DOI:10.12441/spyswjs.20220523001 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0143-11

发酵条件对土曲霉菌丝球形态和黄曲霉毒素 B_1 降解效果的影响

张洪鑫[1,2†] 程思忠[1,2†] 王佳兴[1,2] 谢岩黎[1,2*] 李 倩[1,2] 孙淑敏[1,2] 杨玉辉[1,2]

(1. 河南工业大学粮油食品学院,河南 郑州 450001; 2. 河南省粮油食品安全检测与控制重点实验室,河南 郑州 450001)

摘要:【目的】探究不同发酵条件对土曲霉(*Aspergillus terreus*, *A. terreus*) AterHaut1 菌丝球形态和黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)降解效果的影响。**【方法】**通过单因素试验对不同菌悬液接种体积分数、发酵温度和摇床转速条件下的菌丝球形态和 AFB_1 降解率进行考察,并通过 Box-Behnken 试验设计结合响应面分析法对发酵条件进行优化。**【结果】**得到的最佳发酵条件为:转速 145 r/min、接种体积分数 0.17%、发酵温度 35 ℃。在最优条件下,发酵上清液的 AFB_1 实际降解率达 96.34%,菌丝球平均直径为 1.35 mm,均匀分布在 1.20~1.50 mm。**【结论】**通过优化土曲霉 AterHaut1 的发酵条件可有效提高 AFB_1 降解率。

关键词:土曲霉;AFB_1 降解酶;发酵;菌丝球

Effects of Fermentation Conditions on Mycelial Pellet Morphology of *Aspergillus terreus* and Aflatoxin B_1 Degradation Efficency

ZHANG Hongxin[1,2†] *CHENG Sizhong*[1,2†] *WANG Jiaxing*[1,2] *XIE Yanli*[1,2*]
LI Qian[1,2] *SUN Shumin*[1,2] *YANG Yuhui*[1,2]

(1. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Grain, Oil and Food Safety Inspection and Control, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: [**Objective**] To study the effects of different fermentation conditions on the mycelial pellet morphology of *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) AterHaut1 and aflatoxin B_1 (AFB_1) degradation efficency. [**Method**] Single factor experiments were carried out to investigate the mycelial pellet morphology and AFB_1 degradation rates under different inoculation volume fractions, fermentation temperatures, and shaker speeds. The fermentation conditions were optimized by Box-Behnken design combined with response surface methodology. [**Result**] The optimal fermentation conditions were obtained as follows: shaker speed of 145 r/min, inoculation volume fraction of 0.17%, and fermentation temperature of 35 ℃. The actual degradation rate of AFB_1 by the fermentation supernatant obtained under the optimal fermentation conditions reached 96.34%. At this time, the average diameter of mycelial pellets was 1.35 mm, with even distribution between 1.20 mm and 1.50 mm. [**Conclusion**] Optimizing the fermentation conditions of *A. terreus* AterHaut1 can improve the degradation rate of AFB_1.

Keywords: *Aspergillus terreus*; aflatoxin B_1-degrading enzyme; fermentation; mycelial pellet

---

基金项目:国家自然科学基金联合基金重点项目(U24A20473);河南省重点研发专项项目(231111113300)。

通信作者:谢岩黎(1971—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品营养与安全研究。E-mail:ylxie@haut.edu.cn

†表示共同一作。

收稿日期:2022-05-23 **修回日期:**2022-06-08

黄曲霉毒素是由多种真菌产生的一类结构相似的次级代谢产物，产物结构中包含高度含氧基团和天然杂环[1]。在已鉴定的约400种真菌毒素中[2]，AFB_1毒性最强、化学性质最稳定，引起了研究者的广泛关注[3]。为降低AFB_1对动物和人类健康产生的危害，研究者使用物理法[4-6]、化学法[7-8]和生物学法（如使用植物提取物、微生物和酶）[9]等多种方法来控制其在食品和饲料中的含量。虽然物理和化学脱毒法仍是主要方法，但由于这2种方法对原料基质的影响较大，如造成食品和饲料的物理性质、感官性质和营养价值等的改变和损失，这2种脱毒方法在实际应用中受到了一定的限制。因此，需要寻找安全高效、切实可行、绿色环保的AFB_1脱毒方法。

近年来，利用微生物及其制品对AFB_1进行脱毒的方法越来越受到科研工作者的关注[10-12]。由于微生物本身对食品感官特性和毒性的影响，导致部分微生物不能直接用于黄曲霉毒素的降解。目前，关于AFB_1解毒关键酶的研究已有报道并逐渐用于食品和饲料工业[13-14]。研究表明，漆酶[15]、黄曲霉毒素氧化酶（AFO）[16-17]、过氧化物酶[18]、辣根过氧化物酶[19]、锰过氧化物酶[20]等均可降解AFB_1。首先，通过基因工程技术使这些关键酶在工程菌株中过表达，再经分离、纯化后添加到食品或饲料中以降解真菌毒素[21-22]。这些酶可通过不同机制（如打开呋喃环、裂解内酯环等）实现解毒效果。Alberts等[15]研究发现，白腐真菌可通过产生漆酶去除不同液体培养基中的AFB_1，黑曲霉产生的重组漆酶与天然漆酶在降解AFB_1上无显著差异。

作者所在课题组前期研究发现一株可降解AFB_1的土曲霉，并证明其是通过胞外分泌AFB_1降解酶的方式来降解AFB_1。土曲霉属于丝状真菌，在发酵生产有机酸、药物和酶制剂等领域广泛应用。其代谢途径多样，发酵产生次级代谢产物和酶的能力强，且分泌效率高、培养成本低，正越来越多地被应用于实际生产中。目前，土曲霉的发酵研究主要集中于衣康酸、洛伐他汀、纤维素酶、阿魏酸酯酶等的发酵生产。但在发酵过程中其菌体形态结构（如游离菌丝、菌团和菌球等）存在差异，易导致发酵状态不稳定且难以控制，进而影响目标物的产量。导致菌体形态差异的因素包括菌株自身差异（基因编码）和外部因素（培养基营养组成和发酵条件）。其中，与菌株形态相关的基因众多，受多种基因共同调控，在实际生产中难以控制且很难得到菌体形态最佳的菌株[23]。Nelson等[24]报道了丝状真菌形态相关研究，包括发酵条件、发酵液流变性、丝状真菌形态与目标产物产量之间的关系。发酵液流变性和营养物质的吸收利用受丝状真菌形态的影响，从而影响目标产物产量。最佳菌体形态因目标产物种类的不同也存在一定差异。菌丝与发酵液的接触面积越大，营养物质的吸收利用效率越高。由于菌丝尖端可以分泌蛋白质，因此菌体形态对蛋白酶的合成尤为重要[25]。菌丝球形态可使发酵液黏度显著下降，有利于菌体与发酵液间的营养物质传递，因此菌丝球形态适合生产有机酸。但菌丝球内部受到挤压导致结构致密，无法扩散，其中心区域在溶菌酶的作用下会发生自溶。

