

淡豆豉炮制过程中拮抗菌对黄曲霉毒素 B₁ 的拮抗能力考察

李春玲¹, 贺 婧^{2#}, 王立元¹, 赵绵江¹, 李翠英¹, 翁美芝¹, 周立分^{1*}, 周 鸿^{3*}, 谢小梅^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 南昌大学转化医学研究院, 江西 南昌 330031

3. 江西省疾病预防控制中心, 江西 南昌 330029

摘要:目的 考察从淡豆豉炮制过程中分离鉴定的枯草芽孢杆菌、鲑色锁掷酵母菌、黑曲霉菌、屎肠球菌、鸟肠球菌 5 株菌对产毒黄曲霉菌的拮抗能力, 为探讨淡豆豉炮制过程中黄曲霉毒素的消长机制奠定基础。方法 通过平板对峙法与交叉法检测 5 株菌及其代谢产物对产毒黄曲霉菌生长的影响; 使用液质联用技术 (liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS) 考察 5 株菌对黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 的降解效果。结果 AFB₁ 在 10~200 ng/mL 线性关系良好, r 为 0.999, 低、中、高质量浓度的加样回收率为 92.4%~97.2%, RSD 为 1.48%~2.35% ($n=3$)。其中鲑色锁掷酵母菌降解 AFB₁ 效果最好, 达 43.65%, 对产毒黄曲霉菌生长抑制作用最强的是鲑色锁掷酵母菌, 达 64.29%, 发酵上清液对产毒黄曲霉菌生长抑制作用最强的是屎肠球菌, 为 29.63%。结论 淡豆豉炮制过程中存在多种 AFB₁ 拮抗微生物。

关键词: 淡豆豉; 炮制; 黄曲霉毒素 B₁; 液质联用技术; 拮抗菌; 拮抗能力; 枯草芽孢杆菌; 鲑色锁掷酵母菌; 黑曲霉菌; 屎肠球菌; 鸟肠球菌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3544-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.010

Antagonistic ability of aflatoxin B₁ antagonistic microorganism in processing of *Sojae Semen Praeparatum*

LI Chun-ling¹, HE Jing², WANG Li-yuan¹, ZHAO Mian-jiang¹, LI Cui-ying¹, WENG Mei-zhi¹, ZHOU Li-fen¹, ZHOU Hong³, XIE Xiao-mei¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, China

3. Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330029, China

Abstract: Objective To investigate the antagonistic ability of *Bacillus subtilis*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Aspergillus niger*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus avium* isolated from the processing of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP) to *Aspergillus flavus* producing aflatoxin B₁ (AFB₁), so as to lay a foundation for exploring the growth and decline mechanism of aflatoxin in the processing of SSP. **Methods** The effects of five strains and their metabolites on the growth of aflatoxin producing *A. flavus* were detected by plate confrontation method and cross method, and the degradation rate of AFB₁ by five strains was researched by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Results** The linear correlation coefficient of aflatoxin B₁ (AFB₁) was > 0.999 in the range of 10—200 ng/mL. The recoveries of low, medium and high concentrations were 92.4%—97.2%, and RSD were 1.48%—2.35% ($n=3$). Among the five strains, *S. salmonicolor* had the best degradation effect on AFB₁, up to 43.65%, *S. salmonicolor* had the strongest inhibition effect on the growth of *A. flavus*, up to 64.29% and the fermentation supernatant of *E. faecium* had the

收稿日期: 2021-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060709); 国家自然科学基金项目 (81660664); 江西省卫健委科技计划项目 (20203771); 江西省重点研发计划一般项目 (20192BBGL70051); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ190634)

作者简介: 李春玲 (1994—), 女, 硕士研究生, 从事中药学研究。Tel: 19970044053 E-mail: 2084073573@qq.com

***通信作者:** 周 鸿, 主任医师, 主要从事营养与食品检验工作。Tel: (0791)88170961 E-mail: jxcdcwjs@sina.com

周立分, 讲师, 主要从事中药化学研究。Tel: (0791)87119393 E-mail: 645594841@qq.com

谢小梅, 教授, 研究生导师, 主要从事微生物学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

#并列第一作者: 贺 婧 (1990—), 女, 讲师, 主要从事微生物学研究。Tel: 15972204520 E-mail: 876401812@qq.com

strongest inhibition effect on the growth of *A. flavus*, up to 29.63%. **Conclusion** There are various microorganisms that inhibit the growth of AFT producing strains and the degradation of AFB₁ in the fermentation processing of SSP.

