同时本研究结果还可为食品与饲料中 AFB_1 的控制提供一种新的生物防治措施。

参考文献(References)：

[1]冯德一. 发酵调味品工艺学[M]. 北京：中国商业出版社，1993. 8－13.

[2]郭继平，马莺. 紫外诱变选育米曲霉高产蛋白酶菌株[J]. 微生物学通报，2007，34(2)：246－250.
GUO Ji-ping, MA Ying. Breeding *Aspergillus oryzae* strain with high protease activity by ultraviolet induced mutation [J]. **Microbiology**, 2007, 34(2): 246－250. (in Chinese)

[3] Maren A. Klich. Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin[J]. **Molecular Plant Pathology**, 2007, 8(6): 713－722.

[4] Hedayati M T, Pasqualotto A C, Bowyer P A, et al. Aspergillus flavuas: human pathogen allergen and mycotoxin producer[J]. **Microbiology**, 2007, 153: 1677－1692.

[5] Felixtina E. Jonsyn. Fungi associated with selected fermented foods in Sierra Leone[J]. **Mircen Journal**, 1989, 5: 457－462.

[6] Nongnuch Sripathomswat, Prayad Thasnakorn. Survey of aflatoxin-producing fungi certain fermented foods and beverages in Thailand[J]. **Mycopathologia**, 1981, 73: 83－88.

[7]上海市酿造科学研究所. SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法[S]. 北京：中国标准出版社，1999.

[8]张云贵，刘祥云，李天俊. 生物化学实验指导(第四版)[M]. 北京：中国农业出版社，2008. 142－144.

[9]计融，路戈，罗雪云，等. GB/T5009.22-2003 食品中黄曲霉毒素 B1 的测定方法[S]. 北京：中国标准出版社，2003.

[10] IL-Young Maing, J. C. Ayres, P. E. Koehler. Persistence of aflatoxin during the fermentation of soy sauce[J]. **Applied Microbiology**, 1973, 25(6): 1015－1017.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net