

副干酪乳杆菌YS-816的筛选及脱除花生粕中黄曲霉毒素B₁应用

袁芳^{1,2}, 程玲², 杨祥龙², 宫智勇¹, 张奇^{2,3}, 李培武^{2,3}, 许琳^{1*}, 毛劲^{2,3*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北武汉 430062) (3. 湖北洪山实验室, 湖北武汉 430070)

摘要:花生粕是优质的蛋白原料, 但是其易受黄曲霉毒素污染, 开展花生粕中黄曲霉毒素脱毒减毒对保障饲料安全具有重要意义。该研究通过香豆素培养基初筛和液体发酵从传统酸菜中筛选出4株具有脱除黄曲霉毒素潜力的菌株。对比研究发现, 副干酪乳杆菌YS-816脱毒效果最好, 对黄曲霉毒素B₁的脱除率为70.05%; 对花生粕中黄曲霉毒素B₁的脱除率为54.08%。通过测定花生粕的蛋白质、氨基酸含量, 发现副干酪乳杆菌YS-816发酵可以提高花生粕中的蛋白质和氨基酸含量, 分别提高了1.73%和1.53%。为了探究脱毒减毒作用机制, 液体发酵试验表明, 菌悬液的吸附能力强于上清液的降解能力, 且副干酪乳杆菌YS-816和黄曲霉毒素B₁复合体经磷酸盐缓冲溶液(PBS)反复洗脱和模拟胃液消化后, 仍具有较高吸附率。因此, 从传统酸菜中筛选的副干酪乳杆菌YS-816能够脱除花生粕中黄曲霉毒素B₁, 且稳定性好。该研究可为副干酪乳杆菌在花生粕等饲料黄曲霉毒素脱除应用提供科学依据。

关键词:黄曲霉毒素B₁; 花生粕; 副干酪乳杆菌; 发酵

文章编号: 1673-9078(2025)04-316-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0345

Screening of *Lactobacillus paracasei* YS-816 and Its Application in Aflatoxin B₁ Detoxification from Peanut Meal

YUAN Fang^{1,2}, CHENG Ling², YANG Xianglong², GONG Zhiyong¹,

ZHANG Qi^{2,3}, LI Peiwu^{2,3}, XU Lin^{1*}, MAO Jin^{2,3*}

(1.School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(2.Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

(3.Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China)

Abstract: Peanut meal is a high-quality protein source, but is prone to aflatoxin contamination. Therefore, aflatoxin detoxification in peanut meal is of significant importance for ensuring feed safety. In this study, four strains with the potential for aflatoxin B₁ (AFB₁) detoxification were initially screened from traditional sauerkraut using coumarin medium. A

引文格式:

袁芳,程玲,杨祥龙,等.副干酪乳杆菌YS-816的筛选及脱除花生粕中黄曲霉毒素B₁应用[J].现代食品科技,2025,41(4):316-325.

YUAN Fang, CHENG Ling, YANG Xianglong, et al. Screening of *Lactobacillus paracasei* YS-816 and its application in aflatoxin B₁ detoxification from peanut meal [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 316-325.

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100703); 湖北省自然科学基金杰出青年项目(2022CFA107)

作者简介: 袁芳(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 黄曲霉毒素绿色消减, E-mail: 3262973221@qq.com

通讯作者: 许琳(1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: xulinlin2008@126.com; 共同通讯作者: 毛劲(1983-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: maojin106@whu.edu.cn

comparative study of the four strains showed that *Lactobacillus paracasei* YS-816 exhibited the highest detoxification rate of 70.05% for AFB₁; and its AFB₁ detoxification rate in peanut meal was 54.08%. In addition, protein and amino acid contents in the peanut meal were measured, and it was found that fermentation with *Lactobacillus paracasei* YS-816 enhanced the protein and amino acid contents by 1.73% and 1.53%, respectively. Liquid fermentation experiments were further conducted to investigate the detoxification mechanism. These revealed the adsorption capacity of *Lactobacillus paracasei* YS-816 suspension to be stronger than the degradation ability of the supernatant. Furthermore, the complex formed between *Lactobacillus paracasei* YS-816 and AFB₁ maintained a high adsorption rate even after repeated elution with phosphate-buffered saline (PBS) and digestion in simulated gastric juice. Thus, *Lactobacillus paracasei* YS-816, screened from traditional sauerkraut, was shown to effectively detoxify AFB₁ from peanut meal with good adsorption stability. This study provides a scientific basis for the application of *Lactobacillus paracasei* in the detoxification of aflatoxins in feed materials like peanut meal.

Key words: aflatoxin B₁; peanut meal; *Lactobacilli paracasei*; fermentation

花生粕是花生仁经压榨制油后的副产品，富含蛋白质，是我国蛋白原料的重要组成部分，全球每年产量约 800 万 t^[1]。花生粕营养价值较高，其代谢能居于粕类饲料首位，蛋白功能特性与大豆蛋白相近，但相较于大豆蛋白更容易吸收，而且肠胃胀气因子也很小。用作饲料，花生粕中含有幼龄动物生长发育必不可少的精氨酸，也是所有蛋白质饲料原料中含量最高的，可达 5.2%^[2]。但花生粕易受黄曲霉毒素污染，给人畜生命健康造成巨大的威胁。

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFT) 是曲霉属真菌如黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 等所产生的有害次生代谢产物，具有致畸、致癌、致突变性^[3,4]，黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是迄今发现毒性最强的一种真菌毒素，也是食品和饲料中常见的，严重威胁食品安全、饲料安全和人畜生命健康。奶牛摄入黄曲霉毒素，其采食量会显著减少，免疫力也会逐渐降低，导致产奶量下降，内脏器官受损，甚至可能诱发癌变，且黄曲霉毒素摄入时间越长，危害越大^[5]。同样，黄曲霉毒素会对家禽孵化率，生长速度和生产性能产生严重影响^[6]。因此，探寻安全有效的方法，减少食品及饲料中黄曲霉毒素污染，降低黄曲霉毒素对人类和畜禽健康造成的威胁刻不容缓。