作者所在课题组前期从土壤中筛选分离出AFB_1降解菌土曲霉AterHaut1，通过单因素试验和Box-Behnken试验设计结合响应面分析法，研究不同发酵条件（接种体积分数、发酵温度和摇床转速）对土曲霉AterHaut1菌丝球形态和AFB_1降解率的影响，旨在确定最佳发酵条件。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

土曲霉AterHaut1：作者所在实验室保藏，在中国普通微生物管理保藏中心的保藏编号为CGMCC18840。

PDA培养基：220 g切块的土豆煮沸融化，过滤，加入20 g琼脂粉和20 g葡萄糖，定容至1 L，于121 ℃灭菌21 min。发酵培养基：3 g牛肉膏、10 g蛋白胨、6 g葡萄糖、5 g氯化钠、1 L水，调节pH至7.0，于121 ℃灭菌21 min。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪：Agilent 1290型，美国安捷伦科技有限公司；倒置生物显微镜：BM-37XBC型，上海彼爱姆光学仪器有限公司；紫外可见分光光度计：UV-6100S型，上海美谱达仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 葡萄糖测定

参照朱振家[26]的蒽酮法测定发酵结束后培养

基中葡萄糖的剩余质量。准确称取25.0 mg葡萄糖，溶于100 mL蒸馏水中，配制成葡萄糖标准液。然后按照表1将其分别稀释成不同质量浓度的葡萄糖溶液。向各管内依次加入蒽酮乙酸乙酯0.5 mL、硫酸3 mL。混合均匀后沸水浴1 min，再冷却至室温，最后取适量溶液于比色皿中，测定不同葡萄糖标准液在630 nm处的吸光度。以葡萄糖质量浓度为x轴、OD_{630}值为y轴绘制标准曲线。

表1　葡萄糖标准曲线

Table 1　Standard curve of glucose

葡萄糖质量浓度/(mg/mL)	0.25 mg/mL葡萄糖体积/mL	蒸馏水体积/mL
0	0	2.000
0.015 625	0.125	1.875
0.031 250	0.250	1.750
0.062 500	0.500	1.500
0.125 000	1.000	1.000
0.250 000	2.000	0

发酵结束后，取适量发酵液配制成合适质量浓度的待测样品，并向各管中先后加入蒽酮乙酸乙酯0.5 mL、硫酸3 mL。混合均匀后沸水浴1 min，再冷却至室温，测定不同样品在630 nm处的吸光度。

1.3.2　菌丝球直径测定

取发酵结束的菌丝球置于倒置生物显微镜下采集图像，采用Image J软件对菌丝球直径进行分析，测定结果取50个样品的平均值。

1.3.3　菌体质量浓度测定

称量干燥的定量滤纸质量(m_1)，取100 mL发酵液于8 000 r/min离心5 min，用生理盐水洗涤菌体3次，经真空泵抽滤后连同滤纸置于60 ℃烘箱中烘干至质量恒定，称其质量(m_2)，菌体质量浓度(以干基计)计算见式(1)。菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数为菌体质量浓度与葡萄糖质量浓度的比值。

$$M=(m_2-m_1)\times(\varepsilon/V) \quad (1)$$

式中：

M——菌体质量浓度，mg/mL；

m_1——定量滤纸质量，mg；

m_2——抽滤后质量，mg；

ε——换算系数，为1 000；

V——发酵液体积，为100 mL。

1.3.4　AFB_1降解率测定

发酵液经中速滤纸过滤后，离心去除沉淀，获得发酵上清液。吸取975 μL发酵上清液和25 μL 100 μg/mL的AFB_1于1.5 mL棕色离心管中，旋涡混匀30 s。对照组为空白发酵培养基与AFB_1在相同条件下反应。将反应体系置于150 r/min气浴摇床中，于37 ℃避光反应72 h。反应结束后，取反应体系于10 mL试管中，使用3倍体积的二氯甲烷涡旋萃取60 s，然后于35 ℃氮气吹干。接着用0.5 mL流动相($V_{乙腈}$∶$V_{水}$∶$V_{甲醇}$=2∶6∶2)浓缩复溶，涡旋溶解60 s，过0.22 μm有机滤膜。

液相色谱检测条件：色谱柱为C18柱(4.6 mm×150 mm×4 μm)，进样体积20 μL，柱温35 ℃，流量1 mL/min，流动相为$V_{乙腈}$∶$V_{水}$∶$V_{甲醇}$=2∶6∶2，紫外检测器检测波长为365 nm。按式(2)计算AFB_1降解率。

$$Y=\left(1-\frac{S}{C}\right)\times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y——AFB_1降解率，%；

S——发酵组残留AFB_1峰面积；

C——空白对照组AFB_1峰面积。

1.4　发酵条件单因素试验

从-80 ℃冰箱中取出冻存的孢子悬浮液涂布接种于PDA培养基，活化富集，刮取成熟的菌丝于100 mL灭菌生理盐水中制成菌悬液，分别考察菌悬液接种体积分数、摇床转速和发酵温度对AFB_1降解率的影响，各因素与水平见表2。在各单因素考察中，其余因素均设定为中等水平条件；若已有因素经过优化处理，则选取最佳条件进行后续研究。

1.5　发酵条件优化

在预试验基础上，选取对菌丝球形成及降解酶产量影响较大的因素(菌悬液接种体积分数、发酵温度、摇床转速)进行单因素试验。根据单因素试验的结果，采用Design-Expert 8.0.6软件，基于Box-Behnken原理，以摇床转速(A)、菌悬液接种体积分数(B)和发酵温度(C)为因素设计响应面试验，以AFB_1降解率为响应值进行响应面优化分析，响应面试验因素与水平见表3。

