失活乳酸菌去除链格孢酚单甲醚的工艺优化

李天植[#],薛雅文[#],马文怡,唐凤仙,单春会,姬华^{*},刘银珂,李如媛 (石河子大学食品学院,石河子 832003)

摘 要:目的 筛选高效吸附链格孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)的灭活菌种,对菌粉去除 AME 的工艺进行优化。**方法** 首先,通过高效液相色谱法鉴定灭活菌粉对 AME 的吸附能力,筛选出 AME 的 吸附能力最强的 A1-11 菌株。然后,单因素试验分析灭活乳酸菌菌粉添加量、AME 质量浓度、吸附时间、pH 对 AME 去除率的影响。最后,采用响应面法 Box-Behnken 设计对吸附 AME 的工艺条件进行优化。结果 得 出最适吸附条件为灭活乳酸菌菌粉添加量 1.2 g、AME 质量浓度 0.30 µg/mL、吸附时间 27 h、溶液 pH 4.5,预 测 AME 去除率为 51.05%,实际试验的 AME 去除率为 50.98%。同时建立了 AME 去除率与各因素间的二次多 元回归方程。并对该模型进行了验证,结果表明模型拟合程度高,与模型预测结果相近。结论 筛选出 A1-11 菌株吸附 AME 的能力最强的,研究结果可对林果中 AME 的脱除提供实际应用价值。 关键词:失活乳酸菌;吸附;链格孢酚单甲醚

Process optimization for the removal of alternariol monomethyl ether by inactivated lactic acid bacteria

LI Tian-Zhi[#], XUE Ya-Wen[#], MA Wen-Yi, TANG Feng-Xian, SHAN Chun-Hui, JI Hua^{*}, LIU Yin-Ke, LI Ru-Yuan

(College of Food Science and Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

ABSTRACT: Objective To screen the inactivated strains with high adsorption efficiency for alternariol monomethyl ether (AME), and optimize the process of removing AME by bacterial powder. **Methods** Firstly, the adsorption capacity of inactivated bacterial powder to AME was identified by high performance liquid chromatography, and A1-11 strain with the strongest adsorption capacity to AME was screened. Then, the effects of inactivated lactic acid bacteria powder addition, AME mass concentration, adsorption time and pH on AME removal rates were analyzed by single factor test. Finally, the response surface method Box-Behnken design was used to optimize the process conditions for adsorption of AME. **Results** The most suitable adsorption conditions were inactivated lactic acid bacteria powder addition of 1.2 g, AME mass concentration of 0.30 μ g/mL, adsorption time of 27 h, solution pH 4.5, the model predicts that the AME removal rate was 51.05%, and the actual test obtained AME removal rate of 50.98%. At the same time, a quadratic multiple regression equation between AME removal rate and various

基金项目:新疆生产建设兵团兵团英才项目、石河子大学大学生研究训练计划项目(SRP2023188)

Fund: Supported by the Corps Talent Project in Xinjiang Production and Construction Corps, and the Shihezi University Students' Research and Training Program Project (SRP2023188)

[#]李天植与薛雅文为共同第一作者

[#]LI Tian-Zhi and XUE Ya-Wen are Co-first Authors

^{*}通信作者: 姬华, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 767440370@qq.com

^{*}Corresponding author: JI Hua, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Shihezi University, Building 108, Community 31, Beisi Road, Shihezi 832003, China. E-mail: 767440370@qq.com

factors was established, and the model was verified. The results showed that the model had a high degree of fitting and was similar to the model prediction results. **Conclusion** The strain A1-11 with the strongest ability to adsorb AME has been screened out, and the results can provide practical application value for the removal of AME from forest fruits. **KEY WORDS:** inactivated lactic acid bacteria; adsorption; alternariol monomethyl ether

0 引 言

新疆红枣产量居全国第一^[1]。红枣水分含量高,易被 真菌感染患上"黑斑病"^[2],链格孢属真菌是"黑斑病"的主 要致病菌^[3-4]。链格孢(Alternaria spp.)普遍存在于土壤、植 物中,可侵染果蔬^[5-6]、谷物^[7-8]等产生链格孢霉毒素,链格 孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)是链格孢属 菌产生的主要真菌毒素之一,被人类和动物长期食用后会 引起急性或慢性毒性作用(基因诱变、遗传毒性、细胞突变、 致畸致癌等),对动物和人类都会造成严重的健康问题^[9-12]。 意大利国家监测计划(2017-2020 年)的数据显示 97 种谷 物食品、番茄制品和葵花籽样品中检出链格孢霉毒素交链 孢酚(alternariol, AOH)、AME、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)、腾毒素(tentoxin, TEN)和交链孢烯(altenuene, ALT), 油籽类谷物中 TeA 水平高达 16752 µg/kg^[13-14]。 ZHAO 等^[15]采用超高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱法, 对国内采集的 181 种小麦粉和 142 种小麦食品(包括干面 条、馒头和面包)中的 AOH、AME、TEN、TeA 进行了分 离和定量分析。99.4%的小麦粉样品中检出 TeA, TeA 是链 格孢菌污染产生的主要毒素,含量在1.76~520 ug/kg。欧洲 食品安全局根据风险评估,认为具有遗传毒性的链格孢霉 毒素应该引起人们的重视^[16]。目前关于 AME 的研究及数 据相对比较匮乏,在我国,甚至一些欧美发达国家和地区 也都没有颁布关于 AME 毒素的限量标准, 欧盟已经开始 着手制定链格孢毒素的最大残留限量标准[17-18]。