近年来，利用微生物可以安全、有效地吸附或降解 AFB₁，已报道的微生物菌种包括枯草芽孢杆菌^[7]、铜绿假单胞菌^[8]、植物乳杆菌^[9]、鼠李糖杆菌^[10]、黑曲霉^[11]、米曲霉^[12]等。在这些微生物菌种中，乳酸菌作为益生菌，因其安全性和对人体的益生作用受到极大关注。Zhu 等^[13]通过香豆素培养基从发酵食品中筛选到了一株对黄曲霉毒素 B₁ 具有解

毒活性的植物乳杆菌。Zeng 等^[14]研究发现植物乳杆菌 BS22 对黄曲霉毒素 B₁ 有吸附脱毒作用。Dawlat 等^[15]发现传统发酵玉米食品中的优势乳酸菌能在体外结合伏马菌毒素 B₁ 和伏马菌毒素 B₂，且温度、pH 值和不同菌株都会影响结合效率。Hatab 等^[16]发现鼠李糖乳杆菌 6149 和双歧杆菌 6071 均对展青霉素有吸附去除作用。乳酸菌作为发酵食品中天然存在的微生物，是一种理想的真菌毒素脱毒菌株。本文通过以香豆素为唯一碳源的培养基初筛和液体发酵复筛，从传统酸菜中，筛选出具有脱除花生粕中 AFB₁ 的菌株，并研究了其脱毒减毒原理和菌株吸附稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

花生粕：购自中国山东济宁，粉碎，过 40 目筛。分离乳酸菌的样品来自贵州贵阳、广东潮州的传统酸菜。

1.1.2 试剂

香豆素 (≥98%)，阿拉丁试剂有限公司；AFB₁ 标准品，美国 Sigma 公司；胃蛋白酶，阿拉丁试剂有限公司；琼脂，德国 Biofroox 公司；二氯甲烷，西陇化工股份有限公司；MRS 肉汤、MRS 琼脂，海博生物技术有限公司；甲醇、乙腈 (均为色谱纯)，美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.3 培养基

香豆素初筛培养基：KNO₃ 0.5 g；KH₂PO₃

0.25 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g ; 香豆素 1.0 g ; 琼脂 20 g ; 水 1 000 mL ; 调节 pH 值为 7.5 ; 121 °C 灭菌 20 min。

MRS 琼脂培养基：用于乳酸菌的计数和分离培养，称取 MRS 琼脂 33.1 g，溶解于 500 mL 纯水中，121 °C 高温高压灭菌 20 min。

MRS 肉汤培养基：用于乳酸菌的增菌培养，称取 MRS 肉汤 26.12 g，溶解于 500 mL 纯水中，121 °C 灭菌高温高压 20 min。

1.2 仪器与设备

B6200 恒温培养箱、MAXQ2000 恒温摇床，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；BSC-1300 II A2 无菌操作台，苏州佳宝净化工程设备有限公司；SX-500 全自动灭菌锅，日本 Tony 公司；BS203 显微镜，重庆重光 COIC；L550 离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；LC-DCY-24SY 水浴氮吹浓缩仪，上海力辰邦西仪器科技有限公司；BSA224S 电子天平：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；SpectraMax M2e 酶标仪，美国 Molecular Devices 公司；Working K2025 液相色谱仪、K1160 全自动凯氏定氮仪，海能未来技术集团股份有限公司；LA8080 氨基酸自动分析仪，上海日立高新技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 初筛

1.3.1.1 富集

称取两种不同的酸菜样品各 5.00 g，分别加入 50 mL MRS 肉汤培养基，在 37 °C、200 r/min 下富集培养 24 h 至溶液变浑浊后，然后静置，收集上清液保存。

1.3.1.2 分离

静置后吸取 1 mL 上清液，稀释成不同浓度梯度的稀释液 (10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})。分别吸取每个梯度的稀释液 100 μL ，均匀涂布于 MRS 琼脂培养基上，置于 37 °C 恒温培养箱中培养 3 d (每种稀释液 3 个平行)，观察菌落在培养基上的生长情况。在培养基上选取不同颜色、大小、形态的单菌落转接到香豆素培养基上，置于 37 °C 恒温培养箱中培养一周，挑选出能够在香豆素初筛培养基上良好生长的菌株，编号并转接到 MRS 琼脂培养基上。

1.3.1.3 纯化

分别用无菌接种环挑取 MRS 琼脂培养基上长势较好的单菌落，在 MRS 琼脂培养基上连续划线培养 3 次，观察菌株的生长情况，将生长良好且稳定的菌株保存，用于下一步试验。

1.3.2 液体复筛

分别用无菌接种环蘸取上述 MRS 琼脂培养基上的单菌落，接种到 MRS 肉汤培养基中，在 37 °C、200 r/min 的培养箱中振荡培养 12 h 后，控制其浓度为 5×10^8 CFU/mL。在 970 μL 菌液中加入 30 μL 1 000 ng/mL AFB₁ 标准溶液，使发酵液中 AFB₁ 终质量浓度为 30 ng/mL，在 37 °C，200 r/min 恒温摇床富集培养 96 h，取上清液检测相应 AFB₁ 的含量。

1.3.3 不同菌株脱除花生粕中 AFB₁

称取 5.00 g 花生粕于 50 mL 离心管中，在 121 °C 下高温高压灭菌 20 min。向花生粕中加入 1 000 ng/mL AFB₁ 标准溶液 150 μL ，使发酵液中 AFB₁ 终浓度为 30 ng/g。用无菌接种环蘸取 MRS 琼脂培养基上的单菌落接入 MRS 肉汤培养基中，在 37 °C、200 r/min 的培养箱中振荡培养 12 h，调节其浓度为 5×10^8 CFU/mL。取 1 mL 发酵液加入灭菌花生粕中，加入 3 mL 无菌水，在 37 °C 下发酵 96 h。取样测定样品中 AFB₁ 的含量。