表 2 单因素试验因素与水平

Table 2 Factors and levels in the single-factor experimental

编号	菌悬液接种体积分数/%	摇床转速/(r/min)	发酵温度/℃
1	0.005	120	30
2	0.010	150	33
3	0.020	180	35
4	0.050	200	37
5	0.100		
6	0.200		
7	0.500		
8	1.000		

表 3 响应面试验因素与水平

Table 3 Factors and levels in response surface methodology

变量水平	摇床转速/(r/min)	菌悬液接种体积分数/%	发酵温度/℃
−1	120	0.100	33
0	150	0.200	35
1	180	0.500	37

1.6 数据处理

每个样品进行 3 次重复试验，采用 Design-Expert 8.0.6 进行响应面设计，使用 IBM SPSS 20.0 和 Origin 2018 进行数据分析和绘图。

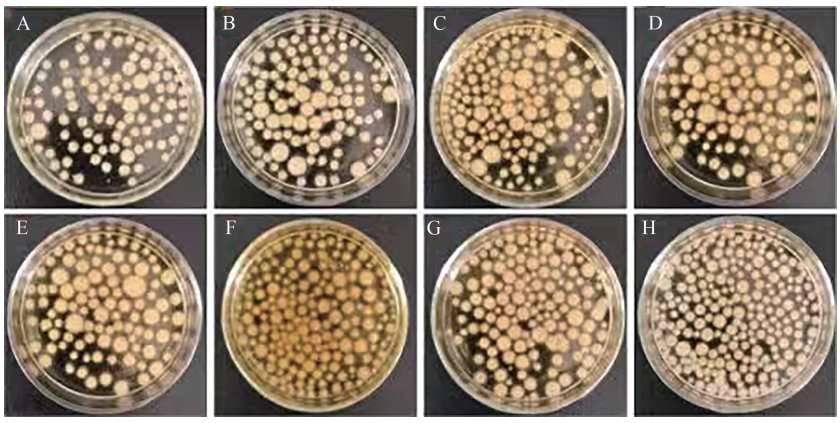
2 结果与讨论

2.1 接种体积分数对菌丝球形态与 AFB_1 降解酶产量的影响

在丝状真菌的液体发酵过程中，接种体积分数会直接影响接种后孢子的聚集特性，进而影响菌体的宏观形态与目标产物的产量。曲霉属丝状真菌在液体发酵过程中多呈现聚集性，表现为菌团或菌球。这不仅与菌株的遗传特性有关，还受环境因素影响[27]。接种体积分数过小会导致菌体生长缓慢，代谢产物减少，并增加杂菌污染的风险[28]；接种体积分数较大可以加速菌体生长和增殖，在大规模发酵生产中，既可以提高代谢产物的含量，也可以减少杂菌污染的可能性；但接种体积分数过大时，竞争会造成发酵体系中营养物质缺乏，不利于目标产物的合成。

将平板上预培养的菌丝体制成悬浮液后，过滤去除菌体制成孢子悬浮液接种发酵液，发酵液的 AFB_1 降解率较低，这可能是由于短暂的低氧胁迫影响了菌体 AFB_1 降解酶的产生。有研究[29]表明，传统方法如离心或过滤菌丝体可导致菌体失去产生衣康酸的能力。因此，在后续发酵产酶的试验中，均采用接种菌悬液来替代孢子悬浮液。为探究菌悬液接种体积分数对菌丝球形态和 AFB_1 降解率的影响，将菌悬液接种体积分数分别设为 0.005%、0.010%、0.020%、0.050%、0.100%、0.200%、0.500%、1.000%，研究其对 AFB_1 降解率、菌丝球形态、菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数、菌丝球直径的影响。结果显示，菌悬液接种体积分数是影响 AFB_1 降解率的重要因素。在丝状真菌产柠檬酸和葡萄糖苷酶的研究[30-31]中也有类似发现。

由图 1~2 可知，随着菌悬液接种体积分数的增加，菌丝球数量增加，AFB_1 降解率先升高后降低，菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得



A~H—菌悬液接种体积分数分别为 0.005%、0.010%、0.020%、0.050%、0.100%、0.200%、0.500%、1.000% 发酵 72 h 的菌丝球形态。

图 1 接种体积分数对菌丝球形态的影响

Fig. 1 Effects of inoculation volume fractions on morphology of mycelial pellets

率系数均呈上升趋势，菌丝球直径先增大后变小。这是由于在接种时，菌丝的聚集和散开趋势处于动态平衡。当菌悬液接种体积分数较小时，聚集趋势占优势，形成的菌丝球数目较少、直径较大；当接种体积分数增加时，散开趋势占优势，形成的菌丝球数目多且直径较小[32]。当菌悬液接种体积分数从0.050%增加到1.000%时，形成的菌丝球直径逐渐减小，AFB_1降解率先增大后减小。这是由于菌丝球较大会影响其内部的呼吸代谢和目标产物的分泌；菌丝球直径减小，导致用于运输和吸收的菌丝球表面积增大，利于AFB_1降解酶的产生，AFB_1的降解率升高。但随着接种体积分数继续增加，较小的菌丝球直径有利于菌体的生长但不利于AFB_1降解酶的产生，可能是由于接种体积分数过大，菌丝球之间形成营养竞争关系，影响目标产物的产生。当接种体积分数为0.200%时，菌体质量浓度为0.803 3 mg/mL，菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数为0.142 5，菌体发酵上清液的AFB_1降解率为90.802%。