Key words: *Sojae Semen Praeparatum*; processing; aflatoxin B₁; LC-MS; antagonistic microorganism; antagonistic ability; *Bacillus subtilis*; *Sporidiobolus salmonicolor*; *Aspergillus niger*; *Enterococcus avium*; *Enterococcus faecium*

淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* 别名香豉(《伤寒论》), 为大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子(黑大豆)与桑叶、青蒿经发酵加工而成。其性味苦、辛、凉, 归肺、胃经, 具有解表、除烦、宣发郁热之功效, 用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等, 被历代本草和历版《中国药典》收录, 列入卫生部首批药食两用名单, 在心血管疾病、糖尿病、骨质疏松、乳腺癌及女性更年期综合征、抑郁症等重大疾病的预防和控制中有广阔应用前景^[1-2]。

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)主要由黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉菌 *A. parasiticus* 产生的一类化学结构类似的次级代谢产物, 在中药材、豆类、花生、玉米以及奶制品、植物油等产品中广泛存在^[3]。AFT 致癌、致畸和致突变性极强, 是至今发现的最强致癌真菌毒素化合物。它们降低体内胰腺消化酶活性, 影响免疫力, 损伤动物肝脏、中枢神经功能等, 引起一系列疾病, 如贫血、肠胃疾病、生长性能障碍、生殖障碍等^[4-7]。其中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 毒性最强, 已被国际癌症机构定义为 I 类致癌物^[8-9]。食入被 AFT (尤其是 AFB₁) 污染的中药材, 不仅达不到防病治病的效果, 反而会使 AFT 在人体内积累中毒, 危及健康甚至生命, 给中药的临床应用带来严重安全隐患。

淡豆豉在炮制过程中受原料、加工器具、温度、湿度等外界环境的影响, 极易污染 AFT, 然而迄今关于淡豆豉炮制中 AFT 的研究极少。本实验室前期已发现淡豆豉炮制过程中存在黄曲霉、溜曲霉等可能产 AFT 的产毒菌^[10], 同时也分离到如枯草芽孢杆菌、乳酸菌、黑曲霉菌等已报道能抑制 AFT 产生的有益菌(简称拮抗菌)^[11-13], 并发现淡豆豉炮制过程中不同时间点样本的 AFT 含量、产毒菌的数量和产毒能力存在动态变化。

基于此, 本实验应用 LC-MS 技术检测 AFB₁, 研究从淡豆豉炮制过程中分离的枯草芽孢杆菌、鲑色锁掷酵母菌、黑曲霉菌、屎肠球菌、鸟肠球菌及其代谢产物对产毒黄曲霉菌生长的影响, 以及它们对 AFB₁ 的降解能力, 为探讨淡豆豉炮制过程中 AFT 消长机制奠定基础, 并将筛选到的 AFB₁ 拮抗菌应用于淡豆豉炮制中, 对降低淡豆豉成品的 AFB₁

污染有重要意义。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 产毒黄曲霉菌(CGMCC3.4408)购于中国普通微生物菌种保藏中心。鲑色锁掷酵母菌 *Saccharomyces salmonicolor* (EJ1)、屎肠球菌 *Enterococcus faecium* (BR5)、鸟肠球菌 *Enterococcus avium* (9R2)、黑曲霉 *Aspergillus niger* (JC2) 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (JX2) 均为本实验室从淡豆豉炮制过程中筛选鉴定并保存, 由江西中医药大学谢小梅教授和王立元副教授鉴定。

1.1.2 培养基 PDA 培养基、曲霉素琼脂培养基、脑心浸液肉汤培养基, 批号 20191113、20191026、20201017, 青岛高科技海博生物技术有限公司。

细菌种子培养基: 葡萄糖 50 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, KH₂PO₄ 1 g, Fe₂SO₄·7H₂O 0.01 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0。

细菌发酵培养基: 葡萄糖 23.5 g, 蛋白胨 10 g, 乙酸铵 8.5 g, KH₂PO₄ 4.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 加水 1000 mL, pH 6.0。

真菌发酵培养基: 葡萄糖 30 g, NaNO₃ 3 g, 酵母提取物 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, L-谷氨酸钠 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0。以上培养基均在 121 °C 下湿热灭菌 20 min。

1.1.3 试剂 AFB₁ 对照品, 批号 A832707-1mg, 质量分数≥98%, 麦克林有限公司; 甲醇、乙腈, 批号 2003191、20022221, 体积分数≥99.9%, 罗恩公司; 甲酸, 批号 C11265520, 体积分数≥99.9%, 阿拉丁生化科技有限公司。

1.2 仪器

MJ-150I 霉菌培养箱、DHP-9082 细菌培养箱, 上海一恒科技有限公司; AB Triple Quad 4500 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; Milli-Q Advantage A10 超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

2 方法与结果

2.1 LC-MS 检测降解 AFB₁ 研究

2.1.1 色谱条件 Hypersil Gold (100 mm×2.1

mm, 3 μ m); 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈; 梯度洗脱: 0~1 min, 35%乙腈; 1~2.5 min, 35%~50%乙腈; 2.5~3 min, 50%~80%乙腈; 3~3.1 min, 80%~35%乙腈; 3.1~5 min, 35%乙腈; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正离子模式; 离子喷射电压 (ion spray voltage, IS) 4.5 kV; 离子源温度 (ion source temperature, TEM) 500 $^{\circ}$ C; 雾化气 (nebulizer gas, GS1) 压力 310.264 kPa (45 psi), 加热气 (heater gas, GS2) 压力 344.738 kPa (50 psi), 气帘气体 (curtain gas, N₂), 压力 241.316 kPa (35 psi)。扫描方式为多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。碰撞电压 150 V, 去簇电压 32 V, 母离子 m/z 313.0, 子离子 m/z 285.4、254.0; 保留时间 5 min。