目前真菌毒素的脱除方法按照作用机制可以分为物 理控制法^[19]、化学控制法^[20-21]、生物控制法^[22-24]等。物理 控制法,通过清洗和人工剔选需耗费大量时间和劳动力, 毒素去除效果不尽人意^[25]。化学控制法,主要是通过酸、 碱、氧化剂等与毒素产生的反应使其化学结构被破坏,毒 性减弱或消失^[26-28],虽然去除效果好,但会破坏营养物质, 甚至生成新的有害物质,造成二次污染^[29-30]。生物脱毒法 相比较于其他方法起步较晚,但因其具有温和、解毒效率 高、特异性强、环保、营养物质损失较小等优点,目前成 为食品中真菌毒素脱除方法的研究热点^[31-33]。

生物吸附是指菌体细胞壁中的甘露聚糖、葡聚糖等多糖、蛋白质、脂质成分,通过非共价键、相互作用力等与毒素分子结合,形成毒素-菌体复合物^[22,33-34]。BANGAR等^[35]表明乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)可以通过从乳酸菌细胞壁分泌抗菌化合物来破坏真菌细胞进而控制真菌的

生长。真菌毒素的降解可以通过一种或多种机制来实现, 即利用 LAB 菌株产生的活细胞,利用 LAB 菌株产生的代 谢物和酶, 或通过 LAB 细胞壁吸附霉菌毒素。真菌毒素是 由于真菌种类在良好的环境下生长而产生的。HOUSSNI 等[36]研究乳酸发酵和乳酸菌对产真菌毒素真菌及其真菌毒 素的活性。结果表明, 乳酸菌可作为天然防腐剂, 防止真菌 毒素的污染,产生抑制产真菌毒素真菌生长的拮抗化合物 (有机酸、reuterin、脂肪酸、过氧化氢和环二肽化合物),以 及壁吸附和生物转化为无毒副产物, 使小麦面包从霉菌毒 素中脱毒。葛娜^[31]用傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、X 射线衍射(diffraction of X-rays, XRD)对吸附 TeA 的失活乳酸菌细胞进行表征,发现参与细 胞壁吸附作用的官能团主要有氨基、酯键、酰胺键、羧基、 烃基等, Zeta 电位的检测结果提示 TeA 的吸附也与细胞表 面电荷有关。国外有研究表明, 灭活细胞比活细菌细胞结 合真菌毒素能力更强,其形成的毒素-菌体复合物也更稳 定,是生物吸附法去除真菌毒素的重要研究方向[37]。因此, 本研究从3株对霉菌有抗性的魏斯氏乳酸菌 A1-3、A1-4、 A1-11 中筛选出一株高效吸附 AME 的灭活菌株制备成菌 粉,响应面设计优化吸附 AME 的试验条件,期望对实际应 用中链格孢霉毒素 AME 的脱除提供参考, 保护人类健康. 促进林果产业的持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

魏斯氏乳酸菌(Weissella cibaria) A1-3、A1-4、A1-11, 来源于石河子大学食品学院微生物实验室;干酪乳杆菌 (Lactobacillus casei)模式菌株,来源于北京生物保藏中心。 1.1.2 试 剂

盐酸、氢氧化钠(分析纯)、甲醇(色谱纯)(天津益仁达 化工有限公司); AME 标准品(色谱纯, 青岛普瑞邦生物工 程有限公司); 乙腈(色谱纯, 上海迈瑞尔化学技术有限公 司); 甲酸(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 丙 三醇(分析纯, 南京润升石化有限公司); 蒸馏水(优级纯, 广州屈臣氏食品饮料有限公司); MRS 肉汤、MRS 琼脂(生 物试剂, 青岛海博生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

