

植物乳杆菌 QH06 清除赭曲霉素 A 的作用及其初步应用

郑香峰, 王诗苾, 陶佳欣, 曹悦, 杨振泉*

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要: 经过筛选、鉴定得到清除赭曲霉素 A (Ochratoxin A, OTA) 的植物乳杆菌 QH06, 并进一步研究其清除 OTA 的途径及其在食品中清除 OTA 的效果。通过研究植物乳杆菌 QH06 的活菌、死菌, 胞内、胞外代谢物, 细胞壁等对赭曲霉素 A (OTA) 的清除作用探究该乳酸菌清除 OTA 的途径, 并通过分析 QH06 在葡萄汁中清除 OTA 的效果对其应用进行评价。结果表明, 植物乳杆菌 QH06 活细胞和死细胞分别与质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA 共培养 48 h 后, OTA 的清除率分别为 83.61% 和 83.51%; QH06 胞内酶和胞外代谢物分别与质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA 共培养 72 h 后, OTA 质量浓度均在 90 ng/mL 之上; QH06 细胞壁与质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA 共孵育 72 h 后, OTA 质量浓度由 80.75 ng/mL (0 h) 降低至 13.81 ng/mL, 清除率为 82.90%。QH06 与含质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA 葡萄汁共培养 72 h 后, 葡萄汁中 OTA 的质量浓度降低至 15.23 ng/mL; 在含质量浓度为 20 ng/mL OTA 的葡萄汁中, QH06 对 OTA 清除率达到 100%。以上结果表明植物乳杆菌 QH06 通过细胞壁吸附作用清除食品中 OTA 污染, 为其在防治食品中 OTA 污染方面的应用提供了理论基础。

关键词: 赭曲霉素 A; 植物乳杆菌; 清除机制; 应用

文章编号: 1673-9078(2023)06-270-276

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0800

Scavenging Efficacy of *Lactobacillus plantarum* QH06 on Ochratoxin A and Its Preliminary Application

ZHENG Xiangfeng, WANG Shiyi, TAO Jiixin, CAO Yue, YANG Zhenquan*

(School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* QH06, a bacterium capable of scavenging ochratoxin A (OTA), was isolated through a screening process. Its OTA scavenging mechanism and efficacy in removing OTA from food items were subsequently evaluated. The OTA scavenging potential of *L. plantarum* QH06 active cells, inactive cells, intracellular and extracellular metabolites, and cell walls were investigated to elucidate the methods by which *L. plantarum* QH06 scavenges OTA. The practical application of *L. plantarum* QH06 was evaluated by analyzing its capacity to scavenge OTA in grape juice. The OTA scavenging rates of active and inactive *L. plantarum* QH06 cells were 83.61% and 83.51%, respectively, after co-culturing with 100 ng/mL of OTA for 48 h. The OTA concentration was still >90 ng/mL after co-culturing QH06 intracellular enzymes or extracellular metabolites with 100 ng/mL OTA for 72 h. However, the OTA concentration decreased from 80.75 ng/mL (0 h) to 13.81 ng/mL after co-incubating QH06 cell walls with 100 ng/mL OTA for 72 h, for a scavenging rate of 82.90%. Furthermore, the concentration of OTA in grape juice decreased from 100 ng/mL to 15.23 ng/mL after QH06 was co-cultured with grape juice containing 100 ng/mL of OTA for 72 h. In grape juice containing 20 ng/mL OTA, QH06 exhibited a 100% OTA scavenging rate. The results indicate that *L. plantarum* QH06 effectively scavenges OTA present in food through cell wall adsorption, providing a theoretical basis for its potential application in the mitigation and management OTA contamination in food.

Key words: ochratoxin A; *Lactobacillus plantarum*; scavenging mechanism; application

引文格式:

郑香峰,王诗苾,陶佳欣,等.植物乳杆菌 QH06 清除赭曲霉素 A 的作用及其初步应用[J].现代食品科技,2023,39(6):270-276.

ZHENG Xiangfeng, WANG Shiyi, TAO Jiixin, et al. Scavenging efficacy of *Lactobacillus plantarum* QH06 on ochratoxin A and its preliminary application [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 270-276.