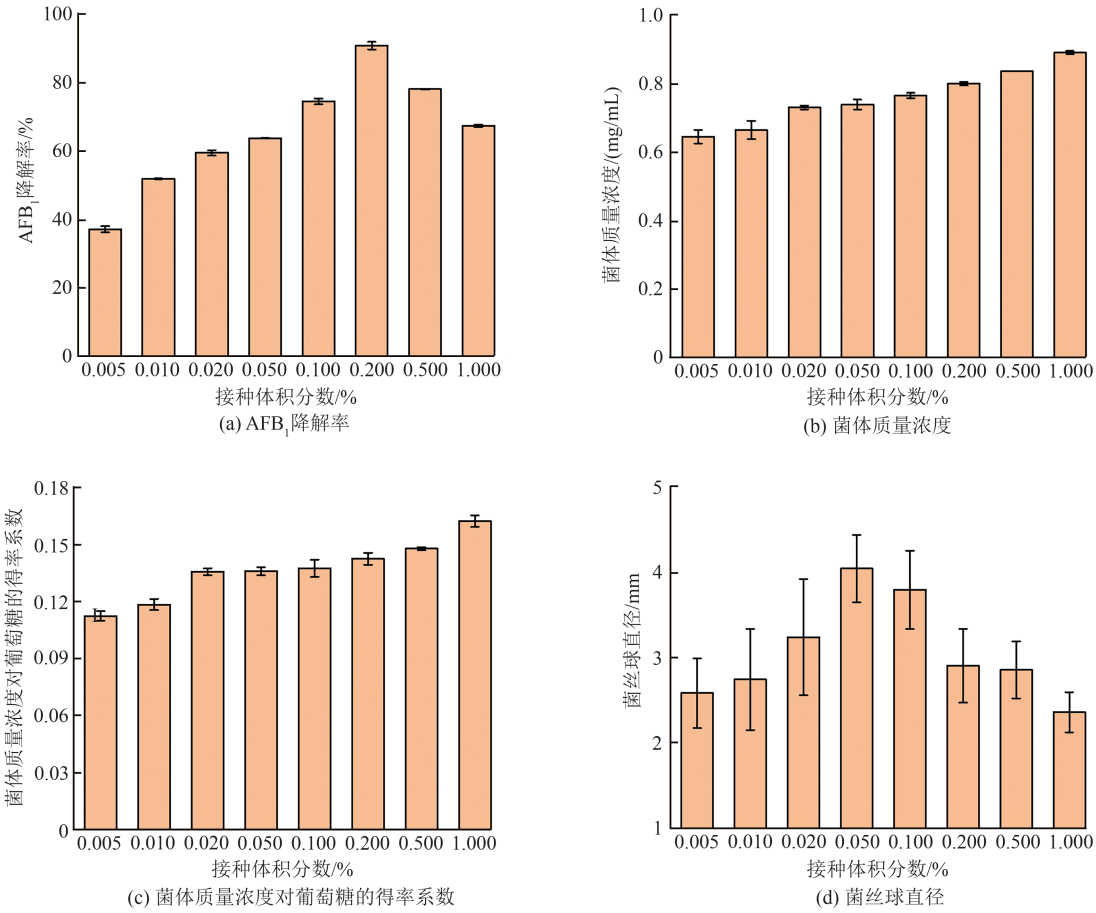


图2　接种体积分数对AFB_1降解率、发酵指数和菌丝球直径的影响

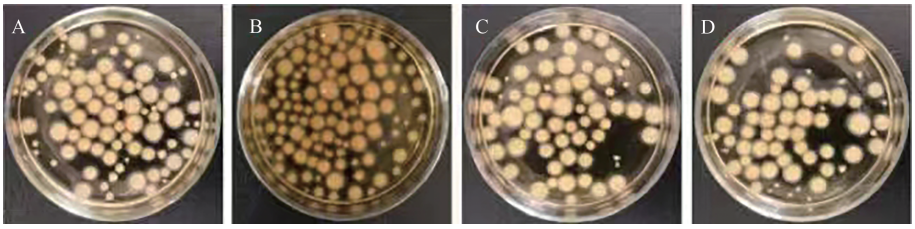
Fig. 2　Effects of inoculum volume fractions on the AFB_1 degradation rate, fermentation indexes, and mycelial pellet diameter

2.2　摇床转速对菌丝球形态与AFB_1降解酶产量的影响

在液体发酵过程中，摇床转速和摇瓶类型会改变发酵液中的溶氧量和机械剪切力，从而影响不同菌体形态的形成[33]。将摇床转速设为120、150、180、200 r/min，研究摇床转速对AFB_1降解率、菌丝球形态、菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数、菌丝球直径的影响。

由图3~4可知，随着摇床转速的增加，菌丝球数量先增加后减少，AFB_1降解率先升高后降低，菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数均呈现先增加后降低的趋势，菌丝球直径先减小后增大。当摇床转速为150 r/min时，菌丝球直径最小且数量最多，AFB_1降解率最高。这可能是

由于菌丝球直径变化影响了其内部的呼吸代谢和产酶过程。当菌丝球直径增大时，会阻碍内部氧气的传递；而当菌丝球直径减小时，增加了用于运输和吸收养分的菌丝球表面积。这种密切的关联性进一步证实了传质在该体系发酵过程中起主要作用[34]。此外，菌丝球的内部结构也会影响氧气传递，适当提高菌丝球内部临界半径（即从菌丝球外围到内部氧气为零的距离），可以使菌丝球内部更加松散，从而提高参与代谢的菌丝比例和目标产物产量[35]。