BSA224S 万分之一电子天平(济南爱来宝仪器设备有限公司); MJ-350BE 恒温生化培养箱(上海秋佐科学仪器有

限公司); C9743 涡旋混合器(河北邢台德延科技有限公司); DS-CJ-1D 超净工作台(上海儒一恒温设备中心); TGL-16E 台式高速冷冻离心机(济南鑫宇鑫医疗设备有限公司); DGL-50B 立式高压蒸汽灭菌锅(上海力辰仪器科技有限公 司); BenchTop Pro 台式真空冷冻干燥机(美国 SP Scientific 公司); KQ-1500DB 数控超声波清洗器(北京海天友诚科技有 限公司); DT-111C 卧式恒温振荡培养箱(上海笃特科学仪器 有限公司); DT-111C 卧式恒温振荡培养箱(上海笃特科学仪器 有限公司); LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); R300 真空抽滤器(美国圣斯特国际集团); PHSJ-4A 台式 pH 计(上海 科晓科学仪器有限公司); Agilent 5 HC-C₁₈ (250 mm× 4.6 mm, 5 µm, 新疆晟世科技有限公司); 0.22 µm 滤膜、0.45 µm 滤 膜(江苏绿盟科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

将甘油管藏的3株魏斯氏乳酸菌A1-3、A1-4、A1-11 接种到液体培养基,再划线培养挑取单菌落进行纯化并充 分活化。冻干的干酪乳杆菌,接种于液体培养基中,在 37℃有氧培养24h活化。按10%的菌液接种量将活化后的 菌接种于液体培养基中,放入培养箱中进行培养。 1.3.2 各菌株生长情况

活化的菌种培养过程中(0~30 h),每隔2 h 吸取 200 μL 的菌液于酶标板中,测定菌液的 OD₆₀₀ 值。按照培养时间 和对应的 OD₆₀₀ 值掌握各菌株的生长情况。

1.3.3 灭活菌粉吸附剂的制备

菌株扩大培养之后,在 6000×g 离心 15 min,收集菌 泥,用蒸馏水洗涤菌泥至离心后上清液澄清为止。参照葛 娜等^[38]的方法,将4种菌泥121℃高压蒸汽灭活25 min,冷 却后将预冷的菌泥真空冷冻干燥。冷冻干燥后,研磨过筛 制得灭活菌粉吸附剂。

1.3.4 AME 的高效液相色谱检测方法

参照杨文蒿^[39]的方法,根据实际情况方法略微调整。 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测条件:色谱柱: Agilent 5 HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相 A: 0.1%甲酸;流动相 B: 100%乙腈; 均用 0.45 μm 滤膜抽滤后超声波脱气 15 min;梯度洗脱条件: 0~1 min, 20%~40% B; 1~22 min, 40%~60% B; 22~25 min, 60%~20% B; 进样量: 20 μL;流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35℃;紫外检测波长: 254 nm;样品检测前过 0.22 μm 有机 滤膜, AME 保留时间在 17.5 min。

1.3.5 AME 的标准曲线绘制

准确称取 0.1000 mg AME 标准品,用乙腈充分溶解后, 定容至 10 mL,配制成 10 μg/mL 的标准液。分别吸取 0.50、 0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.50 mL 的标准液,定 容至 10 mL,配制成不同质量浓度的标准液。过 0.22 μm 微 孔滤膜,冷藏备用。检测时,记录 AME 标准峰面积,以 AME 质量浓度(μg/mL)和对应的平均峰面积分别为横、纵 坐标,绘制 AME 标准曲线。

1.3.6 高效吸附 AME 菌株的筛选

4 种灭活菌粉分别准确称取 0.2000 g, 加入 20 mL 0.50 μg/mL AME 溶液, 放入 30°C, 150 r/min 的培养箱培养 24 h。以没有添加灭活菌粉吸附剂的 AME 溶液为空白对 照。菌粉吸附完后, AME 溶液 6000×g 离心 15 min, 取上清 液过 0.22 μm 有机滤膜, 检测 AME 含量。以没有添加灭活 菌粉吸附剂的 AME 溶液为空白对照, 做 3 组平行试验, AME 去除率计算公式见式(1)。

AME 去除率/%=

对照AME HPLC峰面积 – 吸附后AME HPLC峰面积 ×100%(1) 对照AME HPLC峰面积

1.3.7 单因素试验

(1)灭活乳酸菌菌粉添加量对 AME 的吸附影响

准确称 0.2000、0.4000、0.6000、0.8000、1.0000、1.2000 g 的灭活菌粉,加入 15 mL 0.50 μg/mL AME 溶液,在 25℃ 180 r/min 的培养箱培养 24 h。吸附结束后绘制菌粉添加量 与 AME 的吸附率的曲线图,评价灭活乳酸菌菌粉添加量 对 AME 的吸附影响。

