

利用 *Saccharomyces cerevisiae* KD 控制苹果汁中棒曲霉素的污染

朱瑞瑜^{1,2}, 陈水铝¹, 黄聪辉^{1,2}, 楼芳菲³, 尤玉如¹, 马莉莉¹

(1. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江杭州 310023;

2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江杭州 310023;

3. Coalescence, LLC, 美国俄亥俄州 43219)

摘要: 研究一株食品生产用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KD 在培养基及市售 100% 苹果汁中对棒曲霉素污染的控制作用。通过高效液相色谱法对棒曲霉素进行定量, 分析起始棒曲霉素浓度、菌体接种量和培养基 pH 对 *S. cerevisiae* KD 去除棒曲霉素活力的影响; 利用酶标仪监测 *S. cerevisiae* KD 的生长状况, 且通过检测可溶性固形物、酸度、总酚、黄酮含量对菌体发酵后苹果汁的品质进行了评估。结果表明: 有氧条件下 *S. cerevisiae* KD 能够在 28 h 内完全去除培养基中的棒曲霉素, 其去除机理包括物理吸附和酶解; 在较低的起始棒曲霉素浓度和较高的菌体接种量条件下, *S. cerevisiae* KD 对棒曲霉素的去除率较高, 但在培养后期, 不同菌体接种量下棒曲霉素的去除率接近一致; 实验还发现酸性条件有利于 *S. cerevisiae* KD 去除棒曲霉素。此外, *S. cerevisiae* KD 对棒曲霉素的耐受性较强, 甚至在棒曲霉素浓度高达 100 mg/L 的环境中依然能较好生长。在市售 100% 苹果汁中, *S. cerevisiae* KD 也能高效控制棒曲霉素的污染, 且与 *Lactococcus lactis* MG1363 联合发酵 2 d 后, 果汁中已无棒曲霉素检出, 总酚含量显著高于发酵前苹果汁 ($p < 0.05$), 发酵果汁的品质较好。结论: *S. cerevisiae* KD 可有效控制食品中棒曲霉素的污染, 具有潜在的应用前景。

关键词: *Saccharomyces cerevisiae* KD, 棒曲霉素, 污染控制, 耐受性, 发酵, 品质评估

Patulin Contamination Control by *Saccharomyces cerevisiae* KD in Apple Juice

ZHU Rui-yu^{1,2}, CHEN Shui-lv¹, HUANG Cong-hui^{1,2}, LOU Fang-fei³, YOU Yu-ru¹, MA Li-li¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China;

2. Zhejiang Provincial Key Lab for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Products, Hangzhou 310023, China;

3. Coalescence, LLC, Columbus, Ohio 43219, United States)

Abstract: In the present study, the efficacy of a strain of food grade yeast *Saccharomyces cerevisiae* KD on patulin contamination control in medium and commercial 100% apple juice was evaluated. Patulin content was measured by HPLC, and the influences of initial patulin content, strain concentration and pH value on patulin reduction by *S. cerevisiae* KD were analyzed. The growth status of *S. cerevisiae* KD was detected by multiscan spectrum. Besides, the quality of the fermented apple juice, including the contents of soluble solids, titratable acid, total phenols and flavone, was evaluated. The results demonstrated that patulin was removed completely within 28 h by *S. cerevisiae* KD under aerobic incubation, and the mechanism of patulin reduction included physical adsorption, as well as enzymatic degradation. Lower initial patulin content and higher strain concentration contributed to higher patulin reduction ratio, however, the reduction rate of the treatments with different initial strain concentrations trended to come close to each other in the later stage of the reaction. Acidic condition was found to be conducive to patulin reduction. Furthermore, *S. cerevisiae* KD was tolerant to patulin, and could still grow well at patulin concentration as high as 100 mg/L. Moreover, patulin contamination in commercial 100% apple juice was also effectively controlled by *S. cerevisiae* KD. Patulin was undetectable in the apple juice after fermentation by *S. cerevisiae* KD and *Lactococcus lactis* MG1363 together for 2 days. Content of total phenol was significantly increased after fermentation ($p < 0.05$), and the quality of the fermented product was also found satisfying. In summary, *S. cerevisiae* KD was a promising tool to effectively reduce patulin contamination in commercial food.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* KD; patulin; contamination control; tolerance; fermentation; quality evaluation

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)18-0099-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.18.019

收稿日期: 2018-04-25

作者简介: 朱瑞瑜 (1986-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全、农产品加工与质量控制, E-mail: zhuruiyu7@126.com。

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ16C200003)。

引文格式:朱瑞瑜,陈水铝,黄聪辉,等.利用 *Saccharomyces cerevisiae* KD 控制苹果汁中棒曲霉素的污染[J].食品工业科技,2018,39(18):99-104.