2.1.3 对照品溶液的制备 准确称取 0.1 mg AFB₁ 对照品于 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得 2 μ g/mL 的 AFB₁ 对照品储备液。

2.1.4 供试品溶液的制备 将斜面保存的 5 株待测菌分别接种于相应培养基上活化 (细菌、真菌分别接种于脑心浸液肉汤、PDA 液体培养基), 挑取一环接种于 25 mL 种子培养液中, 细菌经 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 吸取 1 mL 种子液接种于 25 mL 细菌发酵培养液中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 d。真菌接种于 25 mL 真菌发酵培养液中, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d。避光条件下, 吸取 980 μ L 各发酵菌液加 20 μ L 100 μ g/mL 的 AFB₁ 对照品, 使各发酵菌液中 AFB₁ 终质量浓度为 2 μ g/mL, 以只加 20 μ L 100 μ g/mL 的 AFB₁ 对照品不接种菌的发酵培养液作对照, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 72 h。

分别取上述孵育 72 h 的各发酵液 1 mL, 用氮气吹至近干, 加 1 mL 甲醇复溶, 11 269.44 $\times$ g 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 滤膜滤过后用 LC-MS 检测。

2.1.5 线性关系考察 精确吸取 0.005、0.010、0.025、0.040、0.050、0.075、0.100 mL 的 AFB₁ 对照品储存液于 1 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 使之成 10、20、50、80、100、150、200 ng/mL 的系列对照品溶液, 混匀, 上机测定。AFB₁ 标准曲线为 $Y=23\,904\,X+135\,965$, $r^2=0.999\,3$, 质量浓度在 10~200 ng/mL 呈良好线性关系。

2.1.6 精密度考察 配制 AFB₁ 质量浓度为 100 ng/mL 的对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 按峰面

积计算, RSD 为 0.62%

2.1.7 稳定性考察 取无菌发酵液, 精密加 AFB₁ 对照品溶液, 使之最终质量浓度为 100 ng/mL。按“2.1.4”项供试品溶液的制备步骤操作, 分别测定 0、4、8、12、16、20、24 h 时的 AFB₁ 含量, 以峰面积来计算, RSD 为 1.01%。

2.1.8 重复性考察 平行取无菌发酵液 6 份, 精密加 AFB₁ 对照品溶液, 使之终质量浓度为 100 ng/mL。按“2.1.4”项供试品溶液制备步骤操作, 按“2.1.1”项色谱条件, 分别进样 2 μ L 进行测定, 以 AFB₁ 含量来计算, RSD 为 1.50%。

2.1.9 加样回收率考察 平行取无菌发酵液 9 份, 分别精密加入低、中、高质量浓度的对照品溶液, 每个浓度 3 份, 使发酵液中 AFB₁ 终浓度分别为 50、100、200 ng/mL, 按“2.1.4”项供试品溶液制备步骤操作, 制备供试品溶液, 进样分析, 检测含量。用甲醇制备相应质量浓度的对照品溶液, 进样分析, 检测含量。计算加样回收率。以发酵液为基质, 测得低、中、高 3 个质量浓度水平时 AFB₁ 的平均回收率分别为 92.40%、94.32%、97.20%, RSD 分别为 2.35%、1.48%、1.85% ($n=3$)。

2.2 5 株待测菌对 AFB₁ 的降解作用

具体操作方法见“2.1.4”项。结果显示, 5 株菌发酵菌液均对 AFB₁ 有一定的降解作用, 其中鲑色锁掷酵母菌对 AFB₁ 的降解作用最强, 达 43.65%, 黑曲霉菌的降解作用最弱。各菌株发酵液中 AFB₁ 的液质联用色谱图如图 1 所示, 降解率见表 1。