A~D—摇床转速分别为 120、150、180、200 r/min 发酵 72 h 的菌丝球形态。

图 3　摇床转速对菌丝球形态的影响

Fig. 3　Effects of shaker speeds on morphology of mycelial pellets

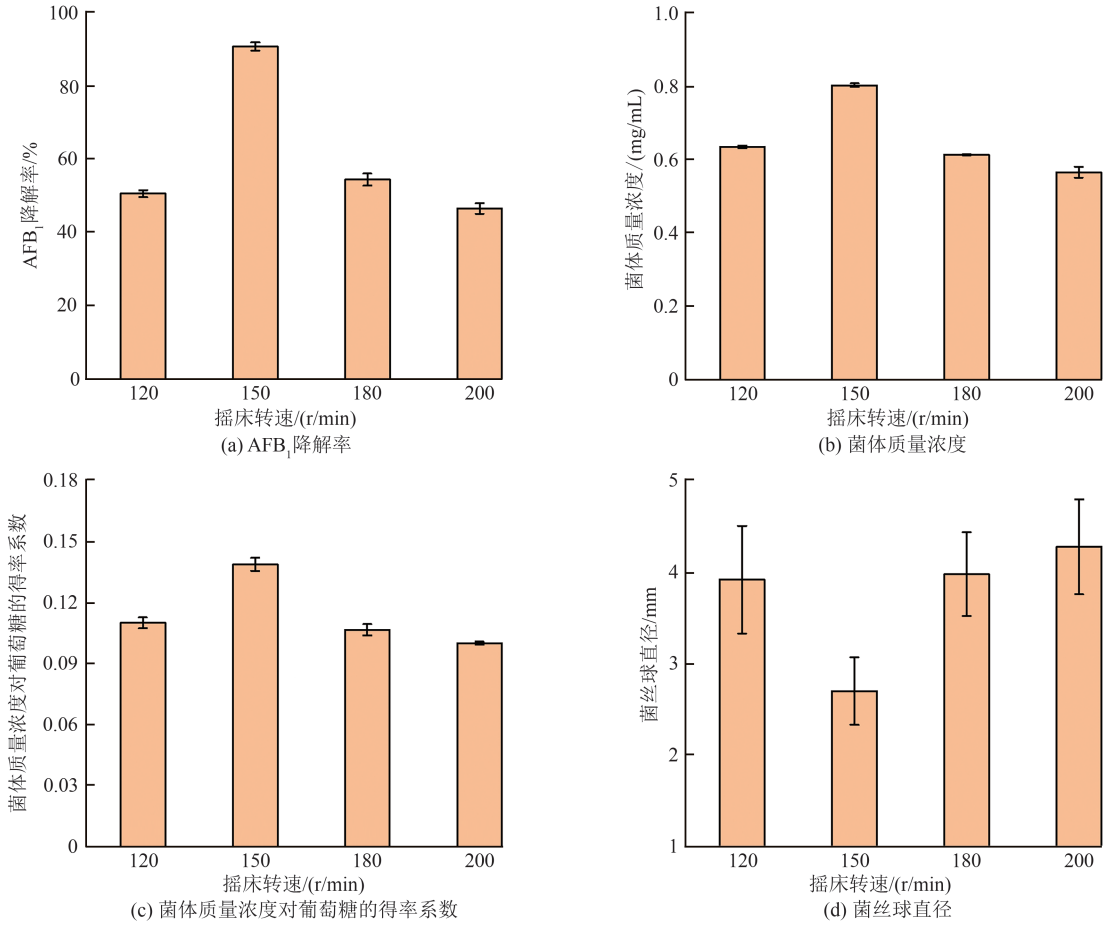


图 4　摇床转速对 AFB_1 降解率、发酵指数和菌丝球直径的影响

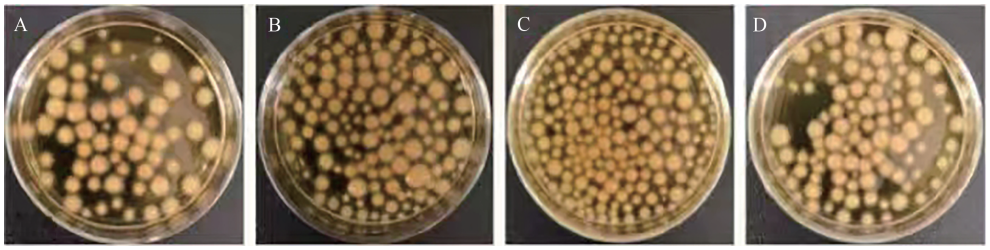
Fig. 4　Effects of shaker speeds on the AFB_1 degradation rate, fermentation indexes, and mycelial pellet diameter

2.3　发酵温度对菌丝球形态与 AFB_1 降解酶产量的影响

温度通过影响 RNA 结构与转录、酶的合成与活性、细胞膜的液晶结构等途径来干预微生物的生长代谢。在低温条件下，微生物体内酶的生物活性受到抑制，导致生长代谢停滞；当恢复到适宜

温度时，经过活化的微生物仍能恢复活性。但当温度过高时，微生物体内的酶会失活且不可逆转，导致微生物生长代谢停止。在发酵过程中，温度不仅影响菌体的生长，还会影响代谢产物的合成。因此，需要确定其最适发酵温度，该温度既能促进菌体的生长繁殖，还有利于代谢产物的合成。将发酵温度分别设为30、33、35、37 ℃并发酵72 h，研究发酵温度对 AFB_1 降解率、菌丝球形态、菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数、菌丝球直径的影响。

随着发酵温度的升高，菌丝球数量呈现先增加后降低的趋势，见图5。由图6可知，当发酵温度由30 ℃升高至35 ℃时，AFB_1 降解率明显增大；随着温度继续升高到37 ℃时，AFB_1 降解率明显下降。随着温度的升高，菌体质量浓度、菌体质量浓度对葡萄糖的得率系数均呈现先升高后降低的趋势；