据美国农业部(USDA)官网 2017 年的报道,全世界每年大约有 25% 的农作物受到真菌毒素的污染;真菌毒素污染成为我国农产品出口欧盟的最大阻碍^[1-2]。棒曲霉素是自然界中一种常见的真菌毒素,广泛存在于水果、蔬菜、谷物、海鲜、坚果及其制品中。棒曲霉素对细菌、酵母、植物、哺乳动物以及人类均有毒害作用^[3]。短时间内大量摄入棒曲霉素会引起急性中毒,表现为恶心、呕吐,肠胃功能紊乱、膀胱和肝脏等器官病变等;慢性中毒包括诱发肿瘤、致癌、致畸及潜在的遗传毒性等^[4-6]。虽然各国家和地区设立了棒曲霉素在食品中的限量标准,但棒曲霉素的污染依然较为普遍。2017 年中国的一次抽检结果显示,在由果汁、果干、果酱组成的 137 个样品中,棒曲霉素的检出率为 31%,超标率为 17.5%^[7]。

微生物法被认为是一种有效去除棒曲霉素的方法之一。近几年来,已分离得到多种可去除棒曲霉素的菌株,比如 *Candida guilliermondii*^[8]、*Sporobolomyces*^[9]、*Rhodospiridium paludigenum*^[10]、*Rhizopus isolates*^[11] 以及 *Pichia caribbica*^[12] 等。然而,这些已报道的微生物中,绝大多数并非食品生产用微生物,因而无法直接应用到食品中。

本文研究了食品生产用微生物 *Saccharomyces cerevisiae* KD 对棒曲霉素的去除作用,并将其应用到被棒曲霉素污染的市售 100% 苹果汁中,发酵 2 d 后对发酵苹果汁的品质进行了评价,以期降低果汁中棒曲霉素的污染提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

商业化葡萄酒酿造菌株(*Saccharomyces cerevisiae* Vitilevure KD) 法国 Martin Vialatte;乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363) 德国 MoBiTec;氢氧化钠、没食子酸、福林酚、碳酸钠、亚硝酸钠、酚酞指示剂 国药集团化学试剂有限公司;抗坏血酸(>99.0%)、无水乙醇、乙酸乙酯、冰醋酸、醋酸钠 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;NYDB 液体培养基(8 g 牛肉浸膏、5 g 酵母浸出粉和 10 g 葡萄糖溶于 1 L 蒸馏水);MRS 培养基 杭州微生物试剂有限公司;100% 苹果汁 北京汇源食品饮料有限公司。

Waters 2695 液相制备色谱 美国 Waters;SpectraMax M3 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices;NDK-12W 水浴氮吹仪 上海皓庄(LNB)仪器有限公司;SW-CJ-1FD 净化工作台 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;LDZF-50KB 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;BSP-250 生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BS-IEA 振荡培养箱 国华电器有限公司;手持折光仪 上海仪电物理光学仪器有限公司;Milli-Q Academic 超纯水仪 美国 Milli-pore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的去除作用 将活

化两代的 *S.cerevisiae* KD 接种于无菌 NYDB 液体培养基中,使其菌体起始浓度为 10^7 CFU/mL,同时加入棒曲霉素,使培养基中棒曲霉素浓度分别为 0、1 mg/L(0 为对照组)。将样品置于 28 ℃、150 r/min 的摇床中培养,分别在培养 12、16、20、24、28 h 后,离心取上清液,检测培养液中棒曲霉素的含量。

1.2.2 灭活和活体 *S.cerevisiae* KD 菌体对棒曲霉素的去除作用 在 28 ℃、150 r/min 振荡条件下大量培养 *S.cerevisiae* KD,48 h 后将菌液等量分成两组,其中一组于 85 ℃ 水浴 30 min,灭活酵母;另一组不做任何处理。分别向两组菌液以及无菌 NYDB 培养基(作为对照)中加入等量的棒曲霉素,使得体系中棒曲霉素浓度为 5 mg/L。将上述处理置于 28 ℃、150 r/min 振荡培养,培养 1、3 d 后分别检测菌液中棒曲霉素的残留量。

1.2.3 棒曲霉素起始浓度和菌体起始浓度对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素的影响 向无菌 NYDB 液体培养基中加入棒曲霉素,使得棒曲霉素起始浓度分别为 1、10、30、50 mg/L;将 *S.cerevisiae* KD 接种到上述培养基中,接种量为 10^7 CFU/mL;以含等量棒曲霉素但不含 *S.cerevisiae* KD 的培养基作为对照。将样品置于 28 ℃、150 r/min 的摇床中培养,分别在培养 12、24、36 h 后,检测培养液中棒曲霉素的含量。