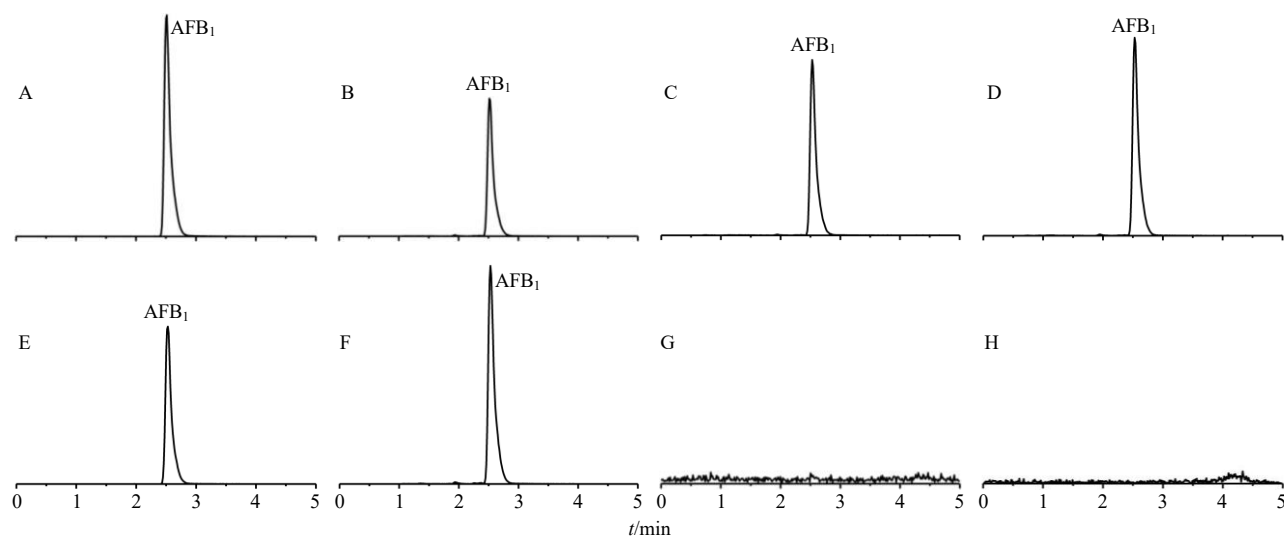
$$\text{AFB}_1 \text{ 降解率} = (\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量} - \text{试验组 AFB}_1 \text{ 含量}) / \text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量}$$

2.3 5 株待测菌对产毒黄曲霉生长的影响

2.3.1 产毒黄曲霉标准株 (CGMCC3.4408) 的孢子悬浮液制备 将产毒黄曲霉菌标准株接种于 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 加入适量无菌生理盐水洗脱黄曲霉孢子, 无菌纱布滤过以滤除菌丝, 血球计数板将黄曲霉孢子悬浮液调整为 1×10^5 cfu/mL, 备用。

2.3.2 待测菌的培养

(1) 待测菌种子液的制备: 挑取经活化培养的待测菌, 接种于 20 mL 种子培养液中, 细菌 37 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 真菌 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 72 h。将上述种子液梯度稀释, 选择合适的 3 个稀释梯度, 用移液枪吸取 100 μ L 稀释液分别注入相应的选择性培养基平板涂布均匀。细菌置 37 $^{\circ}$ C 培养 1 d, 真



A-无菌发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 B-鲑色锁掷酵母菌发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 C-枯草芽孢杆菌发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 D-屎肠球菌发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 E-鸟肠球菌发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 F-黑曲霉发酵液加入 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ 对照品样本 G-空白发酵液 H-溶剂
A-sterile fermentation broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample B-*Saccharomyces salmoniae* fermentation broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample C-*Bacillus subtilis* broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample D-*Enterococcus faecium* broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample E-*Enterococcus avium* broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample F-*Aspergillus niger* broth added with $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AFB₁ standard sample G-blank fermentation broth H-solvent

图 1 液质联用色谱图

Fig. 1 LC-MS chromatograms

表 1 5 株菌的种子培养液和发酵上清液对黄曲霉生长的抑制效果及对 AFB₁ 的降解作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Growth inhibition of *A. flavus* and degradation of AFB₁ by five strains ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株	AFB ₁ 降解率/%	种子培养液抑菌率/%	发酵上清液抑菌率/%
鸟肠球菌	17.53 ± 0.39	32.14 ± 1.79	16.67 ± 1.04
屎肠球菌	34.02 ± 0.87	32.14 ± 1.79	29.63 ± 1.56
枯草芽孢杆菌	27.49 ± 0.66	33.93 ± 2.28	24.07 ± 1.04
鲑色锁掷酵母菌	43.65 ± 0.98	64.29 ± 3.57	24.07 ± 1.88
黑曲霉菌	7.22 ± 0.20	32.14 ± 1.55	25.93 ± 0.52
黄曲霉菌标准株	3.21 ± 0.11	—	—

菌置 28°C 培养 3~5 d, 分别对细菌、真菌进行计数, 调整至 1×10^7 cfu/mL 的稀释液作为种子液, 备用。

(2) 待测菌发酵液的制备: 吸取 $1 \text{ mL } 1 \times 10^7$ cfu/mL 的种子液接种于 25 mL 细菌/真菌相应发酵培养基中, 细菌于 37°C 培养 72 h, 真菌于 28°C 、 120 r/min 培养 96 h。

2.3.3 5 株待测菌对产毒黄曲霉生长的影响

(1) 平板对峙法检测待测菌对产毒黄曲霉生长的影响: 将 1×10^5 cfu/mL 的标准株黄曲霉孢子液 $10 \mu\text{L}$ 接种于培养基中央, 用十字交叉法接种 $20 \mu\text{L } 1 \times 10^7$ cfu/mL 各待测菌种子液于等距的 4 端。以仅接种 10^5 cfu/mL 的黄曲霉标准株孢子于培养基中央