收稿日期: 2022-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31901801); 扬州大学大学生科创项目 (X20200913)

作者简介: 郑香峰 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: zxf@yzu.edu.cn

通讯作者: 杨振泉 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: yangzq@yzu.edu.cn

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是由青霉属或曲霉属内一些菌株包括疣状青霉、赭曲霉、黑曲霉等产生的有毒次级代谢产物, 广泛存在于谷物、葡萄、咖啡、豆类、坚果等食品原料中^[1-5]。由于 OTA 的热稳定性, 使其极易进入食品原料的下游加工产品, 如面包、葡萄酒和咖啡饮料等^[6]。大量的动物毒性实验研究表明, 长期的 OTA 暴露会引起一系列毒性, 包括致癌性、免疫毒性、遗传毒性、肾毒性、肝毒性、胚胎毒性和致畸性等^[7]。因此, 国际癌症研究机构已将 OTA 归类为可能的人类致癌物 (2B group)。鉴于 OTA 污染在食品中的普遍性, 以及其广谱毒性, 许多国家或地区对食品中 OTA 含量实行了限量标准^[8-10]。其中欧盟对食品中 OTA 的含量制定了最为详细和严格的标准^[9]。尽管如此, 食用 OTA 污染的食品在日常生活中比较常见。食用被 OTA 污染的葡萄汁和葡萄酱是儿童摄入 OTA 的主要来源^[11]。因此, 消费者对食品中 OTA 污染的担心日益严重, 研究清除食品中 OTA 的方法对消费者的健康具有重要意义。

目前, 清除食品中 OTA 的方法主要包括物理方法 (微波、加热等)、化学方法 (臭氧、铵等)^[12,13] 和生物方法^[14,15]。物理和化学方法会导致食品营养价值、适口性、质地和其他品质下降, 并且化学物质与营养素之间相互作用可能会引起食品安全问题^[16]。使用微生物吸附食品中的 OTA 可以克服上述缺点, 是防治食品中 OTA 污染的一种有效、安全和经济的方法。Farbo 等^[17]通过念珠菌酵母细胞对 OTA 的吸附作用, 清除了葡萄汁中 80% 的 OTA (质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。Fuchs 等^[18]和 Mazurkiewicz 等^[19]研究发现, 乳酸菌菌株动物双歧杆菌和嗜酸乳杆菌可将 OTA 的含量分别降低 95% 和 79%。乳酸菌对 OTA 的清除是一个温和的过程, 因此与物理和化学方法相比, 它对产品质量的影响最小。最近, 许多研究报道, 一些菌株可以通过羧肽酶 A 和羧肽酶 Y 降解 OTA^[20]。酶的严格应用条件和未知的降解副产物毒性限制了它们在食品工业中的应用。因此, 利用微生物吸附清除食品中的 OTA 不会产生新的潜在有毒物质具有很大优势^[21]。

目前, 寻找能够高效清除 OTA 的乳酸菌菌株资源, 研究其清除途径及应用效果是利用乳酸菌防治食品中 OTA 污染的关键。因此, 本研究拟对分离自中国传统自然发酵食品青海泡菜中的 6 株乳酸菌清除 OTA 的作用进行研究, 筛选出具有高效 OTA 清除能力的菌株, 研究其清除途径及在食品中清除 OTA 的效果, 以评估其清除食品中 OTA 的应用潜力, 研究结果可为其后续应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

6 株乳酸菌均分离于中国传统自然发酵食品青海泡菜, 由本实验室保存; De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 乳酸菌培养基, 青岛海博生物有限公司; 细菌基因组提取试剂盒 Bacterial DNA Kit DP302, 北京天根生化科技有限公司; EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (RR320Q), TAKARA; 甲醇、乙腈, 色谱纯, Tedia; 赭曲霉毒素 A (OTA) 标准品, 青岛普瑞邦生物工程有限公司。将 5 mg OTA 标准品完全溶解于 5 mL 甲醇中, 得到质量浓度为 1 mg/mL 的 OTA 母液, 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 贮存在 -20 $^{\circ}\text{C}$, 根据后续实验需要配制相应浓度的 OTA 工作液 1。

HC-2066 离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; YXQ-75SII 高压灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; BSA223S-CW 天平, 购自赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; GNP-9270BS-III 隔水式恒温培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; SW-CJ-1F 无菌工作台, 苏州净化设备有限公司; ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 50 mm, 5 μm), 安捷伦科技有限公司; 1260 安捷伦高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; VCX150PB 超声破碎仪, 美国索尼克斯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养

菌株活化: 将从 -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 6 株乳酸菌 QH01、QH02、QH03、QH04、QH05、QH06 划线接种到 MRS 固体培养基中。将上述样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱, 培养 24 h, 挑取单菌落至装有 5 mL 新鲜 MRS 液体培养基的具塞试管, 将上述样品转移至恒温培养箱, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温培养 24 h~48 h, 直至乳酸菌进入对数期, OD_{600} 在 0.6 左右。