将 *S.cerevisiae* KD 接种到 NYDB 液体培养基中,起始接种量分别为 0 、 10^5 、 10^6 、 10^7 CFU/mL(0 为对照组);向上述培养基中加入棒曲霉素,使其起始浓度为 5 mg/L。将样品置于 28 ℃、150 r/min 的摇床中培养,分别在培养 6、12、24、36 h 后,检测培养液中棒曲霉素的含量。

1.2.4 培养基 pH 对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素的影响 用 NaOH 溶液(1 mol/L)和 HCl 溶液(1 mol/L)将 NYDB 培养基的 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0。将活化好的 *S.cerevisiae* KD 分别接种到上述不同 pH 的培养基中,接种量为 0 、 10^7 CFU/mL(0 为对照),培养基中棒曲霉素起始浓度为 5 mg/L。将 96 孔板置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h,每隔 3 h 测定菌体吸光值(OD_{600}),并分别在 12、24、36、48 h 检测培养液中棒曲霉素的含量。

1.2.5 *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的耐受力 将活化两代的 *S.cerevisiae* KD 接种到含 NYDB 培养基的 96 孔板中,使得培养基中起始菌体浓度为 10^7 CFU/mL,棒曲霉素的起始浓度分别为 0、3、5、10、50、100 mg/L。将 96 孔板置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 33 h,每隔 3 h 测定菌体吸光值(OD_{600})。

1.2.6 *S.cerevisiae* 和 *L.lactis* 对苹果汁中棒曲霉素的去除作用及发酵果汁的品质评估 本课题组前期研究发现,*L.lactis* MG1363 能够有效去除液体中的棒曲霉素(数据未显示)。将 *S.cerevisiae* 和 *L.lactis* 混合接种于市售 100% 苹果汁中(棒曲霉素起始浓度为 5 mg/L),并设置不同的处理对苹果汁进行发酵。处

理一:两菌株初始浓度均为 5×10^6 CFU/mL,样品置于 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 120 r/min 的摇床中培养 48 h ;处理二: 5×10^6 CFU/mL 的 *S.cerevisiae* 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 120 r/min 的摇床中培养 24 h 后,加入 5×10^6 CFU/mL 的 *L.lactis*,样品置于 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 120 r/min 的摇床中继续培养 24 h ;处理三与处理二相同,但全程均为静置培养;处理四:两菌株起始浓度均为 5×10^6 CFU/mL,样品置于 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 120 r/min 的摇床中培养 24 h 后,继续静置培养 24 h 。除了处理三外,其余样品在培养前均添加 9% 蔗糖。培养结束后,对样品中棒曲霉素的残留量进行了测定,并对发酵苹果汁的品质进行了评估,主要检测了样品中的可溶性固形物、酸度、黄酮和总酚的含量。

1.2.7 指标测定方法

1.2.7.1 发酵后苹果汁品质指标测定 利用手持折光仪检测可溶性固形物;总酸的测定参考国标 GB/T 12456-2008^[13] 的方法进行,最后结果以苹果酸表示(苹果酸换算系数为 0.067);总酚的检测参照国标 GB/T 31740.2-2015^[14] 的方法进行;黄酮含量的检测参照郑亚美等^[15] 的方法进行。设置未经任何处理的市售 100% 纯苹果汁作为对照。

1.2.7.2 棒曲霉素的提取与检测 棒曲霉素的提取方法:向待测溶液中加入等体积乙酸乙酯,于 180 r/min 小摇床中震荡 3 h 后,于 3000 r/min 转速下离心 3 min ,收集有机相并于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下进行氮吹,用 AABS 缓冲液(0.45 mL 冰醋酸、 0.15 g 醋酸钠溶解于 40 mL 双蒸水中,调整 pH 至 4.0)溶解、过滤,待用。

棒曲霉素含量检测参考 Zhu 等^[16] 的方法并进行适当修改:采用高效液相色谱系统,选取 C-18 反向色谱柱(Phenomenex $250 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, USA),流动相为水(0.04% 乙酸, v/v)和乙腈 $90:10$ (v/v),流速 1 mL/min 。检测波长为 276 nm ,柱温恒定为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

棒曲霉素去除率($\%$) = (对照组棒曲霉素含量 - 处理组棒曲霉素含量) / 对照组棒曲霉素含量 $\times 100$

通过绘制标准曲线获得的棒曲霉素含量计算公式如下:

$x = (y + 605.71) / 135.87, R^2 = 0.9999$;其中, x 为棒曲霉素含量 ($\mu\text{g/L}$), y 为峰面积。