(2) AME 质量浓度对 AME 的吸附影响

准确称取 6 份 1.0000 g 的灭活乳酸菌菌粉, 加入 15 mL 质量浓度分别为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 µg/mL 的 AME 溶液, 在 25℃ 180 r/min 的培养箱培养 24 h。吸附 结束后绘制 AME 质量浓度(µg/mL)与 AME 的吸附率的曲 线图, 评价 AME 质量浓度对 AME 的吸附影响。

(3)溶液 pH 对 AME 的吸附影响

将含 AME 的溶液 pH 分别调为 2.00、3.00、4.00、5.00、 6.00、7.00,将 1.0000 g 的灭活乳酸菌菌粉加入 15 mL 不同 pH 的含 0.50 μg/mL AME 的溶液中, 25℃ 180 r/min 的培养 箱培养 24 h。吸附结束后绘制溶液 pH 与 AME 的吸附率的 曲线图,评价溶液 pH 对 AME 的吸附影响。

(4)吸附时间对 AME 的吸附影响

将 1.0000 g 的灭活菌粉加入 15 mL 0.50 μg/mL AME 溶液中, 放入 25℃ 180 r/min 的培养箱分别培养 6、12、18、 24、30、36 h。吸附结束后绘制吸附时间与 AME 的吸附率 的曲线图, 评价吸附时间对 AME 的吸附影响。

单因素试验均以没有添加灭活菌粉吸附剂的 AME 溶 液为空白对照,每个处理设置 3 个重复。样品吸附完成后, 将 AME 溶液 6000×g 离心 15 min,取上清液过 0.22 μm 有 机滤膜,用 HPLC 检测 AME 含量。

1.3.8 Box-Behnken 响应面试验

参考单因素试验结果,以灭活乳酸菌菌粉添加量、链 格孢霉毒素 AME 质量浓度、溶液 pH、吸附时间为单因素, 以 AME 的吸附率为响应值,通过 Design-Expert 10.0 软件, 设计 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面试验,见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面试验因素水平编码表 Table 1 Box-Behnken response surface test factor level coding table

田孝	水平			
四赤	-1	0	1	
A: 灭活乳酸菌菌粉添加量/g	0.8	1.0	1.2	
B: 链格孢霉毒素 AME 质量浓度 /(μg/mL)	0.25	0.50	0.75	
C: 吸附时间/h	24	30	36	
D: 溶液 pH	4	5	6	

1.4 数据处理

通过 Design-Expert 10.0 软件进行响应值数据分析。 通过 Excel 2013 对数据处理,采用 SPSS 27.0 软件进行数 据的统计分析, Graphpad prism 9 进行显著性分析绘图。

2 结果与分析

2.1 各菌株的生长情况

干酪乳杆菌延滞期短,培养前4h生长缓慢,8~12h生长 迅速,之后趋于稳定。A1-3、A1-4、A1-11乳酸菌,生长速度 不及干酪乳杆菌,3株乳酸菌在前12h缓慢稳定增殖,之后 A1-4、A1-11趋于稳定,A1-3在第16h时OD₆₀₀值达最大。

2.2 灭活菌粉的制备

按照 1.3.3 方法制备灭活菌粉吸附剂, 真空冷冻干燥 后的菌粉成块状, 将块状菌粉研磨过筛(60 目)密封保存。

2.3 AME 的标准品色谱图和标准曲线

AME 的标准品色谱图是 2.5 μg/mL 的 AME 标准品峰 形图,此峰基线平稳,峰形近似于正态分布曲线,没有出 现异常峰的情况,保留时间在 17.5 min 附近。按照 1.3.5 的 方法测得 AME 的标准曲线 *Y*=56212*X*+47860,相关系数 *r*²=0.9992,表明 AME 标准品各浓度与其相对应的峰面积 之间具有良好的线性关系。

由图 1 可知, A1-3、A1-4、A1-11 和干酪乳杆菌均对

2.4 AME 菌株的筛选





Fig.1 Adsorption rate of AME by different strains (n=3)

AME 有一定的吸附能力,其中 A1-11 在 0.2000 g 灭活菌粉, 20 mL 0.50 µg/mL AME 溶液, 30℃ 150 r/min 的吸附条件下, 对 AME 的去除率最高,达 21.56%。模式菌株干酪乳杆菌 对 AME 去除率最低。因此,选取 A1-11 菌株进行后续工艺 优化研究。

2.5 单因素试验结果分析

2.5.1 灭活乳酸菌菌粉添加量对 AME 的吸附影响

向 15 mL 0.50 μg/mL AME 溶液中分别加入 0.2~1.0 g 的灭活菌粉时, AME 的去除率逐渐升高, 当添加量达到 1.2 g 时, 去除率略有所下降。说明随着菌粉用量增加, 菌体数 量上升, 菌体细胞壁提供的毒素结合位点增多, 所以 AME 的去除率逐渐升高; 但当添加量过多时, 菌体数量过于饱 和, 细胞壁会因分子间作用力聚合, 使吸附结合位点变少, 导致去除率降低。葛娜等^[38]在利用灭活短乳杆菌对橙汁中 细交链孢菌酮酸 TeA 的吸附试验研究方面也有类似结论。 由此可知, 不是灭活菌粉用量越大, 毒素的吸附效果就越 好, 因此, 选择 1.0 g 为灭活菌粉的最佳用量。