1.2.2 赭曲霉毒素 A 标准曲线的建立

分别配制浓度为 0、20、40、60、80、100 ng/mL 的 OTA 标准品, 利用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定 OTA 含量。检测条件为: 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 $\phi=45\%$ 乙腈和 55% 水 ($\phi=1\%$ 甲酸), 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL , 激发波长 333 nm, 发射波长 460 nm。OTA 标准品峰保留时间在 5.7 min。以不同浓度 OTA 标准品的保留峰面积与 OTA 浓度之间的相关性建立标准曲线, 得到标准曲线方程为:

$$y=0.1271x+0.031 (R^2=0.9997)$$

式中:

y —峰面积;

x —OTA 质量浓度。

1.2.3 清除赭曲霉素 A 的乳酸菌的筛选

分别将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个活化后的 QH01、QH02、QH03、QH04、QH05、QH06 菌株接入装有 5 mL 新鲜 MRS 培养基的具塞试管中,并添加终质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA。只含有终质量浓度为 100 ng/mL OTA 的 MRS 液体培养基作为对照组。实验组和对照组均设置 3 个重复。将上述样品置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,并分别在培养 0、24、48 h 后取样 1 mL,样品离心(4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min、5 min)后,将上清液转移到 1 mL 色谱甲醇中,振荡混匀,经 0.22 μ m 膜过滤后,利用 HPLC 进行检测。

1.2.4 QH06 菌株的鉴定

1.2.4.1 QH06 菌株 16S rDNA 测序

将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个的 QH06 菌株接入装有 5 mL 新鲜 MRS 培养基的具塞试管中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后收集菌体,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 DP302 提取 QH06 基因组 DNA。以 QH06 基因组 DNA 为模板,以 16S rDNA 通用引物 27-F 和 1492-R 为引物,扩增 QH06 的 16S rDNA 序列。PCR 体系及条件如下:总体积 40 μ L: 20 μ L 2 \times Premix (EmeraldAmp MAX PCR Master Mix), 27-F (5 μ mol/L) 和 1492-R (5 μ mol/L) 各 2 μ L, 1 μ L QH06 基因组 DNA, 15 μ L 超纯水。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min。第二步至第四步 32 个循环。反应结束后,凝胶电泳进行检测确认含有目的条带,将剩余的 PCR 反应物送至上海生工生物公司对 QH06 乳酸菌的 16S rDNA 进行测序,所用测序引物为通用引物 27F/1492R。

1.2.4.2 QH06 菌株进化树构建

利用在线数据库 NCBI 中的在线比对软件 Blastn 对测序得到的 QH06 菌株 16S rDNA 序列进行比较,得到与其高度同源的菌株及它们的 16S rDNA 序列。利用 MEAG7.0 对来源于 8 株不同菌株的 16S rDNA 序列(包括 QH06)进行 clustalW 聚类分析,并使用 MEAG7.0 建立了系统发育树,从而确定乳酸菌的进化分类地位。

1.2.5 QH06 活细胞和死细胞对 OTA 的清除作用

将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个的 QH06 接种至新鲜 5 mL MRS 液体培养基,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h。收集培养物至 10 mL 无菌离心管,10 000 r/min 离心 10 min,去除上清,收集菌体。向离心后得到的菌体加入 5 mL 生理盐水,并振荡悬浮,得到 QH06 活菌细胞。

将上述 QH06 活菌细胞样品置于 100 $^{\circ}$ C 热水中处理 15 min,使 QH06 细胞失活,得到 QH06 的失活细胞。分别向 QH06 活细胞及 QH06 失活细胞的样品中加入终浓度为 100 ng/mL 的 OTA,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,并分别在 0、24、48、72 h 取样并检测 OTA 浓度。每组样品设置 3 个重复。

1.2.6 QH06 细胞壁对 OTA 的吸附作用

将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个的 QH06 接种至新鲜 5 mL MRS 液体培养基,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h。收集培养物至 10 mL 无菌离心管,10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 5 mL 生理盐水冲洗 2 次。然后将细胞重悬于 5 mL 生理盐水中,超声破碎乳酸菌(300 W,间隔 2 s,工作 4 s,300 次)。超声结束后,10 000 r/min 离心 10 min,去除上清,得到 QH06 细胞壁残留物。加入 5 mL 生理盐水对细胞壁残留物进行悬浮。向上述样品添加最终质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,并分别在 0、24、48、72 h 取样,检测 OTA 浓度。对照组为含有终质量浓度为 100 ng/mL OTA 的生理盐水。每个实验组设置 3 个重复。

1.2.7 QH06 胞内酶和胞外代谢物的制备

将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个的 QH06 接种至新鲜 5 mL MRS 液体培养基,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h。收集培养物至 10 mL 无菌离心管,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液至 10 mL 无菌离心管,得到 QH06 的胞外代谢物。同时向离心得到的菌体中加入 5 mL 生理盐水,并充分悬浮。悬浮后的样品经 10 000 r/min,离心 10 min,去除上清,得到洗涤后的菌体。向菌体中加入 5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),进行超声破碎(300 W,间隔 2 s,工作 4 s,300 次)。待超声结束后,将样品离心(10 000 r/min,离心 10 min),收集上清,得到 QH06 胞内酶。