1.3 数据处理

测定菌体吸光值实验中每个处理设置 6 个平行,其他实验中每个处理设置 3 个平行,每组实验重复 3 次。采用 SPSS 软件 22.0 进行数据分析;采用 ANOVA 进行邓肯氏差异分析($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 S.cerevisiae KD 对棒曲霉素的去除作用

2.1.1 S.cerevisiae KD 在 NYDB 培养基中对棒曲霉素的去除作用 *S.cerevisiae* KD 可以有效降低培养基中棒曲霉素的含量,结果如表 1 所示。有氧培养 12 h 后, *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的去除率为 74.9% ;培养 28 h 后,培养基中已检测不到棒曲霉素。Moss 等^[17] 利用 *S.cerevisiae* 71B 降解棒曲霉素,发现在有氧

条件下培养 100 h 后,棒曲霉素含量只减少了约 20% 。因此,本研究中选用的 *S.cerevisiae* KD 在有氧条件下,可高效去除培养基中的棒曲霉素。为探寻 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素的机理,本研究比较了灭活酵母和活体酵母对棒曲霉素含量的影响,结果如图 1 所示。

表 1 S.cerevisiae KD 在 NYDB 培养基中对棒曲霉素的去除率
Table 1 Patulin reduction rate by S.cerevisiae KD in NYDB medium

时间(h)	棒曲霉素去除率(%)
12	74.9 ± 0.8
16	86.5 ± 0.3
20	94.2 ± 0.3
24	98.4 ± 0.1
28	100

2.1.2 灭活和活体 S.cerevisiae KD 菌体对棒曲霉素的去除作用 由图 1 可知,灭活酵母可降低溶液中棒曲霉素的含量,由此推断 *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素有物理吸附作用。在相同的培养条件下,活体酵母对棒曲霉素的去除率明显高于灭活酵母:培养 1 d 时,活体酵母对棒曲霉素的去除率为 79.35% ,而灭活酵母去除率仅为 21.92% ;培养 3 d 后,活体酵母去除率达到 97.82% ,灭活酵母去除率没有显著变化($p > 0.05$)。此外, *S.cerevisiae* KD 在本实验前期已培养了 48 h ,达到了稳定期,酵母菌体不再进行数量上的增长,但随着培养天数的增加,活体酵母组的棒曲霉素浓度出现了显著的下降($p < 0.05$),从而推断 *S.cerevisiae* KD 可以酶解棒曲霉素。由此可知, *S.cerevisiae* KD 既能物理吸附棒曲霉素,又能生物降解棒曲霉素。酵母细胞壁中的蛋白质与多糖和菌体吸附棒曲霉素紧密相关,而菌体表面的疏水作用在吸附棒曲霉素的过程中,也发挥着至关重要的作用^[18]。虽然目前已证实,不少微生物可以生物酶解棒曲霉素,然而迄今为止,尚未有报道分离纯化得到微生物降解棒曲霉素的相关酶类^[9,16]。

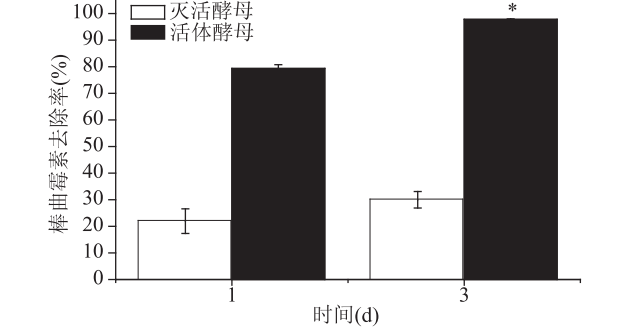


图 1 灭活和活体 S.cerevisiae KD 菌体对棒曲霉素的去除作用(NYDB 培养基中)

Fig.1 Patulin reduction by inactivated and viable cells of S.cerevisiae KD in NYDB medium

注:“*”表示同一处理下 3 d 与 1 d 的降解率相比有显著差异($p < 0.05$)。

2.1.3 棒曲霉素起始浓度和菌体起始浓度对 S.cerevisiae KD 去除棒曲霉素的影响 棒曲霉素起

始浓度对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素的影响如图 2 所示,当棒曲霉素浓度高达 50 mg/L, *S.cerevisiae* 依然可有效去除棒曲霉素。培养 24 h 后,棒曲霉素浓度为 1、10、30、50 mg/L 处理组的去除率分别为 93.8%、83.7%、65.7% 和 58.4%。*S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的去除率随起始棒曲霉素浓度升高而降低,这和棒曲霉素对酵母有毒性相关^[3]。