1.3.4 菌株鉴定

将对花生粕中 AFB₁ 脱除率最高的菌株送往擎科生物进行 16S rDNA 测序。利用 Blast 在美国国家信息技术中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 中对菌株的 16S rDNA 基因序列进行对比，同源性大于 98% 的菌株被认为属于同一物种。

1.3.5 生长曲线

筛选菌株接种于 50 mL MRS 肉汤培养基中，在 37 °C、200 r/min 的恒温培养箱中振荡培养，每隔 4 h 用酶标仪测定菌株发酵液 OD₆₀₀ 值，以空白 MRS 肉汤培养基作为对照。以培养时间为横坐标，发酵液 OD₆₀₀ 值为纵坐标，绘制菌株生长曲线。

1.3.6 降解与吸附作用的区分

将副干酪乳杆菌 YS-816 在 37 °C、200 r/min 的恒温培养箱中振荡培养 12 h，直到菌浓度达到 5×10^8 CFU/mL，得到副干酪乳杆菌 YS-816 发酵液。发酵液在 5 000 r/min、4 °C 下离心 10 min 后，上层

液体经无菌滤膜过滤,获得上清液;离心后的沉淀物用磷酸盐缓冲溶液(PBS, 50 mmol/L, pH 值为 7.4)洗涤三次,重新悬浮在 PBS 中以获得原始细胞浓度,得到菌悬液。将发酵液、上清液、菌悬液在 98 ± 1 °C 水浴 30 min,获得热处理发酵液、热处理上清液、热处理菌悬液。AFB₁ 以 30 ng/mL 的最终浓度分别添加到发酵液、上清液、菌悬液、热处理发酵液、热处理上清液、热处理菌悬液共 6 种处理组中。然后在 37 °C、200 r/min 的恒温培养箱中避光培养 96 h,所有试验在相同条件下重复三次。AFB₁ 的提取和检测见 1.3.9 节。

1.3.7 菌株脱毒稳定性研究

1.3.7.1 PBS 洗脱对副干酪乳杆菌 YS-816 吸附稳定性的影响

将副干酪乳杆菌 YS-816 经脱毒试验后,5 000 r/min 离心 10 min,将得到的沉淀物重悬于等体积的 PBS 溶液(pH 值为 7.4)中,在 37 °C、200 r/min 下振荡培养 1 h。5 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。重复上述步骤 5 次,分别收集上清液。使用 HPLC 测定 AFB₁ 的含量。菌株脱毒稳定性用公式(1)计算。

$$M = \left(1 - \frac{P_1}{P_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

M ——菌株保留吸附率, %;

P_1 ——累积上清液中的 AFB₁ 含量, ng/mL;

P_2 ——初始菌株吸附的 AFB₁ 含量, ng/mL。

1.3.7.2 模拟体外胃液消化对副干酪乳杆菌 YS-816 吸附稳定性的影响

将副干酪乳杆菌 YS-816 经脱毒试验后,离心得到沉淀物重新悬浮在模拟胃液中(模拟胃液: 16.4 mL 稀盐酸加入 800 mL 无菌水和 10 g 胃蛋白酶,混匀后用无菌水定容至 1 000 mL^[17], pH 值为 2.5)。然后将混合物放在 37 °C、200 r/min 的摇床上培养 6 h,每隔 1 h 收集上清液,用 HPLC 测定其中 AFB₁ 含量。菌株脱毒的稳定性按第 1.3.7 节中的公式(1)计算。

1.3.8 发酵前后花生粕质量评价

通过测定副干酪乳杆菌 YS-816 发酵前和发酵 96 h 后花生粕中的蛋白质含量和氨基酸含量,研究发酵处理对花生粕品质的影响。

1.3.8.1 蛋白质含量

根据国家标准 GB 5009.5-2016^[18],用凯氏定氮法测定花生粕中的蛋白质含量。首先,称取 0.20 g

花生粕样品(标记为 m),置于消化管中。向消化管中加入 8 mL 硫酸以及硫酸铜和硫酸钾的混合片剂,随后将消化管放入消化炉中,在 420 °C 下消化 2.5 h,直到消化液呈绿色透明状。空白试验和样品试验同时进行。冷却后,将液体放入 K1160 全自动凯氏定氮仪中检测。使用前加入氢氧化钠溶液、标准盐酸溶液和含混合指示剂的硼酸溶液。蛋白质含量利用公式(2)计算。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.0140 \times 5.46 \times 100}{m \times V_3 / 100} \quad (2)$$

式中:

X ——蛋白质含量, %;

V_1 ——处理组消耗的盐酸标准滴定液的体积, mL;

V_2 ——空白组消耗的盐酸标准滴定液的体积, mL;

V_3 ——消化液的体积, mL;

C ——盐酸标准滴定液的浓度, mol/L;

0.0140——盐酸标准滴定溶液相当于氮的质量, g;

m ——试样的质量, g;

5.46——花生粕中氮换算成蛋白质的系数;

100——换算系数。

1.3.8.2 氨基酸含量

根据国家标准 GB 5009.124-2016^[19],用茚三酮柱后衍生离子交换色谱法(IEC)测定花生粕中氨基酸含量。首先,称取 0.50 g 花生粕样品(标记为 m),放入水解管中,加入 15 mL 6 mol/L 的盐酸。将水解管抽至真空,充入氮气,重复此操作三次,然后在水解管充满氮条件下密封。将密封的水解管放置 (110 ± 1) °C 的烘箱中衍生 22 h。冷却后,将水解液过滤至 50 mL 容量瓶中,定容并充分摇匀后,用 0.22 μm 滤膜过滤。取 200 μL 滤液经冷冻干燥 5 h 后,加入 1 mL 0.02 mol/L 盐酸复溶。最后用氨基酸自动分析仪进行分析。