1.2.8 QH06 胞内酶和胞外代谢物对 OTA 的清除作用

分别取 5 mL QH06 胞内酶和胞外代谢物于 10 mL 无菌具塞试管中,并分别添加终浓度为 100 ng/mL 的 OTA,将上述样品置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,并分别在 0、24、48、72 h 取样,检测 OTA 浓度。方法如 1.2.3 所示。每组样品设置 3 个重复。

1.2.9 QH06 对葡萄汁中 OTA 的清除效果

将 100 μ L 每毫升含 1×10^8 个的 QH06 接种于 5 mL 新鲜 MRS 中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,收集培养物,在 10 000 r/min,离心 5 min,收集菌体并用无菌生理盐水(0.9% NaCl)洗涤 3 次,再悬浮于 1 mL 生理盐水中。按如下分组进行实验:第 1 组,5 mL 葡萄汁原料

(GJ-OTA)+OTA (20 ng/mL 或 100 ng/mL); 第 2 组, 5 mL 葡萄汁原料+OTA(20 ng/mL 或 100 ng/mL)+QH06 (由第一步获得) (GJ-OTA-Lp)。将上述样品在 37 °C 下培养, 并分别在 0、24、48、72 h 检测葡萄汁中 OTA 含量。每个实验组设置 3 个重复。

1.3 数据分析

所有数据用平均值±标准差表示, 数据用 SPSS 20.0 软件中的 *t* 检验进行统计学分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 清除 OTA 的乳酸菌的筛选

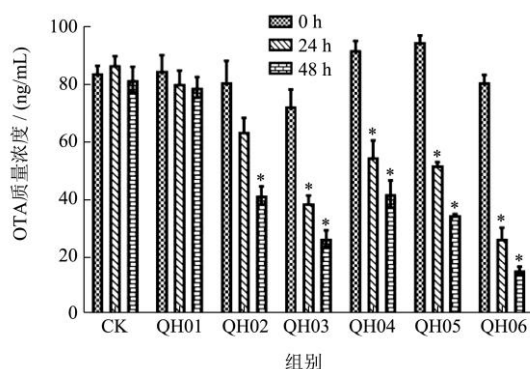


图 1 6 株乳酸菌对 OTA 的清除作用

Fig.1 Effect of six lactic acid bacteria strains on OTA removing

注: 数据为三次重复的平均值, 同组数据进行 *t* 检验, *代表与 0h 数据相比差异显著 ($P<0.05$)。

将 6 株从传统发酵食品青海泡菜分离的乳酸菌在 MRS 培养基中培养, 并对其清除 OTA 的能力进行了测定, 结果如图 1 所示。处理 48 h 后, 对照组 OTA 浓度基本没有变化, 质量浓度仍然高达 81.82 ng/mL。菌株 QH01 处理组中, OTA 质量浓度由 0 h 的 84.96 ng/mL 降至 48 h 后的 79.14 ng/mL, 清除作用有限。QH02 菌株处理组, OTA 质量浓度由 0 h 的 80.98 ng/mL 降至 48 h 后的 41.53 ng/mL, 清除率达到 48.72%。QH03 菌株处理组中, OTA 质量浓度由 0 h 的 72.57 ng/mL 降至 48 h 后的 26.51 ng/mL, OTA 清除率为 63.47%。QH04 和 QH05 菌株也可清除 OTA, 在 48 h 时两菌株对 OTA 的清除率分别为 54.43% 和 63.43%。QH06 菌株对 OTA 的清除作用最好, 处理 24 h 后 OTA 质量浓度由 80.87 ng/mL 降至 26.56 ng/mL, 清除率为 67.16%, 处理 48 h 后, OTA 质量浓度降至 15.47 ng/mL, 清除率达到 80.87%。不同乳酸菌清除 OTA 效率存在巨大差异, Luz 等^[22]研究了 *Lactobacillus plantarum* CECT 749、*L. rhamnosus* CECT 288、*L. johnsonii*、*L. bulgaricus*、*L. salivarius* 等乳酸菌对 OTA 的清除作用, 这些菌株对

质量浓度为 0.6 μg/mL 的 OTA 的清除效率在 1.6%~98.6% 之间。M ńguez 等^[23]分离到一株 *L. rhamnosus* 并发现其对 OTA 的清除率为 55%。赵琳等^[24]研究了 27 株植物乳杆菌对 OTA 的清除能力, 发现菌株 Lp22、Lp39 和 Lp4 通过吸附作用清除 OTA, 三株菌对质量浓度为 100 ng/mL 的 OTA 的吸附率不足 50%。Mohamed 等^[25]研究了 10 株乳酸菌对浓度为 10 ppb 的 OTA 的清除作用, OTA 的清除率分布在 80.4% 到 81.4% 之间。而本研究中, QH06 在 48 h 内对质量浓度为 100 ng/mL OTA 的清除率达到 80.87%, 是一株可用于清除 OTA 的优质资源菌株, 将其作为目标菌株进行后续研究。