作为对照组, 分别置 28°C 霉菌培养箱培养 5 d, 量取并记录黄曲霉标准株菌落直径, 计算抑菌率, 每组 3 个平行。

抑菌率 = (对照组黄曲霉菌落直径 - 实验组黄曲霉菌落直径) / 对照组黄曲霉菌落直径

各组黄曲霉菌生长状况如图 2 所示。结果 (表 1) 显示, 5 株菌种子培养液对产毒黄曲霉生长均有一定的抑制作用, 其中鲑色锁掷酵母菌对黄曲霉生长的抑制作用最强, 抑菌率达 64.29%, 屎肠球菌、鸟肠球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉对黄曲霉生长的抑制率均在 30% 左右。

(2) 待测菌发酵上清液对产毒黄曲霉菌生长的影响: 取各待测菌株发酵液 10 mL , $11269.44 \times g$ 离

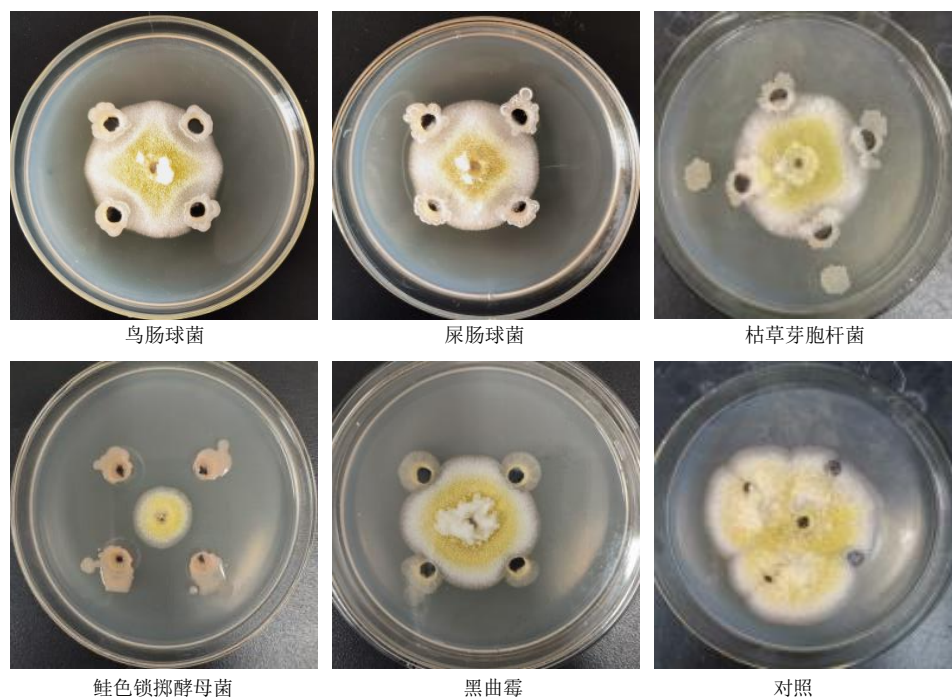


图 2 平板对峙培养法检测各菌对产毒黄曲霉菌生长的影响

Fig. 2 Growth of *A. flavus* detected by plate confrontation culture

心 5 min, 取上清液, 0.22 μm 无菌滤膜滤过除菌。吸取 8 mL 滤过除菌的上清液加入 90 mm 的培养皿中, 倾注 20 mL PDA 培养基与之混匀, 在平皿中央接种 20 μL 1×10^5 cfu/mL 的黄曲霉标准株孢子液, 以平皿中央仅接种 1×10^5 cfu/mL 黄曲霉标准株孢子液作对照。分别置 28 $^{\circ}\text{C}$ 霉菌培养箱培养 5 d, 记