1.3.9 高效液相色谱法(HPLC)测定 AFB₁

1.3.9.1 液态发酵中 AFB₁ 的 HPLC 法测定

将液体发酵后的混合物在 5 000 r/min 下离心 10 min,去除沉淀,收集上清液并加入两倍体积的二氯甲烷,混合均匀,待分层后收集下层液体。重复操作 3 次,将收集的所有液体在水浴氮吹仪下吹至无液体后,用 1 mL 甲醇复溶,然后 0.22 μm 有机滤膜过滤。滤液中 AFB₁ 的含量采用高效液相色谱柱后光化学衍生法测定。

1.3.9.2 花生粕中 AFB₁ HPLC 法测定

称取 5.00 g 副干酪乳杆菌 YS-816 发酵后花

生粕于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 乙腈水溶液 ($V/V = 84:16$), 2 500 r/min 振荡 1 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液双层滤纸过滤备用。向 1 mL 滤液中加入 5 mL PBS 溶液混匀。混合液以自然流速过实验室自制免疫亲和柱, 最后用 1 mL 甲醇洗脱毒素至试管中, 滤液通过 0.22 μm 有机滤膜过滤。采用高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定滤液中 AFB₁ 的含量。

1.3.9.3 色谱条件

色谱条件如表 1 所示。

表 1 HPLC 色谱条件

Table 1 HPLC chromatographic conditions	
参数	AFB ₁
色谱柱	C18 柱 (150 mm 4.6 mm, 5 μm)
流动相	甲醇:水=4.5:5.5 (V/V)
流速	0.8 mL/min
进样量	10 μL
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
激发波长	360 nm
发射波长	440 nm

1.3.10 数据统计与分析

实验重复 3 次, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 用 Excel 2016, SPSS 27.0 进行数据处理, 通过 ANOVA 和 Duncan 检验分析显著差异 ($P < 0.05$), 利用 Origin 2018 进行作图分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株初筛结果

将通过 MRS 琼脂培养基分离的菌株, 转接到以香豆素为唯一碳源的培养基上, 进行初筛培养, 一周后发现, 培养基表面长有一些大小形态不一的菌落, 菌落较少且生长速度慢, 说明以与 AFB₁ 结构类似的香豆素作为唯一碳源的培养基, 具有筛选出脱毒减毒潜力菌株的功能, 金佳佳等^[20]也以香豆素为唯一碳源从豆类发酵食品、泥土、动物肠道及其内容物中初筛出 9 株具有黄曲霉毒素 B₁ 具有脱毒能力的菌株。

分别挑取长势较好的单菌落, 划线在 MRS 琼脂培养基上继续培养 3 d, 比较其菌落形态, 并对这些菌株进行编号。通过初步筛选, 得到了 4 株具有脱除黄曲霉毒素潜力的菌株, 其生长形态如图 1 所示。

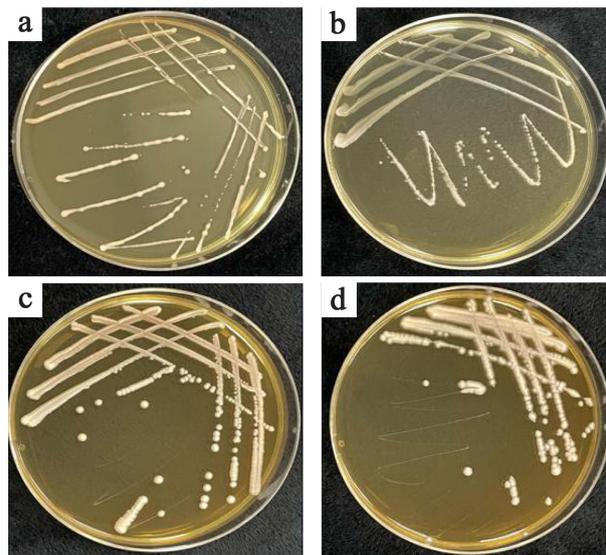


图 1 初筛出的 4 株菌的菌落形态

Fig.1 The morphology of four strains by primary screening

注: (a) YS-816; (b) YS-818; (c) YS-819; (d) YS-820。

2.2 液体复筛

为了进一步验证上述菌株对 AFB₁ 的脱除能力, 通过液体发酵试验, 评价了这 4 株初筛菌株脱除 AFB₁ 的能力, 结果如图 2 所示, 这 4 株菌都具有 AFB₁ 脱除能力, 当 AFB₁ 初始质量浓度为 30 ng/mL 时, 不同菌株对 AFB₁ 脱毒能力有差异, 其中菌株 YS-816 对 AFB₁ 脱除率最高, 可达 70.05%, 其它三株菌 YS-818、YS-819、YS-820 对 AFB₁ 的脱除率分别为 64.33%、29.50% 和 32.93%。因此, 将 YS-816、YS-818、YS-819、YS-820 这 4 株都作为候选菌株, 进行脱除花生粕中 AFB₁ 试验。