2.2 QH06 的鉴定

对菌株 QH06 的 16S rDNA 基因进行测序, 将 QH06 的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行 Blastn 比对, 结果表明 QH06 菌株的 16S rDNA 与植物乳杆菌 *L. plantarum* 16S rDNA 序列高度同源。同时, 对 QH06 菌株的 16S rDNA 的进化地位进行了分析, 构建了其进化树。结果如图 2 所示, 进化树结果也表明, QH06 与植物乳杆菌 *L. plantarum* cczz3 高度同源, 处于同一进化分支, 进一步确定 QH06 菌株为植物乳杆菌, 将其命名为 *L. plantarum* QH06。

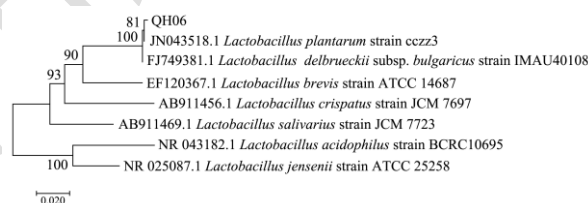


图 2 QH06 菌株 16S rDNA 进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rDNA of QH06 strain

2.3 *L. plantarum* QH06 清除 OTA 的特性研究

筛选得到的 QH06 菌株对 OTA 具有显著清除作用, 但其清除途径不明确。目前, 微生物清除 OTA 的途径主要有 2 个, 即自身的吸附作用以及酶的降解作用。因此, 对 QH06 菌株清除 OTA 的途径进行了研究。

2.3.1 *L. plantarum* QH06 活细胞和失活细胞对 OTA 的清除作用

对 *L. plantarum* QH06 活细胞和失活细胞清除 OTA 的作用进行了研究。结果如图 3 所示, *L. plantarum* QH06 活细胞处理 24 h 后, OTA 质量浓度由 85.37 ng/mL 降低至 26.91 ng/mL, 48 h 后 OTA 浓度进一步减少至 14.08 ng/mL, 清除率为 83.51%。而处理 72 h 后, OTA 质量浓度不再减少, 质量浓度为 14.06 ng/mL。*L. plantarum* QH06 失活细胞处理 24 h 后, OTA 质量浓度由 83.79 ng/mL 降低至 26.23 ng/mL, 清

除率为 68.70%，处理 48 h 后 OTA 质量浓度进一步减少至 13.73 ng/mL，清除率为 83.61%。处理 72 h 后，OTA 含量不再变化。由以上结果可知，*L. plantarum* QH06 活细胞和失活细胞在相同时间点对 OTA 的清除效率相差不大，说明 *L. plantarum* QH06 对 OTA 的清除对细胞活性不具有依赖性。乳酸菌清除 OTA 主要通过吸附和酶的降解两种途径，有研究表明乳酸菌对 OTA 的吸附作用不依赖于其活性，有些失活的乳酸菌细胞对 OTA 的吸附表现出更强的吸附作用。例如，Tabari 等^[26]研究了 *L. rhamnosus* GG 对 OTA 的吸附作用，活细胞对 OTA 的吸附率为 34.52%，而失活细胞对 OTA 的吸附率达到 45.45%，失活细胞对 OTA 的吸附效率显著高于活细胞。Piotrowska^[27]研究了 3 种乳酸菌（植物乳杆菌、短链乳杆菌和桑氏乳杆菌）对 OTA 清除情况，发现热灭活后的乳酸菌可以快速吸附 OTA，清除率达到 46.2%~59.8%。乳酸菌细胞失活后，细胞壁表面具有转运作用的功能基团不再发挥运输功能，不能将 OTA 转运至乳酸菌细胞内。而 OTA 的减少可能是因为乳酸菌细胞壁表面的基团对 OTA 的吸附作用。

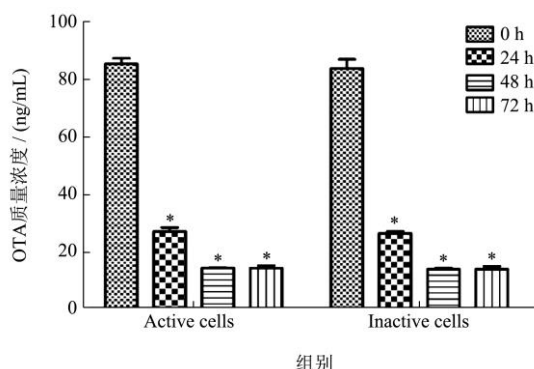


图 3 *L. plantarum* QH06 活细胞和失活细胞对 OTA 的清除作用

Fig.3 Effect of active or inactive *L. plantarum* QH06 cells on OTA removing

注：数据为三次重复的平均值，同组数据进行 t 检验，*代表与 0h 数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.2 *L. plantarum* QH06 细胞壁对 OTA 的清除作用