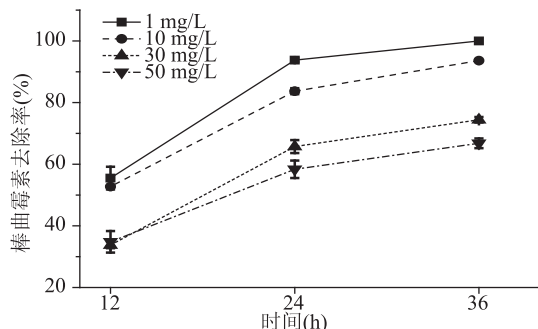


图2 棒曲霉素起始浓度对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素效率的影响(NYDB 培养基中)

Fig.2 Influence of initial patulin concentration on patulin reduction efficiency by *S.cerevisiae* KD in NYDB medium

酵母起始浓度越高,在初始阶段对棒曲霉素的去除效率越高(图 3)。当 *S.cerevisiae* KD 浓度为 10^6 、 10^7 CFU/mL 时,其对棒曲霉素的去除率明显高于酵母浓度为 10^5 CFU/mL 的处理组。但当培养时间达到 36 h 时,各组棒曲霉素的去除率均趋于 100%。随着菌体的生长和对棒曲霉素环境的适应,在培养后期较高的菌体起始浓度处理组不一定在棒曲霉素降解能力上呈现优势。Cao 等^[19]发现,当酵母起始浓度为 10^9 CFU/mL 时,培养 15 d 后其降解效果低于起始浓度为 5×10^8 CFU/mL 的处理组。

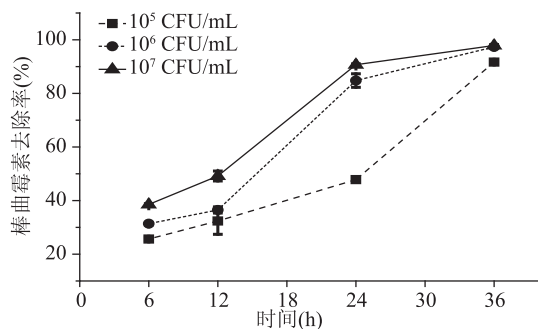


图3 酵母起始浓度对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素效率的影响(NYDB 培养基中)

Fig.3 Influence of initial yeast concentration on patulin reduction efficiency by *S.cerevisiae* KD in NYDB medium

2.1.4 培养基 pH 对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素的影响 由图 4 可知,当起始 pH 在 4.0~6.0 之间时, *S.cerevisiae* 对棒曲霉素有较好的去除效果。而不同 pH 下菌株的生长曲线(图 5)表明, *S.cerevisiae* 在 pH 为 5.0 和 6.0 的培养基中时,生长状态较佳,由此可见,菌体去除棒曲霉素的能力和生长状态有相关性。

2.2 *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的耐受力

不同浓度的棒曲霉素对 *S.cerevisiae* KD 生长的影响如图 6 所示。当棒曲霉素浓度在 3~100 mg/L 范

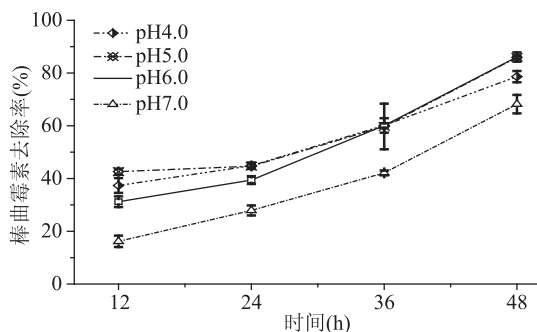


图4 NYDB 培养基 pH 对 *S.cerevisiae* KD 去除棒曲霉素效率的影响

Fig.4 Influence of pH value on patulin reduction efficiency by *S.cerevisiae* KD in NYDB medium