A~D分别为30、33、35、37 ℃下发酵72 h的菌丝球形态。

图5　发酵温度对菌丝球形态的影响

Fig. 5　Effects of fermentation temperatures on morphology of mycelial pellets

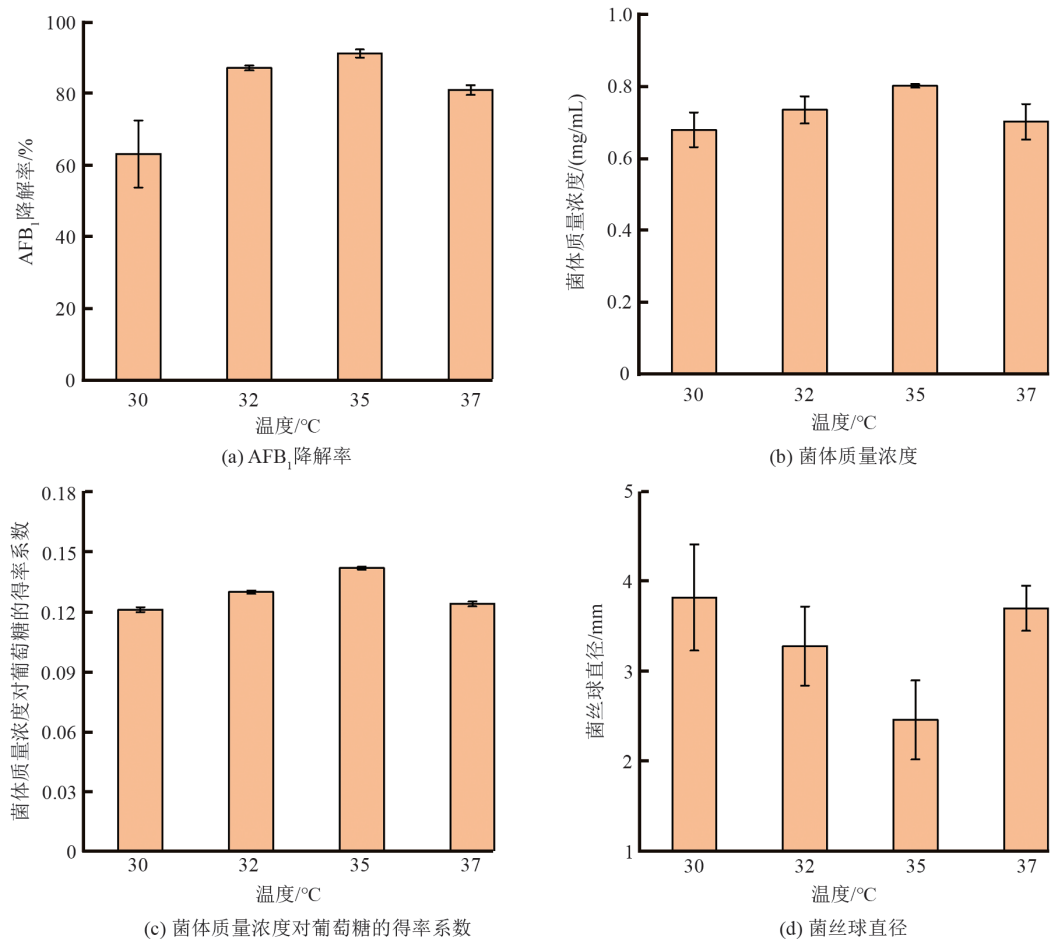


图6　发酵温度对 AFB_1 降解率、发酵指数和菌丝球直径的影响

Fig. 6　Effects of fermentation temperatures on the AFB_1 degradation rate, fermentation indexes, and mycelial pellet diameter

而菌丝球直径呈现先减小后增大的趋势。当发酵温度为35 ℃时，菌丝球直径最小，AFB_1降解率最高。Zhou等[36]研究表明，较小的菌丝球直径有助于提高干细胞质量与富马酸产量。然而，另一项研究[37]发现，随着温度的升高菌丝球直径呈现增大的趋势，这可能是由于菌株差异和所产生的目标产物不同导致的。试验结果表明，当发酵温度为35 ℃时，发酵上清液的AFB_1降解效果最佳。

2.4 响应面回归分析试验结果

采用Design Expert软件的Box-Behnken设计响应面回归分析试验，按照组合进行17次降解试验，AFB_1降解率见表4。对结果进行回归分析，得到的方差分析结果见表5。失拟项不显著（P=0.081 3），模型极显著（P=0.000 6），方程的相关系数R^2=0.955 7，R^2_{Adj}=0.898 7，回归方程为：y=−1 794.709 37+2.500 58A+55.512 50B+96.973 12C+0.023 333AB−0.005 212AC+0.231 250BC−0.008 019A^2−126.937 50B^2−1.371 25C^2。结果表明，该模型拟合程度良好，各因素对结果的影响为摇床转速>接种体积分数>发酵温度。

表4 Box-Behnken试验设计与结果

Table 4 Box-Behnken design and experimental results

序号	变量水平			AFB_1降解率/%
	摇床转速	接种体积分数	发酵温度	
1	−1	−1	0	88.75
2	1	−1	0	81.61
3	−1	1	0	85.56
4	1	1	0	78.98
5	−1	0	−1	82.53
6	1	0	−1	80.69
7	−1	0	1	86.56
8	1	0	1	83.49
9	0	−1	−1	88.28
10	0	1	−1	83.76
11	0	−1	1	86.97
12	0	1	1	82.82
13	0	0	0	96.53
14	0	0	0	95.97
15	0	0	0	97.31
16	0	0	0	96.23
17	0	0	0	94.06

表5 回归方程参数方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression equation parameters

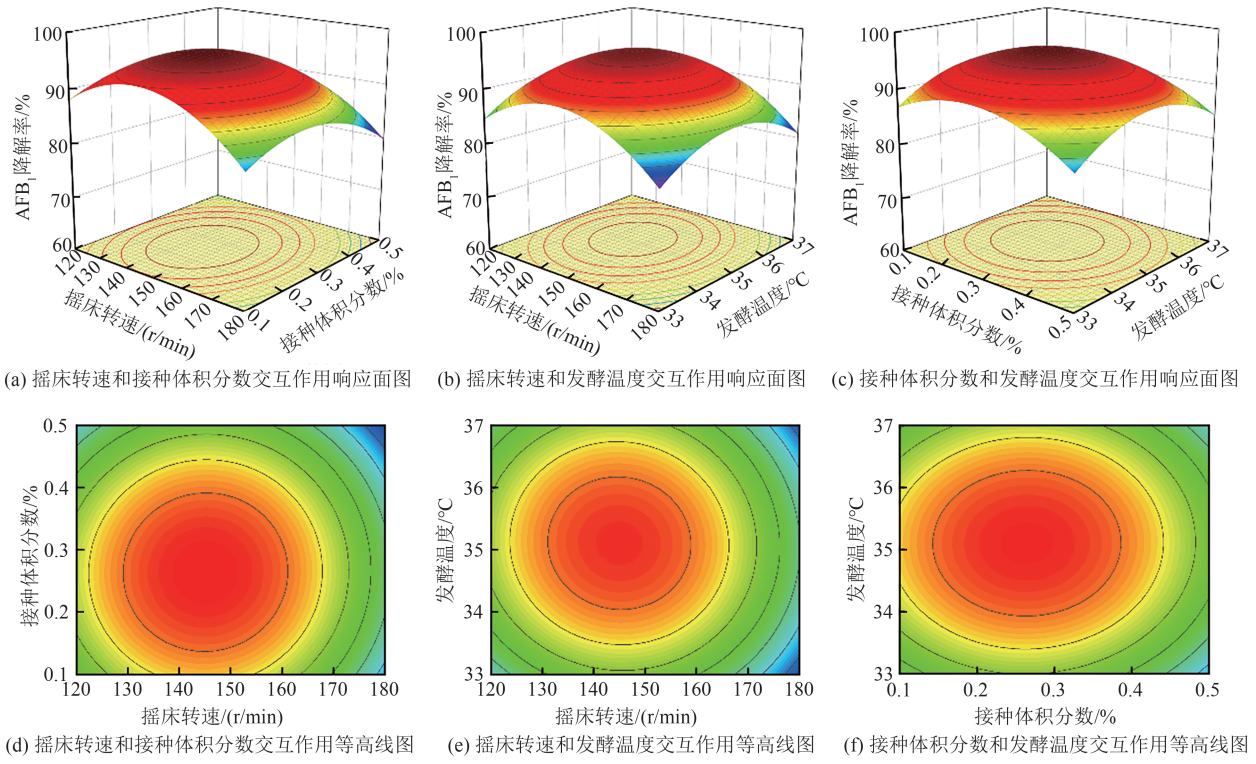
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
总模型	578.96	9	64.33	16.78	0.000 6
A	43.38	1	43.38	11.32	0.012 0
B	26.25	1	26.25	6.85	0.034 6
C	2.62	1	2.62	0.68	0.435 5
AB	0.08	1	0.08	0.02	0.890 3
AC	0.38	1	0.38	0.10	0.762 6
BC	0.03	1	0.03	0.01	0.927 4
A^2	219.34	1	219.34	57.21	0.000 1
B^2	108.55	1	108.55	28.32	0.001 1
C^2	126.67	1	126.67	33.04	0.000 7
残差项	26.84	7	3.83		
失拟项	21.02	3	7.01	4.82	0.081 3
误差项	5.81	4	1.45		
总和	605.80	16			