2.5.2 AME 质量浓度对 AME 的吸附影响

将1.0000g的灭活菌粉分别加入15 mL质量浓度分别 为0.25~1.50 μg/mL的AME溶液中,A1-11对AME的吸附 率在逐渐降低。在AME质量浓度为0.25 μg/mL时,去除 率最高为35.69%,在1.50 μg/mL时最低为13.9%。说明 AME 在较低质量浓度时,菌体细胞壁有充足的吸附位点 与其结合,随着AME质量浓度升高,毒素分子增多,等量 的菌体细胞壁能提供的结合位点有限,所以A1-11对AME 的吸附率会越来越低。因此,选择0.25 μg/mL为AME的 最佳添加质量浓度。

2.5.3 吸附时间对 AME 的吸附影响

将 1.0000 g 的灭活菌粉加入 15 mL 0.50 μg/mL AME 溶 液中分别培育 6~36 h 后, AME 的去除率快速上升, 在 24 h 时去除率达到最高,为 35.6%,之后基本达到吸附平衡, 去除率维持在 30%~35%之间,延长的吸附时间对 AME 的 去除没有意义,因此,选择 24 h 为 AME 的最佳吸附时间。 2.5.4 溶液 pH 对 AME 的吸附影响

将 1.0000 g 的灭活乳酸菌菌粉加入 15 mL pH 分别为 2~7 的 AME 溶液中, AME 去除率随溶液 pH 的升高也逐渐 上升,在 pH=5 时最高,为 39.38%,之后逐渐下降。原因可 能是在低 pH 时,溶液中过多的正电荷影响细胞壁中的黏 附物质与毒素结合,抑制毒素在菌体上的吸附,随着 pH的 升高,溶液中的负电荷逐渐增多,有益于毒素在菌体上的 吸附,但过多的负电荷不利于 AME 的吸附。因此,确定最 佳溶液 pH 为 5。

2.6 Box-Behnken 响应面优化试验结果及分析

利用 Design-Expert 10.0 软件对表 2 的数据多元回归 拟合,得到 AME 去除率(Y)对灭活乳酸菌菌粉添加量(A)、 AME 质量浓度(B)、吸附时间(C)、溶液 pH (D)的多元二次 回归方程为: Y=45.66+7.72A-8.55B+3.86C-2.28D-3.59AB+ 1.46AC-2.60AD+10.99BC+7.36BD-3.48CD-8.94A²-8.83B²-9.96C²-6.33D²。

表 2 响应面试验设计与试验结果 Table 2 Response surface test design and test results

试验号	A/g	$B/(\mu g/mL)$	C/h	D	AME 去除率/%
1	1.0	0.50	30	5	50.71
2	1.0	0.75	24	5	8.52
3	1.0	0.75	30	5	24.60
4	1.2	0.50	24	5	26.57
5	1.0	0.25	36	5	24.66
6	1.0	0.25	30	6	32.37
7	1.2	0.25	30	5	48.21
8	1.0	0.50	36	4	36.87
9	1.0	0.25	30	4	49.52
10	0.8	0.50	36	5	26.07
11	1.0	0.25	24	5	41.26
12	1.0	0.50	30	5	47.41
13	0.8	0.75	30	5	12.23
14	1.0	0.50	24	4	26.53
15	1.2	0.50	30	6	34.56

					表 2(续)
试验号	A/g	$B/(\mu g/mL)$	C/h	D	AME 去除率/%
16	0.8	0.50	24	5	14.60
17	1.0	0.50	30	5	44.80
18	0.8	0.50	30	6	23.53
19	1.0	0.50	30	5	44.99
20	1.0	0.75	36	5	35.87
21	1.0	0.50	30	5	42.24
22	1.0	0.50	36	6	21.83
23	1.2	0.50	36	5	43.87
24	1.2	0.75	30	5	20.24
25	1.2	0.50	30	4	42.93
26	0.8	0.50	30	4	21.51
27	1.0	0.75	30	6	29.16
28	0.8	0.25	30	5	25.84
29	1.0	0.50	24	6	25.40

由表 3 可知,回归模型的 P<0.0001,失拟项 P>0.05, 且模型对试验的预测值与实际值之间有良好的相关性 (R²=0.9414),说明响应面回归模型对A1-11吸附AME试验 的模拟方程可靠有效。一次项A、B、C,二次项A²、B²、 C²和交互项 BC、BD 对 AME 去除率有极显著或显著的影 响。各因素对 AME 去除率影响由大到小的顺序是: B>A>C>D。