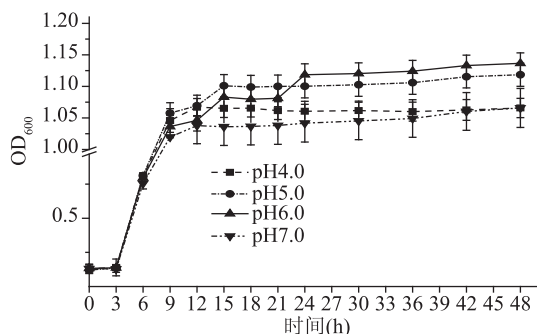


图5 NYDB 培养基 pH 对 *S.cerevisiae* KD 生长的影响

Fig.5 Influence of pH value on the growth of *S.cerevisiae* KD in NYDB medium

围内, *S.cerevisiae* KD 均能生长。在低棒曲霉素浓度(0~5 mg/L)下,菌体的生长并未受到明显的影响。当培养基中棒曲霉素的浓度为 10 mg/L 时,菌体的生长受到轻微抑制。据报道,棒曲霉素能破坏细胞膜和蛋白质结构的完整性,对酵母产生毒害作用,当棒曲霉素浓度为 8 mg/L 时,能完全抑制酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 的生长^[20]。而在本实验中,当棒曲霉素浓度低于 10 mg/L 时, *S.cerevisiae* KD 的生长并未受到明显影响;当棒曲霉素浓度高至 50 mg/L 时,菌体的生长受到明显抑制。然而,菌体在棒曲霉素浓度高达 100 mg/L 时依然能生长。因此推测,菌体可能通过降解棒曲霉素来增强自身对棒曲霉素的耐受力,这与 Castoria 等的报道相符^[21]。此外, Ianiri 等^[22]推测,棒曲霉素的生物降解由多个步骤组成,包括起始时菌体被激发起对棒曲霉素的耐受力。

2.3 *S.cerevisiae* KD 和 *L.lactis* MG1363 在苹果汁中对棒曲霉素的降解及发酵作用

在前期的实验基础上,设置 4 个处理组,利用 *S.cerevisiae* KD 和 *L.lactis* MG1363 对苹果汁进行混合发酵,2 d 后对所有处理组中的棒曲霉素含量进行检测,发现棒曲霉素均已被完全降解。进一步对发酵液中的总可溶性固形物、酸度、黄酮含量、总酚含量进行了检测。由表 2 可知,处理组三中可溶性固形物发生了显著下降($p < 0.05$),而其他处理组由于在发酵前添加了 9% 蔗糖,因而其可溶性固形物与纯苹

表2 发酵苹果汁的品质评估
Table 2 Quality assessment of fermented apple juice

处理组	可溶性固形物(%)	酸度(%苹果酸)	总酚含量 (mg/L 没食子酸)	黄酮含量 (mg/L 芦丁)	棒曲霉素残留量
对照(100%苹果汁)	9.9±0.1 ^b	3.3±0 ^d	66.8±0.9 ^c	13.2±3.7 ^a	\
处理一	9.8±0.3 ^b	4.6±0.1 ^a	82.9±4.5 ^b	10.9±0.8 ^a	\
处理二	10.7±0.6 ^a	4.6±0.1 ^a	91.6±3.2 ^{ab}	11.8±0.6 ^a	\
处理三	4.3±0.3 ^c	4.5±0.1 ^b	86.6±6.7 ^{ab}	12.8±2.5 ^a	\
处理四	10.7±0.3 ^a	4.2±0 ^c	95.2±4.7 ^a	12.9±1.1 ^a	\

注:不同小写字母表示同一列数据之间存在显著性差异($p < 0.05$);“\”表示未检出棒曲霉素。

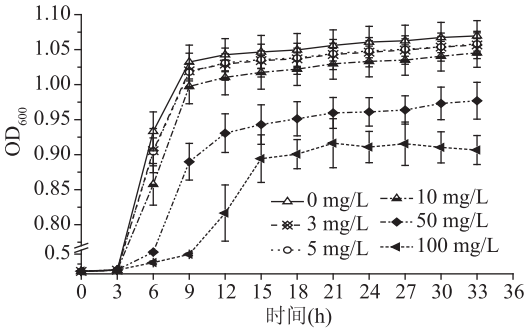


图6 *S.cerevisiae* 对棒曲霉素的耐受力(NYDB 培养基中)
Fig.6 Tolerance of *S.cerevisiae* to patulin in NYDB medium

果汁相比差异不大,甚至略有升高。同对照组相比,发酵后处理组一、二、三、四的酸度分别增加了1.3%、1.3%、1.2%、0.9%。酚类对果蔬的成熟衰老、抗病性、抗逆性均有重要影响,并有清除自由基、改善心血管疾病、抗发炎等活性^[23]。4个处理组中总酚含量分别比对照上升了24%、37%、29%、42%。然而,发酵前后苹果汁中黄酮的含量没有发生显著变化。目前,已知的微生物降解棒曲霉素的产物主要有 ascladiol 和 desoxypatulinic acid^[24],而 *S.cerevisiae* 降解棒曲霉素的产物为 ascladiol^[17]。据报道,棒曲霉素有较强的细胞毒性,而其降解产物 ascladiol 对人体的肝脏细胞、膀胱细胞、小肠细胞等均无细胞毒性^[25]。本文利用 *S.cerevisiae* KD 和 *L.lactis* 对苹果汁进行发酵,不仅控制了棒曲霉素的污染,去除了毒素的毒性,而且提高了苹果汁中的总酚含量,增加附加值。通过添加一定的风味物质并进行感官评定,可进一步改善发酵果汁的口感,为菌株在被棒曲霉素污染的苹果汁上的商业化应用打下基础。

