

副干酪乳杆菌F50高密度发酵提升去除黄曲霉毒素能力及其非靶向代谢组学

张欣蕊, 阳刚, 李爱君, 彭小伟, 阚建全*

(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: 副干酪乳杆菌在食品工业和安全控制中均有重要作用, 工厂在生产应用中为了节约设备空间, 降低生产成本并提升应用价值对其进行高密度发酵。该研究利用低成本的糖蜜和脱油毛叶山桐子粕对副干酪乳杆菌 F50 进行高密度发酵, 以菌种密度作为响应值对培养条件和培养基成分进行优化。结果表明, 副干酪乳杆菌发酵最佳条件为接种量 3.5%、培养环境 pH 值 6.7 以及添加碳酸钙 1.7% 和脱油毛叶山桐子粕 3.2 g/L 油封发酵, 最终菌种密度可以从 7.3×10^8 CFU/mL 提高到 1.7×10^{10} CFU/mL, 约为常规培养的 23 倍, 黄曲霉毒素去除率从优化前 18.15% 提升到优化后 48.17%。为了探究高密度培养后黄曲霉毒素去除率提高的原因, 利用液相色谱-质谱联用仪 (Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LC-MS) 使用非靶向代谢组学技术对优化培养前后的副干酪乳杆菌上清液进行检测。结果表明, 优化前后副干酪乳杆菌发酵液主要差异代谢物有 535 种, 脂类、多肽、有机酸代谢物含量增加, 同时谷氨酸代谢通路增强, 促进谷胱甘肽的生物合成。该研究可为副干酪乳杆菌高密度发酵和生物降毒研究提供一定的参考。

关键词: 副干酪乳杆菌; 高密度发酵; 脱油毛叶山桐子; 非靶向代谢组学; 黄曲霉毒素

文章编号: 1673-9078(2026)01-41-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.1.1564

High Density Fermentation of *Lactobacillus paracasei* F50 Enhances Aflatoxin Removal and Associated Non-targeted Metabolomics

ZHANG Xinrui, YANG Gang, LI Aijun, PENG Xiaowei, KAN Jianquan*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Lactobacillus paracasei* plays a significant role in the food industry and safety. To save equipment space, reduce production costs, and enhance application value, factories conduct high-density fermentation during production. Low-cost molasses and defatted *Idesia polycarpa* Maxim were used as substrates for the high-density fermentation of *L. paracasei* F50. The culture conditions and medium components were meticulously optimized, with strain density serving as the primary response variable. The results showed that the optimal fermentation conditions for *L. paracasei* were a 3.5% inoculum, culture pH of 6.7, 1.7% calcium carbonate, and 3.2 g/L defatted *Idesia polycarpa* meal. The final strain density increased from 7.3×10^8 CFU/mL to 1.7×10^{10} CFU/mL, approximately 23 times that of the conventional culture. The aflatoxin removal rate increased from 18.15% before optimization to 48.17% after optimization. To investigate the reasons for the improved aflatoxin removal rate after high-density cultivation, liquid

引文格式:

张欣蕊, 阳刚, 李爱君, 等. 副干酪乳杆菌 F50 高密度发酵提升去除黄曲霉毒素能力及其非靶向代谢组学 [J]. 现代食品科技, 2026, 42(1): 41-52.

ZHANG Xinrui, YANG Gang, LI Aijun, et al. High density fermentation of *Lactobacillus paracasei* F50 enhances aflatoxin removal and associated non-targeted metabolomics [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(1): 41-52.

收稿日期: 2024-10-19; 修回日期: 2024-12-08; 接受日期: 2024-12-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFE0116500)

作者简介: 张欣蕊 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 微生物发酵及包埋, E-mail: 3073645095@qq.com

通讯作者: 阚建全 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养学、食品质量与安全, E-mail: ganjq1965@163.com

chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to analyze the supernatant of *L. paracasei* before and after optimized cultivation using non-targeted metabolomic techniques. The results showed that there were 535 main differential metabolites in the fermentation broth of *L. paracasei* before and after optimization, with increased levels of lipid, polypeptide, and organic acid metabolites. Simultaneously, the glutamate metabolic pathway was enhanced, promoting glutathione biosynthesis. This study provides a reference for high-density fermentation and biological detoxification research on *L. paracasei*.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; high density fermentation; defatted *Idesia polycarpa*; non-targeted metabolomics; aflatoxin

副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*), 属于有益乳酸菌, 在其生长过程中产生的乳酸具有抗氧化功能, 抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌^[1]等杂菌的作用, 除此之外, 副干酪乳杆菌还可作为其他有害细菌、真菌的拮抗菌。比如研究表明, 副干酪乳杆菌发酵液中高浓度的二乙酰基能有效抑制葡萄球菌和青霉菌活性^[2], 同样 Mohamed 等^[3]发现采用母乳中分离出的副干酪乳杆菌制作的硒纳米颗粒对动物病原真菌也有拮抗作用。此外, Sadeghi 等^[4]从米糠酸面团中分离出的乳酸菌对黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 有降解作用, 并且在其生长胁迫环境下仍可以产生乙酸和抗真菌代谢产物, 具有吸附和降解赭曲霉毒素、镰刀菌毒素^[5], 同时乳酸菌在高盐发酵鱼产品中同样也具有去除 AFB₁^[6]等霉菌毒素的能力。因此, 副干酪乳杆菌在黄曲霉等毒素去除方面具有巨大潜力。