注：P<0.05表示差异显著；P<0.01表示差异极显著；R^2=0.955 7；R^2_{Adj}=0.898 7。

根据模型拟合出的两两因素间相互作用的响应面图和等高线图，进一步研究各因素间的交互作用强弱[38]。由图7可知，随着接种体积分数和发酵温度的增大，AFB_1降解率随之增加，但当增加到一定程度时，AFB_1降解率有下降趋势。图7中接种体积分数和发酵温度交互作用响应面图坡度较陡，等高线近似于椭圆，说明对AFB_1降解率的影响显著，与方差分析结果一致。接种体积分数和摇床转速、摇床转速和发酵温度交互作用响应面图坡度较平缓，对AFB_1降解率影响不显著。

2.5 最优发酵条件的确定

使用Desgin Expert 8.0.6软件预测模型得到最佳工艺条件，当AFB_1降解率最高时，摇床转速为145.08 r/min、接种体积分数为0.17%、温度为35.11 ℃，预测AFB_1降解率可达96.39%。为了方便控制条件，将发酵条件调整为：摇床转速为145 r/min、接种体积分数为0.17%、温度为35 ℃，进行3次平行验证，AFB_1的实际降解率分别为96.35%、96.29%、96.39%，平均降解率为96.34%，与预测值相差较小，表明该模型能够可靠地预测菌株土曲霉AterHaut1的实际发酵情况。



(a) 摇床转速和接种体积分数交互作用响应面图　(b) 摇床转速和发酵温度交互作用响应面图　(c) 接种体积分数和发酵温度交互作用响应面图

(d) 摇床转速和接种体积分数交互作用等高线图　(e) 摇床转速和发酵温度交互作用等高线图　(f) 接种体积分数和发酵温度交互作用等高线图

图 7　各因素交互作用对 AFB_1 降解率影响的响应面图和等高线图

Fig. 7　Response surface and contour plots of influences of the interactions among various factors on the degradation rate of AFB_1

将发酵结束后得到的菌丝放大 5 倍，通过 ImageJ 计算得到菌丝球平均直径为 1.35 mm，均匀分布在 1.20~1.50 mm，见图 8。结果表明，为确保土曲霉高效发酵生产 AFB_1 降解酶，需精准调控发酵条件以提升产酶效率。同时，通过观测菌丝球形态可评估发酵效果，结合发酵上清液中 AFB_1 降解率的检测，实现对发酵过程的有效监控。

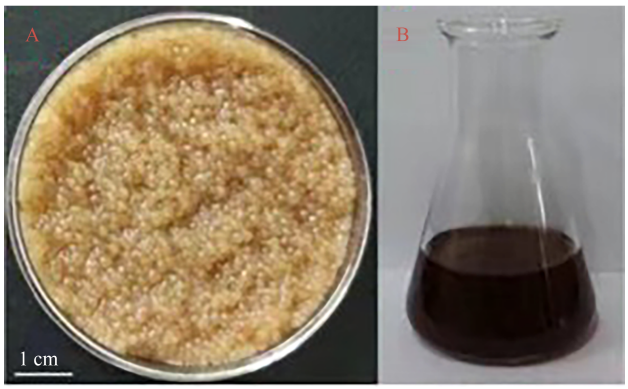


图 8　最佳发酵条件下菌丝球直径和发酵液颜色

Fig. 8　Diameter of mycelial pellets and color of fermentation broth under optimal fermentation conditions

3　结论

通过单因素试验，研究发酵条件对土曲霉 AterHaut1 的菌丝球形态和 AFB_1 降解效果的影响。结果表明，摇床转速对 AFB_1 降解率的影响最大，其次是接种体积分数，发酵温度对 AFB_1 降解率的影响最小。土曲霉 AterHaut1 的最佳发酵条件为：转速 145 r/min、接种体积分数 0.17%、发酵温度 35 ℃，此时 AFB_1 降解率达 96.34%。发酵结束后得到的菌丝球平均直径为 1.35 mm，均匀分布在 1.20~1.50 mm。

参考文献

[1] MARAGOS C M. Measurement of aflatoxins using capillary electrophoresis [J]. Methods in Molecular Biology, 2001, 157: 51-58.

[2] GUO Y P, QIN X J, TANG Y, et al. CotA laccase, a novel aflatoxin oxidase from *Bacillus licheniformis*, transforms aflatoxin B_1 to aflatoxin Q_1 and *epi*-aflatoxin Q_1 [J]. Food Chemistry, 2020, 325: 126877.

[3] NUNEZ O, HENDRICKS J D, FONG A T. Inter-relationships among aflatoxin B_1 (AFB_1) metabolism, DNA-binding, cytotoxicity, and hepatocarcinogenesis in

rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Diseases of Aquatic Organisms,1990,9:15-23.