表 3 回归模型方差分析结果 Table 3 Analysis of variance for response surface fitting regression equations

方差来源	 平方和	自由度	均方	F	Р	显著性
模型	3716.11	14	265.44	16.07	< 0.0001	**
Α	714.56	1	714.56	43.26	< 0.0001	**
В	816.93	1	816.93	49.46	< 0.0001	**
С	178.56	1	178.56	10.81	0.0054	**
D	52.52	1	52.52	3.18	0.0962	
AB	51.55	1	51.55	3.12	0.0991	
AC	8.50	1	8.50	0.51	0.4850	
AD	26.99	1	26.99	1.63	0.2219	
BC	482.90	1	482.90	29.24	< 0.0001	**
BD	138.04	1	138.04	8.36	0.0119	*
CD	48.37	1	48.37	2.93	0.1091	
A^2	524.65	1	524.65	31.77	< 0.0001	**
B^2	472.58	1	472.58	28.61	0.0001	**
C^2	650.33	1	650.33	39.37	< 0.0001	**
残差	231.23	14	16.52			
失拟项	190.47	10	19.05	1.87	0.2866	
纯误差	40.77	4	10.19			
总和	3947.34	28				

注:*代表显著;**代表极显著。

由图 2 可知, $B 与 D_{\Lambda}B 与 C$ 的交互作用较明显。当 AME 质量浓度 0.25 μ g/mL,吸附时间 24 h 时,等高线沿 AME 质量 浓度方向变化较快,而沿灭活菌粉添加量方向变化较慢,表

明 AME 质量浓度对 AME 去除率的影响高于灭活菌粉添加 量。当菌粉用量为 1.0 g, 溶液 pH 为 5, AME 质量浓度变化明 显快于吸附时间,在 AME 较低质量浓度时,去除率较高。



图 2 四因素间交互作用响应面图和等高线图 Fig.2 Surface plots and contour plots of interaction between the 4 factors

2.7 预测模型的验证

为了进一步验证 AME 吸附预测模型的准确性,将试 验结果与模型的预测进行比较。模型分析得出最优吸附条 件:灭活菌粉添加量 1.19 g、AME 质量浓度 0.29 µg/mL、 吸附时间 26.94 h、溶液 pH 4.49,预测 AME 去除率为 51.05%。说明二次多项式模型拟合效果好,响应面优化 灭活菌粉吸附 AME 的工艺条件是可靠的。为方便实际 操作,取灭活乳酸菌菌粉添加量 1.2 g、AME 质量浓度 0.30 µg/mL、吸附时间 27 h、溶液 pH 4.5,实际试验的 AME 去除率为 50.98%。

3 讨论与结论

本研究对高效吸附 AME 的菌种进行筛选,并将其制 成灭活菌粉吸附剂对 AME 进行吸附工艺优化,在单因素 试验基础之上,利用响应面法对影响去除率的因素及其交 互作用进行分析,结果表明:通过对 3 株魏斯氏乳酸菌 A1-3、A1-4、A1-11 和模式菌株干酪乳杆菌生长曲线的测 定,可得知 A1-3、A1-4、A1-11 增殖速度缓慢,菌体细胞 数量较少,干酪乳杆菌增殖迅猛,吸光度值最大。通过 HPLC 对 4 种菌株吸附链格孢霉毒素 AME 能力的测定,结 果表明 A1-3、A1-4、A1-11 的吸附效果良好,其中 A1-11 的吸附率最高,为 21.56%,干酪乳杆菌的吸附率最低,因 此选用 A-11 菌株进行后续得工艺优化。

根据响应面法对各因素及其交互作用对 AME 去除率 的影响进行分析,确定各因素对 AME 去除率的影响大小 为: AME 质量浓度>灭活乳酸菌菌粉添加量>吸附时间>溶 液 pH。葛娜等^[38]利用灭活菌体细胞对柑橘汁中链格孢霉 毒素 TeA 的吸附工艺进行优化,得出 TeA 初始质量浓度> 吸附时间>橙汁 pH>灭活菌粉添加量,与本研究得到结果有 所不同。最适吸附工艺参数: 灭活乳酸菌菌粉添加量 1.2 g、 AME 质量浓度 0.30 μg/mL、吸附时间 27 h、溶液 pH 4.5。 此条件下得 AME 去除率为 50.98%,同时建立了 AME 去 除率与各影响因素间的二次多项回归模型,试验结果与预 测模型结果相近,说明响应面优化灭活菌粉吸附 AME 的 工艺参数合理、可靠,模型拟合程度高,预测效果好。

参考文献

HU D, FAN Y, TAN Y, et al. Metabolic profiling on Alternaria toxins and components of Xinjiang jujubes incubated with pathogenic Alternaria

alternata and *Alternaria tenuissima* via orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(38): 8466–8474.