录菌落直径, 计算抑菌率, 每组 3 个平行。

抑菌率 = (对照组黄曲霉菌落直径 - 实验组黄曲霉菌落直径) / 对照组黄曲霉菌落直径

各组黄曲霉菌的生长状况如图 3 所示。结果(表 1) 显示, 5 株待测菌发酵上清液对产毒黄曲霉生长均有一定的抑制作用, 其中屎肠球菌的抑制作用最

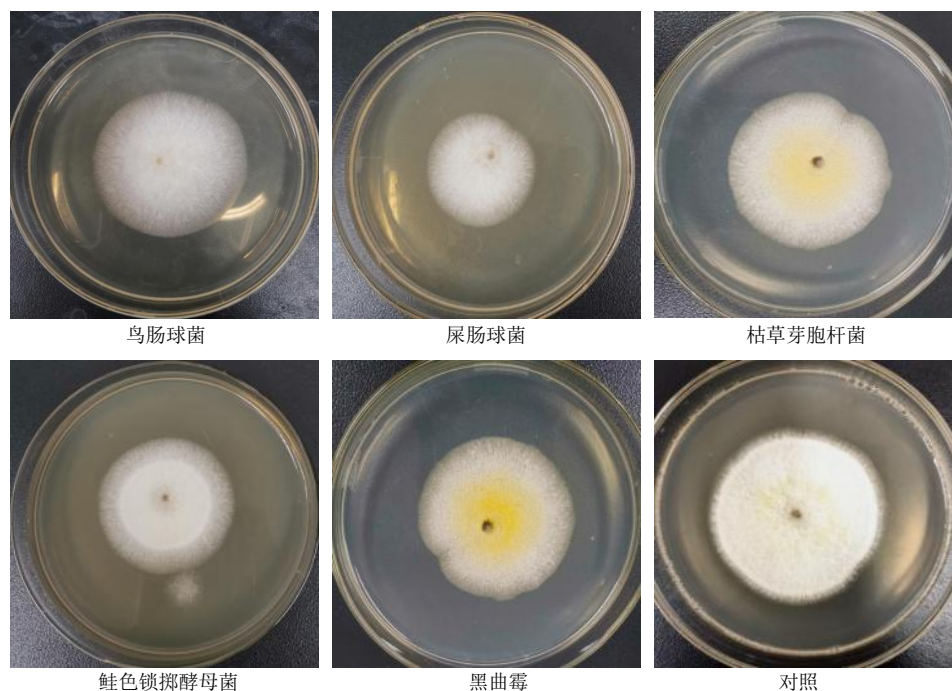


图 3 各菌株发酵上清液对产毒黄曲霉生长的影响

Fig. 3 Effect of fermentation supernatant of different strains on growth of *A. flavus*

强,抑制率为 29.63%。

综上,5 株菌的发酵上清液对产毒黄曲霉菌的生长均有一定的抑制作用,表明 5 株菌均可产生抑制产毒黄曲霉生长的代谢物质,如蛋白酶、有机酸等;5 株菌的种子培养液抑菌率均强于发酵上清液的抑菌率,表明这 5 株菌通过空间性、营养性竞争来抑制产毒黄曲霉生长的效果强于其代谢产物的抑制效果;鲑色锁掷酵母菌的种子培养液抑菌率和 AFB₁ 降解率均强于其他 4 株菌,而其发酵上清液抑制率与其他 4 株菌差别不大,表明在淡豆豉炮制过程中,鲑色锁掷酵母菌在抑制产毒黄曲霉生长繁殖和降解 AFB₁ 方面发挥了较大的作用。

3 讨论

空气、水、土壤等自然环境中可能存在大量产 AFT 的微生物,因此中药材很容易受到产 AFT 菌的污染而产生 AFT。解决中药材安全问题必须严格控制中药材 AFT 污染。本实验建立了 LC-MS 测定发酵液中 AFB₁ 的方法。该方法具有快速、准确、灵敏等特点,有助于提高分析效率,降低成本,为测定发酵液中 AFB₁ 含量提供参考。

目前,中药材中黄曲霉毒素污染的防治措施主要分为 2 种:预防和降解。预防措施主要在生产过程中减少产 AFT 菌的污染和储藏条件控制等。降解方法主要有 3 种:物理、化学和生物方法。物理方法如辐射法等,降解效果较好,但可能存在使被辐射的产品过氧化值增加,因穿透力差而未能彻底去除,甚至触发存活的产毒菌株产生黄曲霉毒素 B₁ 等问题^[14-15],化学方法如碱处理法降解作用比较强,但成本高,污染大^[16]。而使用生物脱毒法更天然、绿色、安全和经济^[17]。

近年来,国内外已对降解 AFB₁ 和抑制产 AFT 菌生长的微生物进行了大量研究。研究发现,一些微生物,如乳酸菌、酵母菌和芽孢杆菌,可抑制曲霉菌的生长及其产毒,在控制 AFT 污染方面有着巨大的应用价值。Osouli 等^[18]研究了枯草芽孢杆菌 M419 无细胞上清液对黄曲霉的抑制率为 57%。张秀江等^[19]研究发现,质量浓度为 0.25 mg/mL 的酵母霉菌毒素降解剂对 AFB₁ 的脱毒效率最好,为 98.21%。吉小凤等^[20]研究发现从肉鸡肠道粪便中筛选到的发酵乳杆菌 LAB-10 对 14 μg/L AFB₁ 在 48 h 的降解率为 63.4%。

本研究表明从淡豆豉炮制过程中分离的 5 株菌对产 AFT 的黄曲霉生长繁殖均有一定的抑制作用,

同时对 AFB₁ 的降解也有一定的效果。屎肠球菌、鸟肠球菌和枯草芽孢杆菌对产毒黄曲霉菌的抑制率均达 30%以上,这 3 种菌同时是淡豆豉炮制过程中的优势菌,在抑制产毒黄曲霉菌生长繁殖的同时,还可以促进 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)的产生^[21]。5 株菌中鲑色锁掷酵母菌对产毒菌生长的抑制作用和降解 AFB₁ 的效果最好,抑制率和降解率分别为 64.29%、43.65%。