[4] ISMAIL A, GONÇALVES B L, NEEFF D V, et al. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in decontamination[J]. Food Research International, 2018, 113:74-85.

[5] PENG Z, CHEN L K, ZHU Y L, et al. Current major degradation methods for aflatoxins: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 80: 155-166.

[6] SAKUDO A, TOYOKAWA Y, MISAWA T, et al. Degradation and detoxification of aflatoxin B_1 using nitrogen gas plasma generated by a static induction thyristor as a pulsed power supply[J]. Food Control, 2017,73:619-626.

[7] AIKO V, EDAMANA P, MEHTA A. Decomposition and detoxification of aflatoxin B_1 by lactic acid[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2016,96(6):1959-1966.

[8] RUSHING B R, SELIM M I. Aflatoxin B_1: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods[J]. Food and Chemical Toxicology,2019,124:81-100.

[9] IRAM W, ANJUM T, IQBAL M, et al. Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B_1 and B_2 by *Corymbia citriodora* aqueous extracts[J]. Scientific Reports, 2015, 5:14672.

[10] 王宁,马秋刚,张建云,等. 黄曲霉毒素的传统去毒方法和生物降解研究进展[J]. 饲料与畜牧,2008(7):17-19. WANG N, MA Q G, ZHANG J Y, et al. Research progress on traditional detoxification methods and biodegradation of aflatoxin[J]. Feed and Husbandry, 2008(7):17-19.(in Chinese)

[11] RISA A, KRIFATON C, KUKOLYA J, et al. Aflatoxin B_1 and zearalenone-detoxifying profile of *Rhodococcus* type strains[J]. Current Microbiology, 2018, 75(7): 907-917.

[12] SHAO S, CAI J, DU X, et al. Biotransformation and detoxification of aflatoxin B_1 by extracellular extract of *Cladosporium uredinicola*[J]. Food Science and Biotechnology,2016,25(6):1789-1794.

[13] ARVANITOYANNIS I. Mycotoxins in food: detection and control[J]. International Journal of Food Science and Technology,2005,40:339-341.

[14] KOLOSOVA A, STROKA J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review[J]. World Mycotoxin Journal,2011,4(3):225-256.

[15] ALBERTS J F, GELDERBLOM W C A, BOTHA A, et al. Degradation of aflatoxin B_1 by fungal laccase enzymes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(1):47-52.

[16] CAO H, LIU D L, MO X M, et al. A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B_1 conversion: purification and ESI-MS/MS identification[J]. Microbiological Research, 2011,166(6):475-483.

[17] WU Y Z, LU F P, JIANG H L, et al. The furofuran-ring selectivity, hydrogen peroxide-production and low K_m value are the three elements for highly effective detoxification of aflatoxin oxidase[J]. Food and Chemical Toxicology,2015,76:125-131.

[18] MARIMÓN SIBAJA K V, OLIVEIRA GARCIA S, FELTRIN A C P, et al. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology,2019,94(4):1187-1194.

[19] DAS C. *In vitro* degradation of aflatoxin B_1 by horse radish peroxidase[J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 309-313.

[20] WANG J Q, OGATA M, HIRAI H, et al. Detoxification of aflatoxin B_1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624[J]. FEMS Microbiology Letters,2011,314(2):164-169.

[21] CHEN R, MA F, LI P W, et al. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts [J]. Food Chemistry,2014,146:284-288.

[22] LIU Y L, MAO H J, HU C Q, et al. Molecular docking studies and *in vitro* degradation of four aflatoxins (AFB_1, AFB_2, AFG_1, and AFG_2) by a recombinant laccase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Science, 2020,85(4):1353-1360.

[23] HAACK M B, OLSSON L, HANSEN K, et al. Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2006,70(4):482-487.

[24] NELSON G E N, TRAUFLER D H, KELLEY S E, et al. Production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* in 20-liter fermentors[J]. Industrial & Engineering Chemistry, 1952,44(5):1166-1168.

[25] KAUP B A, EHRICH K, PESCHECK M, et al. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example[J]. Biotechnology and Bioengineering,2008,99(3):491-498.

[26] 朱振家. 甜瓜抗白粉病化学诱导物筛选及诱导抗性机

理研究[D]. 兰州：甘肃农业大学，2007.

[27] SUIJDAM J C，KOSSEN N W F，PAUL P G. An inoculum technique for the production of fungal pellets [J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology，1980，10(3)：211-221.

[28] WITTENBERG K M，INGALLS J R，DEVLIN T J. The effect of lactobacteria inoculation on corn silage preservation and feeding value for growing beef animals and lambs [J]. Canadian Journal of Animal Science，1983，63(4)：917-924.

[29] LARSEN H，EIMHJELLEN K E. The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*：the effect of acidity[J]. The Biochemical Journal，1955，60(1)：135-139.

[30] PAPAGIANNI M，MOO-YOUNG M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures：fungal morphology and inoculum effects [J]. Process Biochemistry，2002，37(11)：1271-1278.

[31] PAPAGIANNI M，MATTEY M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level：application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology [J]. Microbial Cell Factories，2006，5：3.

[32] GRIMM L H，KELLY S，HENGSTLER J，et al. Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia [J]. Biotechnology and Bioengineering，2004，87(2)：213-218.

[33] TENG Y，XU Y，WANG D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering，2009，32(3)：397-405.

[34] CHEN X L，ZHOU J，DING Q，et al. Morphology engineering of *Aspergillus oryzae* for *L*-malate production [J]. Biotechnology and Bioengineering，2019，116(10)：2662-2673.

[35] HILLE A，NEU T R，HEMPEL D C，et al. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology and Bioengineering，2005，92(5)：614-623.

[36] ZHOU Z X，DU G C，HUA Z Z，et al. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation[J]. Bioresource Technology，2011，102(20)：9345-9349.

[37] SPOHR A，CARLSEN M，NIELSEN J，et al. Morphological characterization of recombinant strains of *Aspergillus oryzae* producing α-amylase during batch cultivations [J]. Biotechnology Letters，1997，19(3)：257-262.

[38] BERENJIAN A，MAHANNAMA R，TOLBOT A，et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of Menaquinone-7 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2014，172(3)：1347-1357.

（责任编辑：刘冬梅）