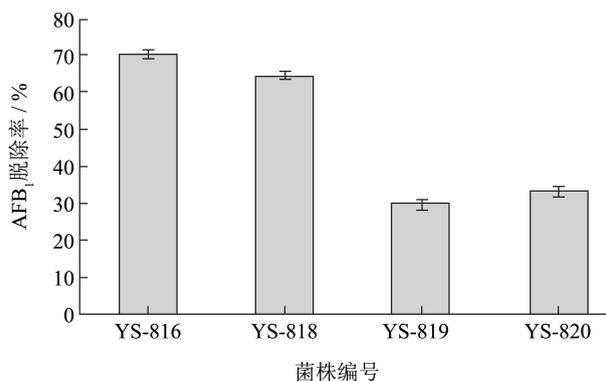


图 2 4 株初筛菌株对 AFB₁ 的脱除率

Fig.2 Detoxification of AFB₁ by four primary screening strains

2.3 复筛的 4 株菌株对花生粕中 AFB₁ 的脱除率
对液体发酵筛选的 4 株菌分别进行花生粕中

AFB₁ 发酵脱除试验, 测定发酵后的花生粕中 AFB₁ 含量, 比较 4 株菌株对花生粕中 AFB₁ 的脱除效果, 结果如表 2 所示, 采用菌株 YS-816 发酵花生粕后, 花生粕中 AFB₁ 含量最低, 为 13.68 ng/g, 对花生粕中 AFB₁ 脱除效果最明显, 脱除率达 54.08%, 高于其它菌株的脱除率。邱天宇等^[21]也发现黑曲霉 FS10 对花生粕中的黄曲霉毒素有一定的解毒效果。本试验中的 4 株菌都具有花生粕中黄曲霉毒素 B₁ 脱除能力, 但是不同的菌株其脱除率不同。

表 2 复筛的4株菌对花生粕中AFB₁的脱除率

Table 2 Detoxification of AFB₁ from peanut meal by four rescreened strains

菌株	AFB ₁ 残留量/(ng/g)	AFB ₁ 脱除率/%
YS-816	13.68 ± 0.19	54.08 ± 0.31
YS-818	19.08 ± 0.15	35.97 ± 0.49
YS-819	21.01 ± 0.40	29.50 ± 0.33
YS-820	19.99 ± 0.42	32.93 ± 0.42

2.4 菌种鉴定

将菌种鉴定的测序结果在 NCBI 数据库进行同源序列比对分析, 结果显示 YS-816 菌株与 *Lacticaseibacillus paracasei* (CP039707.1) 同源度为 100%, 该菌株被鉴定为副干酪乳杆菌属, 命名为副干酪乳杆菌 YS-816。

DNA 序列为 (5'→3')

ACCCTAATCATTTGTCCACCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAAGGGTTACGCCACCGGCTTCGGTGTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTCTTACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTTTGCCCGGAAGGGGAAACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAC

CTTGCGGTCGTA TCCCCAGGCGGAATGCTTAA TGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACC CTCCAACACCTAGCATTCATCGTTTACGGCATG GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCA TGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG ACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATA TCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCA CTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCC GATGCGCTTCCTCGGTTAAGCCGAGGGCTTTCA CATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTT ACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCT ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC CGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTACGCGCGAC AACAGTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACA ACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACT CACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCAT TGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG AGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCCG ATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCT TGTTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATAC GCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGC CATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGA TCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAATGTTAT CCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTAC TCACCCGTCCGCACTCGTTCCATGTTGAATCT CGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAACTCG TTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA

2.5 副干酪乳杆菌YS-816生长曲线

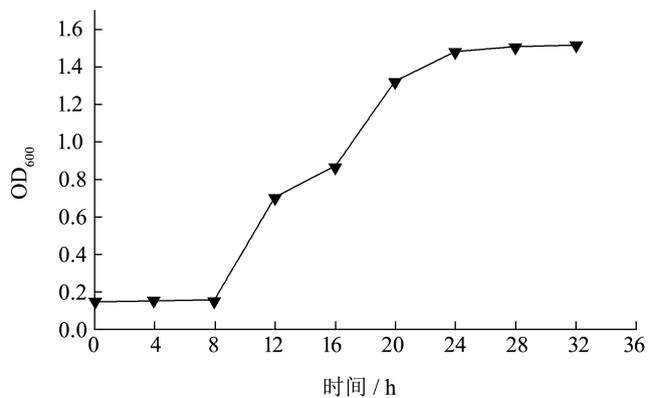


图 3 副干酪乳杆菌 YS-816 生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Lactobacillus paracasei* YS-816

对副干酪乳杆菌 YS-816 的生长情况进行了研究, 发现其在 MRS 肉汤培养基中 200 r/min、37 °C 下培养时, 其生长曲线如图 3 所示, 菌株在 0~8 h

内生长速度慢,处于生长延滞期。在8~24 h生长较为迅速,此段时间副干酪乳杆菌YS-816处于指数生长期,该阶段菌株的生长繁殖最快,菌体质量最好。24 h后,副干酪乳杆菌YS-816的数量已接近稳定,处于生长稳定期,然而在此阶段,培养基中的营养物质消耗量增大,细菌产生的有毒产物(H_2O_2 等)量增多。

2.6 副干酪乳杆菌YS-816脱毒减毒作用机制研究

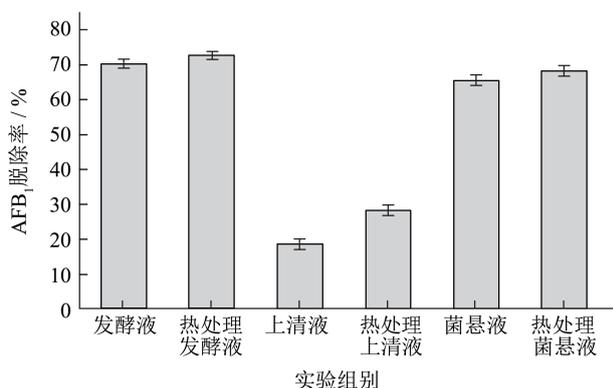


图4 菌株YS-816不同发酵组分对AFB₁的脱除率
Fig.4 YS-816 Detoxification rate of AFB₁ by different fermentation fractions