本课题组前期研究发现鲑色锁掷酵母菌在整个淡豆豉炮制过程中始终存在,并且呈先上升后下降的趋势,在再闷第 3 天达到最大值。文献报道鲑色锁掷酵母菌由于可产生多种具有芳香气味的酯类化合物,其在培养过程中会发出类似于天然水果发出的香味^[22-23]。因此淡豆豉炮制过程中鲑色锁掷酵母菌的存在,使炮制出来的淡豆豉具有黄曲霉毒素含量少甚至无毒并且香味浓郁以及 GABA 产量高等特点。

微生物降解 AFT 的主要机制是通过吸附作用或酶促反应降解毒素或者修饰毒素分子而达到脱毒的目的。吸附作用主要是通过微生物与产毒菌结合成较稳定的无毒复合物而排出体外,而酶促作用是通过微生物分泌的酶破坏 AFT 的毒性结构位点双呋喃环末端双键、内酯环和环戊烯酮环,产生无毒的降解产物^[24-27]。严家俊^[28]对一株枯草芽孢杆菌降解 AFB₁ 作用机制的研究发现,菌株培养液中上清液对 AFB₁ 的降解率达到 82.6%,对培养液上清液进行热处理及蛋白酶 K 处理后,发现处理后的上清液对 AFB₁ 的降解能力大大降低,推测出现这种情况是菌株降解 AFB₁ 的活性物质经热处理和蛋白酶 K 处理后,酶活性被降低,说明该菌株对 AFB₁ 的降解过程为菌株胞外酶的酶促反应。

一些食用豆酱类食品中含有 AFT 拮抗微生物,这些微生物可以通过吸附、降解等作用使食品中的 AFT 减少。Huang 等^[29]研究发现发酵食品豆腐中存在一种益生菌-植物乳杆菌,它可以与 AFB₁ 结合成一种稳定的复合物而排出体外,从而减轻 AFB₁ 对小鼠的毒性。张盼等^[30]从食用纳豆中筛选出一株高效降解 AFB₁ 的枯草芽孢杆菌,该细菌的发酵上清液经浓缩后制成的粗酶液对 AFB₁ 降解率达 91.4%。在淡豆豉炮制中,AFT 产毒菌和拮抗菌可能通过竞争生长空间和营养物质、分泌有机酸、过氧化物、蛋白酶等代谢产物抑制产 AFT 菌的孢子萌发和菌丝生长。

目前,有许多研究者对拮抗菌抑制产毒菌株生长繁殖机制进行了大量的研究。微生物对产 AFT 菌生长的抑制作用主要分为竞争抑制作用和代谢产物抑制作用。竞争抑制作用机制主要是产毒菌被非产毒菌株竞争生长空间而被物理排除,或与产毒菌竞争生长和合成毒素的营养物质。代谢产物抑制作用是通过拮抗菌产生的一些酶、有机酸和抗生素等物质来抑制产毒菌的生长和产毒,如芽孢杆菌产生的抗生素和蛋白酶,乳酸菌产生的有机酸和多肽,酵母菌产生的几丁质酶等均对黄曲霉的生长有很强的抑制作用^[31]。

本研究中,5 株菌的种子液对产毒黄曲霉菌均有一定的抑制作用,这种抑制作用可能是竞争性抑制或是代谢产物抑制。5 株菌的过滤无菌发酵液对产毒黄曲霉菌均有一定的抑制作用,但其抑制效果弱于种子液,由此说明 5 株菌对产毒黄曲霉菌生长的抑制作用是通过营养竞争性抑制和代谢产物抑制的共同结果。

淡豆豉炮制过程中多种微生物共同参与,不同炮制时间点存在不同的优势菌,整个炮制过程中微生物种类呈交替更迭,炮制至后期已不存在黄曲霉和溜曲霉等可能产生 AFT 的微生物^[9-12]。本实验室前期检测了淡豆豉炮制过程中各时间点 AFT 的含量,发现“黄衣上遍”阶段中的发酵第 3 天、发酵第 6 天,以及“再闷”阶段中的再闷第 3 天、再闷第 6 天、再闷第 9 天均存在 AFT 污染,再闷第 6 天达到最大值,再闷第 9 天下降到 1.2 ng/mL,同时也发现发酵第 3 天、发酵第 6 天、再闷第 3 天、再闷第 6 天均存在产 AFT 菌株,主要为黄曲霉菌和溜曲霉菌,发酵第 6 天产毒菌数量最多,再闷第 3 天检测到菌落数开始下降。本研究表明多种拮抗菌导致了淡豆豉炮制中产 AFT 菌数量和 AFB₁ 含量的动态变化,研究结果将为揭示淡豆豉炮制过程 AFT 消长机制奠定基础,并为淡豆豉黄曲霉毒素的防控措施提供科学依据。

本实验室后续将进一步筛选鉴定既能抑制产毒菌产 AFB₁ 又能降解 AFB₁ 的高效拮抗菌,并对拮抗菌的拮抗机制和安全性等深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 342-343.
[2] 陈青峰,贺婧,谢小梅,等. 淡豆豉炮制中 γ -氨基丁酸含量测定及其抗抑郁作用研究 [J]. 药物评价研究,

2021, 44(4): 688-694.