为了进一步验证 *L. plantarum* QH06 通过细胞壁的吸附作用清除 OTA，对 QH06 菌株细胞壁吸附 OTA 的作用进行了研究。结果如图 4 所示，处理 72 h 后对照组 (CK) 中 OTA 质量浓度始终维持在高点，变化不大。而 QH06 细胞壁处理 24 h，OTA 质量浓度显著降低，由 100 ng/mL (0 h) 降低至 23.59 ng/mL (24 h)，清除率为 76.41%。处理 48 h 后，OTA 质量浓度减少至 13.81 ng/mL，清除率为 86.19%。处理 72 h 后 OTA 质量浓度降低至 13.12 ng/mL。结果说明，QH06 菌株的细胞壁对 OTA 具有较强的吸附作用，可清除溶液状

态中高质量浓度的 OTA。乳酸菌的去毒机制之一是通过肽聚糖壁或肽聚糖壁表面上的蛋白与毒素结合，从而通过吸附作用将污染基质中的毒素清除^[28]。说明 *L. plantarum* QH06 细胞壁中可能存在与 OTA 结合的基团，这些基团对 OTA 的吸附起到关键作用，还需要后续研究来揭示 *L. plantarum* QH06 细胞壁中与 OTA 结合的基团类别及特征。

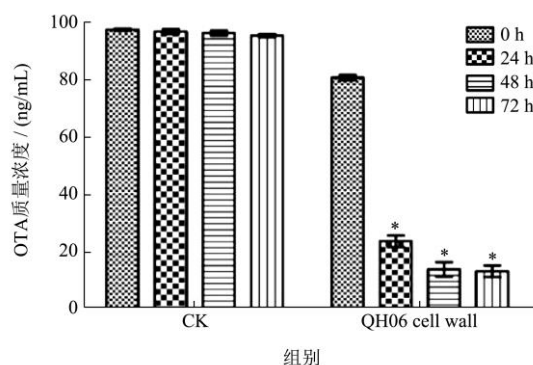


图 4 *L. plantarum* QH06 细胞壁对 OTA 的清除作用

Fig.4 Effect of cell wall of *L. plantarum* QH06 on OTA removing

注：CK 为对照组，QH06 cell wall 为 *L. plantarum* QH06 细胞壁。数据为三次重复的平均值，同组数据进行 t 检验，*代表与 0h 数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.3 *L. plantarum* QH06 胞内酶和胞外代谢物对 OTA 的清除作用

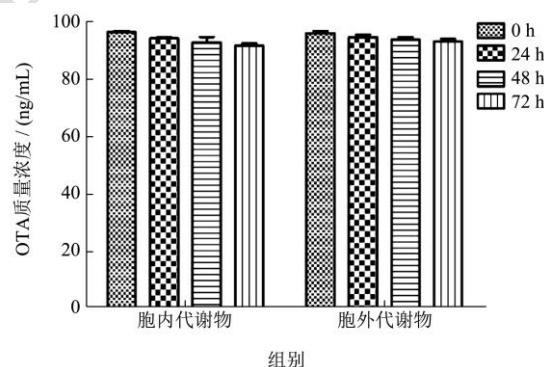


图 5 QH06 胞内酶和胞外代谢物对 OTA 的清除作用

Fig.5 Effect of intracellular or extracellular enzymes of QH06 on OTA removing

注：数据为三次重复的平均值。

Abrunhosa 等^[13]研究发现 *Pediococcus parvulus* 可在 MRS 培养基中将质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA 完全清除，进一步研究发现其清除 OTA 的机制为 *P. parvulus* 对 OTA 的降解作用。Luz 等^[22]的研究也发现 *L. plantarum* CECT 749 和 *L. rhamnosus* CECT 288 可通过分泌酶降解 OTA。因此，对 *L. plantarum* QH06 胞内酶及胞外代谢物对 OTA 的降解作用进行了研究，结果如图 5 所示。OTA 在不同处理、不同时间点 (0、24、48、72 h) 的质量浓度均保持稳定，维持在 90~100 ng/mL