微生物脱除 AFB₁ 主要通过两种方式,一种是降解,即通过酶或蛋白等代谢产物降解 AFB₁,将其分解并转化成新的毒性较低或无毒的产物^[22]。另一种是吸附,主要通过菌株细胞壁吸附黄曲霉毒素,来降低黄曲霉毒素的危害^[23]。研究微生物菌株脱除 AFB₁ 机制的关键是明确菌株降解或吸附作用。

对副干酪乳杆菌YS-816发酵液中的不同组分进行 AFB₁ 脱除率测定。结果如图4所示,发酵液的不同组分都有 AFB₁ 脱除能力。菌悬液对 AFB₁ 的脱除率为 65.01%,上清液对 AFB₁ 的脱除率为 18.55%,菌悬液的脱除率显著高于上清液 ($P < 0.05$)。研究表明,菌悬液主要通过细胞壁吸附 AFB₁,而上清液主要通过酶或蛋白降解 AFB₁^[24],因此,副干酪乳杆菌YS-816菌悬液发挥主要脱毒减毒机制为吸附作用。进一步对各组分进行热处理发现,热处理后菌悬液对 AFB₁ 脱除率提高了 11.57%,这与前人的研究结果类似。Haskard等^[25]在探究热处理对菌株吸附 AFB₁ 影响的试验中发现,热处理可菌株对 AFB₁ 的吸附能力,这是因为热处理使得菌株细胞壁中蛋白质变性,从而使更

多的结合区域被暴露于 AFB₁;刘畅^[26]也发现菌株酿酒酵母Y1经100℃加热灭活后,对 AFB₁ 吸附率显著上升,通过扫描及透射电镜观察到加热后菌体表面凹凸不平,细胞壁厚度增加,说明菌体加热后由于接触面积增加,提高了对 AFB₁ 的吸附能力。上清液热处理后对 AFB₁ 的脱除率没有下降,反而有所上升,推测热处理没有使上清液中的酶失活反而激发了酶的部分活性。此类现象在其他微生物中也存在,被称为酶的热激活作用。Xu等^[27]从沙克氏芽孢杆菌的上清液中分离出一种可以降解 AFB₁、AFB₂ 和 AFM₁ 的酶,经热处理后,酶对 AFB₁ 的降解活性从 70.10% 提高到 76.70%。

2.7 吸附稳定性研究

2.7.1 PBS洗脱对副干酪乳杆菌YS-816和AFB₁复合物稳定性影响

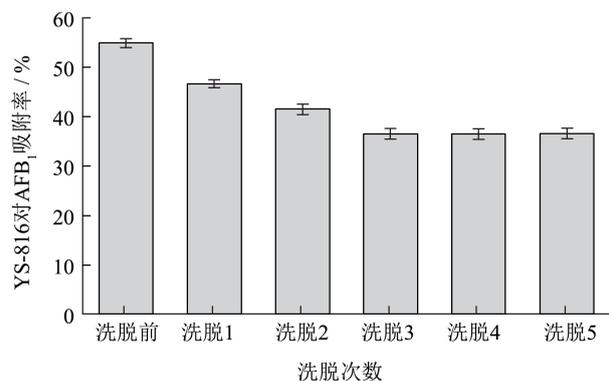


图5 PBS洗脱对菌株YS-816和AFB₁复合物稳定性的影响
Fig.5 Effect of PBS elution on the stability of AFB₁ adsorption by strain YS-816

用PBS反复洗涤副干酪乳杆菌YS-816和AFB₁复合物,检测洗脱液中 AFB₁ 释放量,评价副干酪乳杆菌YS-816对 AFB₁ 吸附能力稳定性。由图5可知,第1次洗脱结束,测得 AFB₁ 解吸量最大,由洗脱前吸附率 54.76% 降至 46.53%;洗脱3次后,副干酪乳杆菌YS-816对 AFB₁ 为 36.47%;从第4次洗脱开始,洗脱液中就检测不到 AFB₁,副干酪乳杆菌YS-816和 AFB₁ 复合物 AFB₁ 释放量趋于稳定,说明副干酪乳杆菌YS-816菌体与 AFB₁ 复合物稳定性较好。Bueno等^[28]研究了12种乳酸菌属吸附 AFB₁ 的能力,结果表明不同乳酸菌菌株的毒素去除率为 25%~61%,菌株和 AFB₁ 复合物用磷酸盐缓冲液和乙腈洗涤5次后,菌株对 AFB₁ 的吸附率仍保持在 10%~50%,这表明乳酸菌菌株与 AFB₁ 复合物均具有一定的稳定性。

2.7.2 体外模拟胃液消化对副干酪乳杆菌YS-816和AFB₁复合物稳定性影响

通过体外模拟胃液消化,研究动物消化过程对菌株和 AFB₁ 复合物稳定性的影响,评估复合物在动物食用后的安全性。由图 6 可知,副干酪乳杆菌 YS-816 和 AFB₁ 复合物在模拟体外胃液消化 1 h 时,副干酪乳杆菌 YS-816 和 AFB₁ 复合物解吸出 AFB₁ 最多,解吸率出 14.50%,随后 AFB₁ 释放量不断减小,消化 4~5 h, AFB₁ 释放量趋于稳定。此试验现象说明,胃液消化能使副干酪乳杆菌 YS-816 和 AFB₁ 复合物释放一定量的 AFB₁,但是大部分菌株 YS-816 和 AFB₁ 复合物仍保持吸附状态,胃液消化 5 h 后, AFB₁ 释放量趋于稳定,保留吸附率为 36.47%,占初始吸附率的 66.60%。因此,体外模拟胃液消化试验也证明,副干酪乳杆菌 YS-816 菌体吸附 AFB₁ 具有较好的稳定性。