- [3] 王艳,胡涛,朱丽伟,等. 部分地区荞麦食品中黄曲霉毒素 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的污染评价 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 211-217.
[4] 刘杉杉,孙伟,杨慧,等. 饲料中黄曲霉毒素对家禽的危害及防治 [J]. 农业与技术, 2019, 39(21): 139-140.
[5] 孙标,白禄宏,韩立虎,等. 产黄曲霉毒素生物降解酶枯草芽孢杆菌菌株的筛选及发酵工艺研究 [J]. 饲料工业, 2020, 41(10): 30-37.
[6] Cheng Y H, Shen T F, Pang V F, et al. Effects of aflatoxin and carotenoids on growth performance and immune response in mule ducklings [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 128(1): 19-26.
[7] 王庆峰,王岩,柴竹林. 黄曲霉毒素在粮食和食品中的危害及防治措施研究 [J]. 食品安全导刊, 2015(24): 52.
[8] 欧阳佩,徐新军. 中药中黄曲霉毒素分析方法进展 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(3): 12-16.
[9] 严文瑞,梁占学,王玲芝,等. 复方黄芪益气口服液对 AFB₁ 致鸡肝损伤的保护作用 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(2): 18-24.
[10] 熊京京,任佳秀,周姝含,等. 淡豆豉炮制过程中产 γ -氨基丁酸微生物的筛选和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2266-2273.
[11] 朱海针,龙凯,梁永红,等. Biolog 技术监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 14-17.
[12] 李刚,龙凯,苏明声,等. 淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中微生物菌群动态变化的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 139-142.
[13] 朱海针,谢卫华,龙凯,等. PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1757-1765.
[14] 张晓萍,刘笑笑,苗菊. 中药中黄曲霉毒素的研究进展 [J]. 甘肃科技, 2021, 37(5): 73-77.
[15] 李亚,梁剑锋. 紫外光降解黄曲霉毒素 B₁ 技术对小油坊花生油食用安全性的影响 [J]. 粮食与油脂, 2019, 32(1): 81-83.
[16] 程翠利,赵小会,蒋红梅,等. 黄曲霉及毒素防控技术研究进展 [J]. 食品工业, 2018, 39(2): 296-300.
[17] 黄巍,殷海成,王乐. 生物法降解黄曲霉毒素 B₁ 的机理研究进展 [J]. 中国饲料, 2019(1): 7-11.
[18] Osouli S, Afsharmanesh H. To evaluate the effects of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* mutant M419 against *Papilio demoleus* L. and *Aspergillus flavus* [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, 36(6): 492-496.
[19] 张秀江,胡虹,张永战,等. 酵母菌对饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的降解和脱除作用研究 [J]. 河南科学, 2016, 34(10): 1686-1690.

- [20] 吉小凤, 张巧艳, 李文均, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 脱毒菌株 LAB-10 的分离、鉴定及降解能力分析 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1094-1101.
- [21] 周姝含, 黄越燕, 熊京京, 等. 淡豆豉炮制中产 γ -氨基丁酸微生物在不同 pH 值和不同温度下产酶能力比较研究 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4176-4182.
- [22] Dufossé L, Féron G, Latrasse A, *et al.* Chirality of the gamma-lactones produced by *Sporidiobolus salmonicolor* grown in two different media [J]. *Chirality*, 1997, 9(7): 667-71.
- [23] Haffner T, Tressl R. Stereospecific metabolism of isomeric epoxyoctadecanoic acids in the lactone-producing yeast *Sporidiobolus salmonicolor* [J]. *Lipids*, 1998, 33(1): 47-58.
- [24] 宋川, 王利娟, 汪玲玲. 微生物代谢黄曲霉毒素 B₁ 的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 362-369.
- [25] 李瑞银, 闫金玲, 张喆萍, 等. 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的致毒机理及其生物脱毒技术研究进展 [J]. 饲料研究, 2020, 43(10): 109-112.
- [26] 谢慧, 高蕾, 赵丹丹, 等. 生物法降解黄曲霉毒素 B₁ 的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 249-256.
- [27] 宋承钢, 王彦多, 杨健, 等. 黄曲霉毒素脱毒研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3945-3957.
- [28] 严家俊. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选鉴定及其降解机理初步研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [29] Huang L, Duan C C, Zhao Y J, *et al.* Reduction of aflatoxin B₁ toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: A potential probiotic strain isolated from Chinese traditional fermented food “Tofu” [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170109>.
- [30] 张盼, 李培武, 万霞, 等. 枯草芽孢杆菌 Natto3 的筛选及其降解黄曲霉毒素 B₁ 的初步研究 [J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(2): 234-239.
- [31] 王昌禄, 刘彤, 李王强, 等. 微生物对黄曲霉毒素的抑制机制研究进展 [J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 27-36.

[责任编辑 郑礼胜]