之间。结果说明, QH06 菌株的胞内酶和胞外代谢物对 OTA 没有降解作用。

2.4 *L. plantarum* QH06 对葡萄汁原料中 OTA

的清除作用

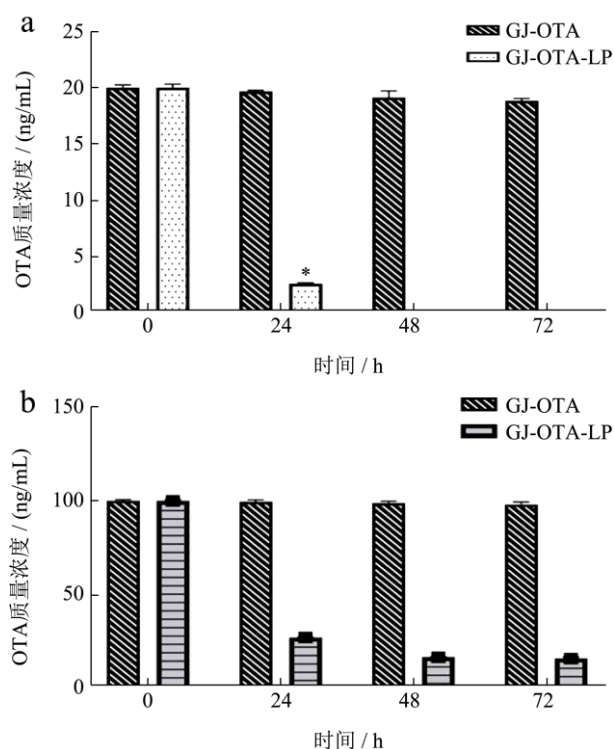


图6 *L. plantarum* QH06 对葡萄汁原料中 OTA 的清除作用

Fig.6 Effect of *L. plantarum* QH06 on OTA removing in grape juice

注: a 葡萄汁原料中添加 OTA 终质量浓度为 20 ng/mL; b 葡萄汁原料中添加 OTA 终质量浓度为 100 ng/mL。GJ-OTA 表示葡萄汁原料中只添加 OTA, GJ-OTA-Lp 表示葡萄汁原料中同时添加 OTA 和 *L. plantarum* QH06。数据为三次重复的平均值, 同组数据进行 *t* 检验, *代表与 0 h 数据相比差异显著 ($P < 0.05$)。

研究 *L. plantarum* QH06 清除 OTA 的作用及机制的目的是将 *L. plantarum* QH06 最终应用于食品中 OTA 污染的控制。因此, 对 *L. plantarum* QH06 清除葡萄汁原料中 OTA 污染的效果进行了分析, 结果如图 6 所示。在未添加 *L. plantarum* QH06 葡萄汁原料组中, OTA 质量浓度分由 0 h 的 20 ng/mL 和 100 ng/mL 降至 72 h 后的 18.82 ng/mL 和 98.18 ng/mL, 含量变化较小。在 20 ng/mL OTA 葡萄汁原料组中, 添加 *L. plantarum* QH06 处理 48 h 后, OTA 含量低于检测线, 被完全清除。在 100 ng/mL OTA 葡萄汁原料组中, 添加 *L. plantarum* QH06 处理 24 h 后, OTA 质量浓度降低至 26.56 ng/mL, 48 h 后 OTA 含量降低至 15.98 ng/mL, 72 h 后 OTA 质量浓度降低至 15.23 ng/mL。目前, 乳酸菌清除 OTA 的

研究主要集中在 MRS 培养基等适合乳酸菌生长的环境中。在食品中利用乳酸菌清除 OTA 的研究尚不多见。Zielinska 等^[29]报道了利用 *L. buchneri*、*L. reuteri*、*L. plantarum*, 和 *L. fermentum* 的混合菌清除玉米粒中 OTA 的效果, 结果发现 80% 的 OTA 被清除。OTA 在葡萄汁中的污染普遍存在。但是目前, 利用乳酸菌清除葡萄汁中 OTA 的研究并不多见。Maria 等^[30]对固定在海藻酸钙中的酵母细胞清除葡萄汁中的 OTA 的效果进行了研究, 结果表明其对葡萄汁中质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 OTA 的清除率为 83.38%。在本研究中, 添加 *L. plantarum* QH06 处理 48 h 后清除了葡萄汁原料中 84.77% 的 OTA (100 ng/mL), 结果说明 *L. plantarum* QH06 具有应用于食品中 OTA 防治的潜力。

3 结论

本研究对分离自中国传统自然发酵食品青海泡菜中的 6 株乳酸菌清除 OTA 的作用进行了研究, 筛选出 1 株对 OTA 具有高效清除作用的乳酸菌 QH06, 经分子生物学鉴定为植物乳杆菌, 命名为 *L. plantarum* QH06; 对 *L. plantarum* QH06 清除 OTA 的机制进行研究发现, 其活细胞和失活细胞对 OTA 具有清除作用, 细胞壁对 OTA 具有吸附作用, 胞内酶、胞外代谢物对 OTA 没有降解作用, 以上结果表明 *L. plantarum* QH06 清除 OTA 的机制为细胞壁对 OTA 的吸附作用; 进一步对 *L. plantarum* QH06 清除葡萄汁原料中 OTA 的实际应用效果进行了分析, 结果表明 *L. plantarum* QH06 可通过吸附作用完全清除低质量 (20 ng/mL) 的 OTA, 对高质量浓度 OTA (100 ng/mL) 的清除率达到 84.77%。