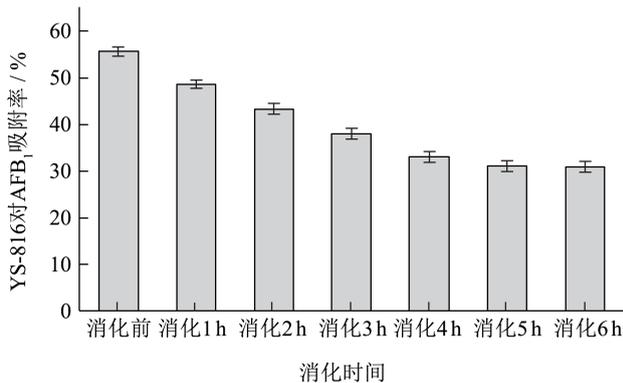


图 6 胃液消化对菌株 YS-816 和 AFB₁ 复合物稳定性的影响
Fig.6 Effect of gastric juice digestion on YS-816 and AFB₁ complex

2.8 副干酪乳杆菌YS-816发酵前后花生粕蛋白质和氨基酸分析

2.8.1 花生粕中蛋白质含量变化

采用凯氏定氮法测定发酵前后花生粕中蛋白质含量,结果见图 7 所示,发酵后花生粕中的蛋白质含量高于发酵前 ($P < 0.05$),增长了 1.73%。这是因为发酵过程中,微生物的呼吸作用会消耗有机物(释放出 CO₂ 和 H₂O),从而减少了产物总量,产生了蛋白的“浓缩效应”;还有部分增加的蛋白质可能是微生物蛋白^[29]。由此可见,副干酪乳杆菌 YS-816 发酵花生粕不仅能脱除黄曲霉毒素,还能够提高花生粕的蛋白含量,同时花生粕也能为副干酪乳杆菌 YS-816 生长提供良好的环境。

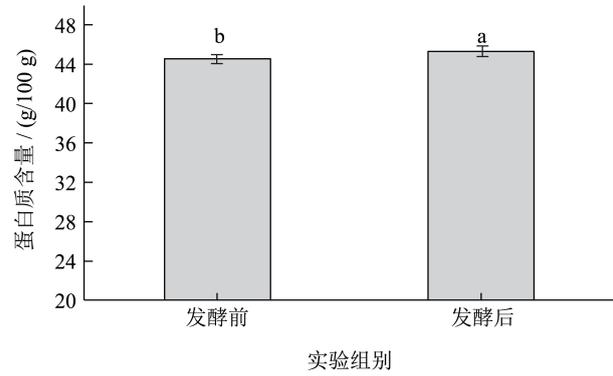


图 7 发酵前后花生粕中的蛋白质含量

Fig.7 The content of protein in peanut meal before and after fermentation

表 3 花生粕发酵前后氨基酸含量变化 (g/100 g)

Table 3 The content of amino acid in peanut meal before and after fermentation

氨基酸种类	发酵前	发酵后
天冬氨酸 (Asp)	5.09 ± 0.05	5.12 ± 0.09
苏氨酸 *(Thr)	1.11 ± 0.02	1.12 ± 0.02
丝氨酸 (Ser)	2.07 ± 0.07	2.06 ± 0.02
谷氨酸 (Glu)	8.60 ± 0.14	8.66 ± 0.13
甘氨酸 (Gly)	2.41 ± 0.02	2.45 ± 0.02
丙氨酸 (Ala)	1.69 ± 0.02	1.74 ± 0.02
半胱氨酸 (Cys-s)	0.54 ± 0.03	0.57 ± 0.02
缬氨酸 *(Val)	1.72 ± 0.01	1.76 ± 0.02
蛋氨酸 *(Met)	0.29 ± 0.04	0.34 ± 0.02
异亮氨酸 *(Ile)	1.44 ± 0.01	1.46 ± 0.03
亮氨酸 *(Leu)	2.85 ± 0.02	2.88 ± 0.05
酪氨酸 (Tyr)	1.41 ± 0.02	1.44 ± 0.04
苯丙氨酸 *(Phe)	2.20 ± 0.02	2.20 ± 0.04
赖氨酸 *(Lys)	1.42 ± 0.02	1.44 ± 0.01
组氨酸 (His)	0.90 ± 0.00	0.98 ± 0.02
精氨酸 (Arg)	4.93 ± 0.06	5.00 ± 0.08
脯氨酸 (Pro)	1.81 ± 0.02	1.84 ± 0.02
总氨基酸	40.46 ± 0.44	41.08 ± 0.64
总必需氨基酸	11.92 ± 0.06	12.18 ± 0.21

注: * 为必需氨基酸。

2.8.2 花生粕中氨基酸含量变化

副干酪乳杆菌 YS-816 发酵花生粕前后的氨基酸含量变化见表 3 所示,发酵后花生粕中总氨基酸含量较发酵前提高了 1.53%,其中总必需氨基酸含量提高了 2.18%。发酵花生粕后,必需氨基酸中的缬氨酸、蛋氨酸和赖氨酸含量分别提高了 2.30%、

17.24% 和 1.41%。刘睿杰等^[30]也发现巨大芽孢杆菌发酵花生粕后,花生粕中总氨基酸含量和总必需氨基酸含量都有一定程度的提高。因此,本试验结果表明,微生物发酵脱毒后饲料的营养价值有所提高。

3 结论

本研究从传统酸菜中,通过香豆素培养基初筛和液体发酵,筛选出4株微生物菌株,对比研究发现副干酪乳杆菌 YS-816 对 AFB₁ 脱除效果最好,对花生粕中 AFB₁ 脱除率为 54.08%。通过测定发酵液中的不同组分对 AFB₁ 的脱除率,发现副干酪乳杆菌 YS-816 主要通过菌体吸附作用来降低黄曲霉毒素含量。PBS 反复洗脱和体外模拟胃液消化试验表明,副干酪乳杆菌 YS-816 和 AFB₁ 形成的复合物稳定性较好。最后比较了发酵前后花生粕中蛋白质和氨基酸含量变化,结果表明发酵后花生粕中蛋白质和氨基酸含量分别提高了 1.73% 和 1.53%,饲料的营养价值有所提高。综上,本研究筛选的副干酪乳杆菌 YS-816 具有较好脱除花生粕中黄曲霉毒素性能,在农产品、饲料安全领域具有一定的应用前景,后续研究将继续通过驯化菌株,优化发酵工艺,提高菌株脱毒能力。