 [2] 许瑛,姚兆群,王兰,等. 枣果黑斑病对南疆红枣品质的影响[J]. 西北 农业学报,2018,27(6):908-914.
 XU Y, YAO ZQ, WANG L, *et al.* Effects of jujube black rot on fruit

quality of jujube in South Xinjiang [J]. Acta Agric Boreali-Occident Sin, 2018, 27(6): 908–914.

- [3] JIANG M, LI Y, SONG J, et al. Study on black spot disease detection and pathogenic process visualization on winter jujubes using hyperspectral imaging system [J]. Foods, 2023, 12(3): 435.
- [4] LI W, YUAN S, LI Q, et al. Methyl p-coumarate inhibits black spot rot on jujube fruit through membrane damage and oxidative stress against *Alternaria alternate* [J]. Postharvest Biol Technol, 2018, 145: 230–238.
- [5] ZHOU J, ZHANG DD, CHEN XH, *et al.* Investigation on the occurrence and contamination of multi-mycotoxin in chestnut and jujube (red date) [J]. J Chromatogr A, 2021, 1659: 462–486.
- [6] PRENDES LP, MERÍN MG, ZACHETTI VGL, et al. Impact of antagonistic yeasts from wine grapes on growth and mycotoxin production by Alternaria alternata [J]. J Appl Microbiol, 2021, 131(2): 833–843.
- [7] KHAN AM, KHAN M, SALMAN HM, et al. Detection of seed-borne fungal pathogens associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds collected from farmer fields and grain market [J]. J King Saud Univ-Sci, 2023, 35(4): 102590.
- [8] XU X, ZHANG L, YANG X, et al. Alternaria spp. associated with leaf blight of maize in Heilongjiang Province, China [J]. Plant Dis, 2022, 106(2): 572–584.
- [9] TANG X, CHEN Y, ZHU X, et al. Alternariol monomethyl ether toxicity and genotoxicity in male sprague-dawley rats: 28-day in vivo multi-endpoint assessment [J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2022, 873: 503435.
- [10] WANG H, GUO Y, LUO Z, et al. Recent advances in Alternaria phytotoxins: A review of their occurrence, structure, bioactivity, and biosynthesis [J]. J Fungi, 2022, 8(2): 168.
- [11] DORIS MARKO. *Alternaria* toxins in food-an underestimated hazard [J]. Arh Hig Rada Toksiko, 2021, 72: 19.
- [12] LIN H, JIA B, WU A. Cytotoxicities of co-occurring alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid on human gastric epithelial cells [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 171: 113524.
- [13] QIAO X, YIN J, YANG Y, et al. Determination of Alternaria mycotoxins in fresh sweet cherries and cherry-based products: Method validation and occurrence [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(44): 11846–11853.
- [14] PUNTSCHER H, COBANKOVIC I, MARKO D, et al. Quantitation of free and modified Alternaria mycotoxins in European food products by LC-MS/MS [J]. Food Control, 2019, 102: 157–165.
- [15] ZHAO K, SHAO B, YANG D, et al. Natural occurrence of Alternaria toxins in wheat-based products and their dietary exposure in China [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0132019.