乳酸菌细胞壁对 OTA 的吸附作用受多重因素影响, 包括乳酸菌的生物量, 温度, pH, 细胞壁吸附基团的种类、数量、状态等。因此后续研究中还需要对上述因素在 *L. plantarum* QH06 吸附 OTA 过程中的影响进行深入研究。此外, 本研究中发现 *L. plantarum* QH06 细胞壁可以吸附 OTA, 那么 *L. plantarum* QH06 菌株细胞壁中是什么物质负责吸附 OTA 需要进一步探究; 最后, *L. plantarum* QH06 可以清除葡萄汁原料中的 OTA 污染, 而添加 *L. plantarum* QH06 后对葡萄汁原料品质、色泽、营养等方面的影响仍需要进一步探究。

参考文献

- [1] Abrunhosa L, Paterson R, Venancio A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination [J]. *Toxins*, 2010, 2(5): 1078-1099.
- [2] Stefano V D, Avellone G, Pitonzo R, et al. Natural co-occurrence of ochratoxin A, ochratoxin B and aflatoxins in

- sicilian red wines [J]. Food Additives and Contaminants, 2015, 32(8): 1343-1351.
- [3] 王刘庆,焦健,王蒙.葡萄及其制品中赭曲霉毒素 A 的污染与控制研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(2):612-619.
- [4] Amézqueta S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review [J]. Food Control, 2012, 26(2): 259-268.
- [5] O'callaghan J, Stapleton P C, Dobson A. Ochratoxin a biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli [J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43(4): 213-221.
- [6] Odhav, B. Naicker, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers [J]. Food Additives and Contaminants, 2002, 19(1): 55-61.
- [7] Pfohl-Leszkiwicz A, Manderville R A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(1): 61-99.
- [8] CODEX STAN 193-1995. Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed [S].
- [9] European Commission Regulation, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs [S]. No. 1881/2006 of 19 December 2006., Eur. Union 364, 2006: 5-24.
- [10] GB 2761-2017,食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S].
- [11] Afshar P, Shokrzadeh M, Kalhori S, et al. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran [J]. Food Control, 2013, 31(2): 525-529.
- [12] Yu J, Smith I N, Mikiashvili N. Reducing ochratoxin A content in grape pomace by different methods [J]. Toxins, 2020, 12(7): 424.
- [13] Abrunhosa L, Inês A, Rodrigues A I, et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 188: 45-52.
- [14] Sheikh-Zeinoddin M, Khalesi M. Biological detoxification of ochratoxin A in plants and plant products [J]. Toxin Reviews, 2019, 38(3): 187-199.
- [15] Quintela S, Villarán M C, López De Armentia I, et al. Ochratoxin A removal in wine: A review [J]. Food Control, 2013, 30(2): 439-445.
- [16] Mogensen J M, Varga J, Thrane U, et al. *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132(2): 141-144.
- [17] Farbo M G, Urgeghe P P, Fiori S, et al. Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 29-34.
- [18] Fuchs S, Sontag G, Stidl R, et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(4): 1398-1407.
- [19] Mazurkiewicz J. Degradation of ochratoxin A by *Lactobacillus acidophilus* K1 [J]. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2011, 14: 16-20.
- [20] Abrunhosa L, Santos L, Venâncio A. Degradation of ochratoxin a by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger* [J]. Food Biotechnology, 2006, 20(3): 231-242.
- [21] 白凤翎,励建荣.抗真菌性乳酸菌生物保护剂的研究进展[J].现代食品科技,2014,30(5):311-319.
- [22] Luz C, Ferrer J, Mañes J, et al. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 112, 60-66.
- [23] Míguez C L, Garrigues M, Ocaa L L, et al. Transformation of ochratoxin a by microorganisms isolated from tempranillo grapes in wine systems [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2020, 71(3): 19041.
- [24] 赵琳,金海涛,张瑞英,等.来源于传统发酵乳制品的植物乳杆菌对赭曲霉毒素的吸附作用研究[J].食品科技,2019,44(12): 17-23.
- [25] Fouad M, El Shenawy M, El Desouky T. Efficiency of selected lactic acid bacteria isolated from some dairy products on aflatoxin B1 and ochratoxin A [J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2021, 15(1): 312-319.
- [26] Tabari D G, Kermanshahi H, Golian A, et al. *In vitro* binding potentials of bentonite, yeast cell wall and lactic acid bacteria for aflatoxin B1 and ochratoxin A [J]. Iranian Journal of Toxicology, 2018, 12(2): 7-13.
- [27] Piotrowska M. The adsorption of ochratoxin a by *Lactobacillus* species [J]. Toxins, 2014, 6(9): 2826-2839.
- [28] Niderkorn V, Morgavi D P, Aboab B, et al. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(3): 977-985.
- [29] Zielińska K J, Fabiszewska A U. Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(1): 9.
- [30] Maria G F, Pietro P U, Stefano F, et al. Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 29-34.