参考文献

- [1] CHEN Y J, FANG Q, ZHANG L, et al. Directional production of even carbon volatile fatty acids from peanut meal: effects of initial pH and hydraulic residence time [J]. Environmental Engineering Research, 2022, 27(4): 210190.
- [2] 朱立飞,曲春娟,唐月异,等.食用菌发酵花生粕降解黄曲霉毒素B₁研究[J].花生学报,2022,51(4):70-79.
- [3] KHAN R, GHAZALI F M, MAHYUDIN N A, et al. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: a review [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(8): 606.
- [4] DAI H R, LIANG S H, SHAN D D, et al. Efficient and simple simultaneous adsorption removal of multiple aflatoxins from various liquid foods [J]. Food Chemistry, 2022, 380(30): 132176.
- [5] RAUL B, JAVIER F G, SARA O, et al. The effects of aflatoxin B₁ intake in assaf dairy ewes on aflatoxin M₁ excretion, milk yield, haematology and biochemical profile [J]. Animals, 2023, 13 (3): 436.
- [6] FOUAD M A, RUAN D, EL-SENOUSEY K H, et al. Harmful effects and control strategies of aflatoxin B₁ produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: review [J]. Toxins, 2019, 11 (3): 176.
- [7] GUO Y, ZHANG Y, WEI C, et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* ANSB060 biodegradation product for the reduction of the milk aflatoxin M₁ content of dairy cows exposed to aflatoxin B₁ [J]. Toxins, 2019, 11(3): 161.
- [8] XU Y H, ZHAO R Y, LIU C X, et al. Degradation of aflatoxin B₁ in moldy maize by *Pseudomonas aeruginosa* and safety evaluation of the degradation products [J]. Foods, 2023, 12(6): 1217.
- [9] ZAMANI N, FAZILI M R, SEPAHI A A, et al. A new probiotic *Lactobacillus plantarum* strain isolated from traditional dairy together with nanochitosan particles shows the synergistic effect on aflatoxin B₁ detoxification [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(10): 624.
- [10] WACOO A P, MUKISA I M, MEEME R, et al. Probiotic enrichment and reduction of aflatoxins in a traditional African maize-based fermented food [J]. Nutrients, 2019, 11(2): 265.
- [11] FANG Q A, DU M R, CHEN J W, et al. Degradation and detoxification of aflatoxin B₁ by tea-derived *Aspergillus niger* RAF106 [J]. Toxins, 2020, 12(12): 777.
- [12] JUN S C, KIM Y K, HAN K H. Characterization of nonaflatoxigenic; *Aspergillus flavus/oryzae*; Strains isolated from Korean traditional soybean meju [J]. Mycobiology, 2022, 50(6): 408-419.
- [13] ZHU Y L, XU Y N, YANG Q L. Antifungal properties and AFB₁ detoxification activity of a new strain of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 414: 125569.
- [14] ZENG Y, ZENG D, ZANG Y, et al. *Lactobacillus plantarum* BS22 promotes gut microbial homeostasis in broiler chickens exposed to aflatoxin B₁ [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102(1): e449-e459.
- [15] DAWLAL P, BRABET C, THANTSHA M S, et al. Potential of lactic acid bacteria for the reduction of fumonisin exposure in African fermented maize based foods [J]. World Mycotoxin Journal, 2017, 10(4): 309-318.
- [16] HATAB S, YUE T L, MOHAMAD O. Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(4): 238-241.
- [17] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [18] GB5009.5-2016,食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].
- [19] GB5009.124-2016,食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S].
- [20] 金佳佳,吴思敏,郑思珩,等.黄曲霉毒素B₁降解菌株的筛选及鉴定[J].中国酿造,2019,38(7):122-125.
- [21] 邱天宇,王海鸣,朱瑜,等.响应面优化黑曲霉生物发酵花生粕脱除黄曲霉毒素研究[J].农产品加工,2020,20:1-7.
- [22] GUAN Y, CHEN J, NEPOVIMOVA E, et al. Aflatoxin

- detoxification using microorganisms and enzymes [J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 46.
- [23] ISMAIL A, GONCALVES L B, NEEFF D V D, et al. Aflatoxin in foodstuffs: occurrence and recent advances in decontamination [J]. *Food Research International*, 2018, 113: 74-85.
- [24] KIM S, LEE H, LEE S, et al. Invited review: microbe-mediated aflatoxin decontamination of dairy products and feeds [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(2): 871-880.
- [25] HASKARD C A, EI-NEZAMI H S, KANKAANPAA P E, et al. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3086-3091.
- [26] 刘畅. 益生菌对黄曲霉毒素B₁吸附作用的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [27] XU L, AHMED M F E, SANGARE L, et al. Novel aflatoxin-degrading enzyme from *Bacillus shackletonii* L7 [J]. *Toxins*, 2017, 9(1): 36.
- [28] BUENO D J, CASALE C H, PIZZOLITTO R P, et al. Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model [J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(9): 2148-2154.
- [29] 怀宝东, 闫凤超, 李佩然, 等. 马铃薯薯渣固态发酵生产菌体蛋白饲料的工艺研究 [J]. *中国饲料*, 2020, 21: 113-120.
- [30] 刘睿杰, 孙丰芹, 常明, 等. 巨大芽孢杆菌固态发酵法去除黄曲霉毒素B₁工艺对花生粕品质的影响 [J]. *中国油脂*, 2012, 37(12): 18-21.