3 结论

棒曲霉素是自然界中主要的真菌毒素之一,尤其在水果、谷物及其制品中较为常见。本研究表明, *S.cerevisiae* KD 在 NYDB 培养基和市售 100% 苹果汁中,均能高效控制棒曲霉素的污染,且酵母的起始浓度、棒曲霉素的起始浓度、环境 pH 等因素对酵母去除棒曲霉素的效率有一定程度的影响。 *S.cerevisiae* KD 对棒曲霉素的耐受力较强,在棒曲霉素浓度高达 100 mg/L 的环境下依然能较好生长。利用 *S.cerevisiae* KD 和 *L.lactis* MG1363 对苹果汁进行联合发酵,不仅能完全去除苹果汁中棒曲霉素的污染,还能增强果汁的营养价值。因此,本文的研究结果为控

制苹果汁中棒曲霉素的污染、保证食品安全,提供新的途径。

参考文献

[1] Rychlik M, Schieberle P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread [J]. European Food Research and Technology, 2000, 212 (3): 274-278.

[2] 黄明明. 真菌毒素: 隐形的食品风险 [J]. 农村·农业·农民 (B 版), 2014 (6): 25-26.

[3] Norstadt F A, McCalla T M. Phytotoxic substance from a species of *Penicillium* [J]. Science, 1963, 140: 410-411.

[4] de Melo F T, de Oliveira I M, Greggio S, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50 (10): 3548-3555.

[5] Ciegler A, Beckwith A C, Jackson L K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1976, 31 (5): 664-667.

[6] Hayes A W, Phillips T D, Williams W L, et al. Acute toxicity of patulin in mice and rats [J]. Toxicology, 1979, 13 (2): 91-100.

[7] Ji X, Li R, Yang H, et al. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China [J]. Food Control, 2017, 78: 100-107.

[8] Chen Y, Peng H M, Wang X, et al. Biodegradation mechanisms of patulin in *Candida guilliermondii*: an iTRAQ-based proteomic analysis [J]. Toxins, 2017, 9 (2): 48.

[9] Ianiri G, Pinedo C, Fratianni A, et al. Patulin degradation by the biocontrol yeast *Sporobolomyces* sp. is an inducible process [J]. Toxins, 2017, 9 (2): 61.

[10] Zhu R, Yu T, Guo S, et al. Effect of the yeast *Rhodosporidium paludigenum* on postharvest decay and patulin accumulation in apples and pears [J]. Journal of Food Protection, 2015, 78 (1): 157-163.

[11] Varga J, Peteri Z, Tabori K, et al. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99 (3): 321-328.

[12] Cao J, Zhang H, Yang Q, et al. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162 (2): 167-173.

[13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12456-2008. 食品中总酸的测定 [S]. 中华人民共和国国家标准, 2008.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准

标准化管理委员会.GB/T 31740.2-2015 茶制品 第2部分:茶多酚[S].中华人民共和国国家标准,2015.

[15]郑亚美,任娇艳,史传超.蜜柚叶黄酮的提取及其抗氧化与降尿酸活性研究[J].食品工业科技,2017,38(8):262-266,271.

[16]Zhu R,Feussner K,Wu T,et al.Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodosporidium paludigenum* [J]. Food Chemistry,2015,179:1-5.

[17]Moss M O,Long M T.Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Additives and Contaminants,2002,19(4):387-399.

[18]Guo C,Yuan Y,Yue T,et al.Binding mechanism of patulin to heat-treated yeast cell[J].Letters in Applied Microbiology,2012,55(6):453-459.

[19]Cao J,Zhang H,Yang Q,et al.Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples[J]. International Journal of Food Microbiology,2013,162(2):167-173.

[20]Papp G,Horváth E,Mike N,et al.Regulation of patulin-

(上接第76页)

Spirulina [J]. World Review of Nutrition & Dietetics,1995,77:32.

[2]张立彬,甄二英,李振永.螺旋藻的营养价值及培养[J].饲料世界,2006,(1):3-5.

[3]肖军,滕继林.植物螺旋藻研究进展[J].生物学教学,2014,39(5):7-8.

[4]张文,吴清平,吴军林.螺旋藻营养保健价值及开发应用进展[J].食品与发酵科技,2013,49(3):89-92.

[5]Liu Q,Huang Y,Zhang R,et al.Medical application of *Spirulina platensis* derived c-phycoyanin [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM,2016,2016(4):1-14.