- [16] VERONICA MTL, VERDINII E, SDOGATI S, et al. Monitoring Alternaria toxins in Italian food to support upcoming regulation [J]. Food Addit Contam B, 2021, 15(1): 10-11.
- [17] PAVICICH MA, CÁRDENAS P, POSE GN, et al. From field to process: How storage selects toxigenic Alternaria spp. causing mouldy core in red delicious apples [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 322: 108575.
- [18] LIANG YF, ZHOU XW, WANG F, et al. Development of a monoclonal antibody-based ELISA for the detection of Alternaria mycotoxin tenuazonic acid in food samples [J]. Food Anal Method, 2020, 13: 1594–1602.
- [19] MATUMBA L, POUCKE CV, EDIAGE EN, et al. Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contaminated white maize [J]. Food Addit Contam A, 2015, 32(6): 960–969.
- [20] 常晓娇, 王峻, 孙长坡, 等. 二氧化氯对几种主要真菌毒素的降解效果研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(9): 113–118.
 CHANG XJ, WANG J, SUN CP, *et al.* Research on degradation of chlorine dioxide in primary mycotoxins [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2016, 31(9): 113–118.
- [21] JALILI M, JINAP S, SON R. The effect of chemical treatment on reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black and white pepper during washing [J]. Food Addit Contam A, 2011, 28(4): 485–493.
- [22] JANI-HAJNAL E, KOS J, ORI D. Stability of *Alternaria* toxins during bread-making process [J]. Food Feed Res, 2019, 46(1): 73–81.
- [23] NDIAYE S, ZHANG M, FALL M, et al. Current review of mycotoxin biodegradation and bioadsorption: Microorganisms, mechanisms, and main important applications [J]. Toxins, 2022, 14(11): 729.
- [24] LI P, SU R, YIN R, et al. Detoxification of mycotoxins through biotransformation [J]. Toxins, 2020, 12(2): 121.
- [25] 张光友,夏先林,顾明. 饲料中霉菌毒素的吸附技术研究概述[J]. 贵州畜牧兽医, 2011, 35(4): 20–22.
 ZHANG GY, XIA XL, GU M. Overview of research on adsorption technology of mycotoxins in feed [J]. Guizhou J Anim Husb Vet Med, 2011, 35(4): 20–22.
- [26] LIU M, ZHAO L, GONG G, et al. Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2022, 13(1): 1–16.
- [27] 覃振斌, 虞霖田, 熊晓妍. 霉菌毒素污染饲料现状及预防应对措施[J]. 广西农学报, 2021, 36(4): 36–39.
 QIN ZB, YU LT, XIONG XY. Current situation and preventive measures of mycotoxin contamination in feed [J]. J Guangxi Agric, 2021, 36(4): 36–39.
- [28] 殷传振. 4 种霉菌毒素的吸附和降解效果研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.

YIN CZ. Study on the effect of adsorption and degradation of 4 kinds of mycotoxins [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2015.

[29] PATRICIA LÓPEZ, DINI VENEMA, THEO DE RIJK, et al. Occurrence

of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands [J]. Food Control, 2016, 60: 196–204.

- [30] 何国鑫,邓青芳,周欣. 链格孢霉毒素的分析方法及其毒理机制研究 进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(4): 342–346, 352.
 HE GX, DENG QF, ZHOU X. Research progress of analytical methods and toxicological mechanisms for *Alternaria* mycotoxins [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- [31] 葛娜. 失活微生物细胞去除橙汁中链格孢霉素 TeA 的分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
 GE N. Molecular mechanism of *Alternaria* toxin tenuazonic acid from

citrus juice by inactivated microbial cells [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.

- [32] ZHU Y, HASSAN YI, LEPP D, et al. Strategies and methodologies for developing microbial detoxification systems to mitigate mycotoxins [J]. Toxins, 2017, 9(4): 130.
- [33] LYAGIN I, EFREMENKO E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: Origins and mechanisms of catalytic action [J]. Molecules, 2019, 24(13): 2362.
- [34] GUO W, FAN K, NIE D, et al. Development of a QuEChERS-based UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six Alternaria toxins in grapes [J]. Toxins, 2019, 11(2): 87.
- [35] BANGAR SP, SHARMA N, KUMAR M, et al. Recent developments in applications of lactic acid bacteria against mycotoxin production and fungal contamination [J]. Food Biosci, 2021, 44: 101444.
- [36] HOUSSNI IEL, KHEDID K, ZAHIDI A, et al. The inhibitory effects of lactic acid bacteria isolated from sourdough on the mycotoxigenic fungi growth and mycotoxins from wheat bread [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2023. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102702
- [37] 陈漪汶,李溪,雷柳琳,等.活性与灭活乳酸菌吸附霉菌毒素的机制[J]. 饲料工业,2018,39(18): 57-64.

CHENG YW, LI X, LEI LL, *et al.* Adsorption mechanism of mycotoxins by active and inactivated lactic acid bacteria [J]. Feed Ind, 2018, 39(18): 57–64.

- [38] 葛娜, 彭帮柱, 徐晓云, 等. 失活乳酸菌去除柑橘汁中链格孢霉毒素 TeA 工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 256–262.
 GE N, PENG BZ, XU XY, *et al.* Optimization of adsorption removal of *Alternaria* mycotoxin TeA from citrus juice by inactive lactic acid bacteria [J]. Food Sci, 2017, 38(14): 256–262.
- [39] 杨文蒿. 海泡石对链格孢毒素 AOH 和 AME 的吸附研究[D]. 湘潭: 湘 潭大学, 2019.

YANG WS. Study on the adsorption of sepiolite for *Alternaria* mycotoxins AOH and AME [D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2019.

(责任编辑:张晓寒郑 丽)

作者简介



李天植,硕士研究生,主要研究方向 为食品微生物。 E-mail: 2787705873@qq.com



薛雅文,硕士研究生,主要研究方向 为果蔬产品中真菌毒素脱除。 E-mail: 850485441@qq.com



姬 华,博士,教授,主要研究方向为
 食品安全。
 E-mail: 767440370@qq.com