[6]葛可佑,翟凤英,阎怀成.第三次全国营养调查报告[J].卫生研究,1992(25):3-15.

[7]田柳.富铬、富铁、富锌螺旋藻培养方法和食用安全性研究[D].武汉:湖北工业大学,2013:24-44.

[8]张爱萍,陈天仁,陈叶,等.富硒、富锌钝顶螺旋藻培养优化研究[J].河西学院学报,2014,30(2):72-76.

[9]Zinicovscaia I,Safonov A,Tregubova V,et al.Uptake of metals from single and multi-component systems by *Spirulina Platensis* biomass[J]. Ecological Chemistry and Engineering S,2016,23(3):401-412.

[10]周志刚,李朋富,刘志礼,等.三种螺旋藻及其蛋白质、多糖和脂类结合硒的研究[J].海洋与湖沼,1997,28(4):363-370.

[11]高海洋.LED光照对富锌和富硒螺旋藻生长的影响[D].湛江:广东海洋大学,2016.

[12]Kumar M,Kulshreshtha J,Singh GP.Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature [J]. Brazilian Journal of Microbiology,2011,42(3):1128-1135.

[13]Ferreira LS,Rodrigues MS,Carvalho JCMD,et al.Adsorption of Ni^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} , onto dry biomass of *Arthrospira*, (*Spirulina*) *platensis*, and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems [J]. Chemical Engineering Journal,2011,173(2):326-333.

induced oxidative stress processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50(10):3792-3798.

[21]Castoria R,Morena V,Caputo L,et al.Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples[J]. Phytopathology,2005,95(11):1271-1278.

[22]Ianiri G,Idnurm A,Wright S,et al. Searching for genes responsible for patulin degradation in a biocontrol yeast provides insight into the basis for resistance to this mycotoxin[J]. Applied & Environmental Microbiology,2013,79(9):3101-3115.

[23]蒋孟君,王艺,任建青,等.超声提取食用玫瑰花总酚及其大孔树脂纯化前后抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(23):164-169.

[24]McCormick S. Microbial detoxification of mycotoxins [J]. Journal of Chemical Ecology,2013,39:907-918.

[25]Tannous J,Snini S,El Khoury R,et al.Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E- and Z- ascladiol, are not toxic to human cells [J]. Archives of Toxicology,2017,91(6):2455-2467.

[14]唐全民,杨芳,郑文杰,等. Te(IV)对钝顶螺旋藻和极大螺旋藻的生物效应[J].暨南大学学报:自然科学与医学版,2003,24(5):75-80.

[15]Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism. [J]. Microbiological Reviews,1983,47(47):551-578.

[16]马成浩,于丽娟,彭奇均. pH对钝顶螺旋藻生长的影响[J].中国食品添加剂,2004(4):69-71.

[17]郑江,高亚辉,韦青阳,等.添加碳酸钙后螺旋藻中钙元素的分布及主要生化组成的变化[J].中国水产科学,2004(5):462-466.

[18]魏新林,聂明,吴丹丹,等.功能性富锌螺旋藻加工技术的研究[J].食品科学,2006,27(6):144-146.

[19]陈填烽.高富硒量螺旋藻的混养研究及硒的形态分析[D].广州:暨南大学,2005.

[20]郑江,高亚辉.极大螺旋藻生物富钙作用的研究[J].中国食品学报,2008,8(1):22-26.

[21]蒋召雪.微波消解-火焰原子吸收法测定木通中6种微量元素[J].安徽农业科学,2009,37(29):14181-14182.

[22]王俊伟,钱蜀,李海霞,等.电感耦合等离子体质谱法测定土壤样品中的痕量硒元素[J].中国环境监测,2012,28(3):97-100.

[23]武萌萌,刘士伟,李博生.螺旋藻小分子多肽制备工艺的研究[J].浙江农业学报,2010,22(6):802-807.

[24]陈望爱.溴化钾浸渍法在红外光谱分析中的应用[J].广州化工,2015(16):147-148.

[25]杨莹莹.极大螺旋藻高浓度培养及生物富硒的研究[D].青岛:中国海洋大学,2011.

[26]周志刚,钟罡,刘志礼.硒对极大螺旋藻生长及含硒量的影响[J].海洋科学,1997,21(5):42-45.

[27]曲荣君,阮文举,王祥梅,等.甲壳质-重金属离子配合物的红外光谱研究[J].离子交换与吸附,2000,16(3):213-218.

[28]刘海静,许长华,李伟明,等.基于红外指纹图谱的螺旋藻品质分析和蛋白含量测定[J].光谱学与光谱分析,2013,33(4):977-981.