开发副干酪乳杆菌生物拮抗产品需要大量益生菌, 因此需要对其进行高密度培养。目前, 高密度发酵的菌种密度提升方式包括优化培养基、优化培养条件以及发酵过程控制。例如, 郑亚平等^[7]针对培养基使用微生物自动鉴定系统对植物乳杆菌最优碳氮源进行筛选, 获得的菌体能够保持较高活性高密度培养, Jiang 等^[8]在连续分批补料发酵中, 通过补加 Fe²⁺ 和 NaNO₃ 提高了铜绿假单胞菌的细胞密度, 汪乐盛等^[9]通过对培养基中碳氮源优化和培养条件筛选, 提高了丁酸梭菌的菌体量。此外, 高密度发酵还能降低成本以及增加代谢产物含量, 例如 Dishisha 等^[10]以淀粉加工副产物马铃薯汁为氮源和维生素源, 降低了丙酸杆菌发酵生产丙酸的成本。类似地, 陈辰等^[11]对烟草废水中含有的可溶性糖、含氮化合物和矿物质进行利用, 实现了副干酪乳杆菌乳酸产量的提高。然而, 目前高密度发酵的添加组分普遍雷同, 且有关通过高密度发酵来提高副干酪乳杆菌对霉菌毒素去除率的研究鲜有报道。

基于上述现状, 本文利用课题组从泡菜中获得的一株对黄曲霉毒素有降解作用的副干酪乳杆菌 F50 为研究对象, 以菌种密度作为优化指标, 使用低廉的糖蜜和脱油毛叶山桐子粕对培养基中营养成分进行替换以及补充, 从而降低培养基成本, 对毛叶山桐子榨油

残渣进行了废物利用, 并对培养基和培养条件进行优化。此外, 分析了优化前后副干酪乳杆菌去除 AFB₁ 的差异, 采用非靶向代谢组学探究去除毒素的关键代谢产物。本文旨在为副干酪乳杆菌的规模化生产及其去除 AFB₁ 的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

副干酪乳杆菌: 由本课题组分离并鉴定, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 20222039。

毛叶山桐子, 四川省乐山市林业园林局; 金龙鱼花生油, 金龙鱼粮油食品股份有限公司; 糖蜜, 广西华舜国际经贸有限公司; 其他药品如蛋白胨、酵母粉、牛肉粉、酵母浸粉、葡萄糖、麦芽糖、琼脂均为生物级, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 硫酸锰、硫酸镁、乙酸钠、柠檬酸三铵、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化铁、硫酸铁、硫酸铜、氯化钙、碳酸钙、吐温 80 均为分析纯, 成都市科龙化工试剂厂; 二氯甲烷、正己烷、三氟乙酸均为色谱纯, 重庆市钛新化工有限公司; 黄曲霉毒素, 上海源叶生物科技有限公司。

MRS 液体培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 牛肉粉 5.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L, 酵母粉 4.0 g/L, 乙酸钠 5.0 g/L, 磷酸氢二钾 2.0 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L, 柠檬酸三铵 2.0 g/L, 硫酸锰 0.05 g/L, 吐温 80 1.1 g/L, 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

MRS 琼脂培养基: 在 MRS 液体培养基中添加 2% (m/V) 琼脂, 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

1.1.2 仪器与设备

T500 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; JXDC-20 氮气吹扫仪, 上海净信实业发展有限公司; Agilent 1260 series 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 超高效液相色谱-质谱仪, 深圳微科盟科技集团有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

将甘油管保存的副干酪乳杆菌以 3% (V/V) 的接种量接种到 100 mL 已灭菌的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养箱静置培养 1~2 d, 重复两次。

1.2.2 副干酪乳杆菌培养条件优化

1.2.2.1 单因素实验

在 250 mL 三角瓶中进行单因素和响应面优化实验, 接种活化后的副干酪乳杆菌, 37 °C 油封 (在发酵液上倒 2~3 cm 植物油, 形成厌氧环境) 培养 18~20 h, 以测定的 OD₆₀₀ 值为评价指标。

分别设置 1%、3%、5%、7%、9% (V/V) 的接种量; 液体培养基的初始 pH 值为 5、5.5、6、6.5、7、7.5; 以 0.02% (m/V) 的比例分别添加硫酸铁、硫酸铜、硫酸镁、氯化钙、硫酸锰作为金属离子; 设置碳酸钙 2%、4%、6%、8%、10% (m/V) 的比例添加; 将胡萝卜汁、番茄汁、黄瓜汁、葡萄汁和牛奶、作为营养因子, 经过 0.22 μm 膜过滤后以 1% (V/V) 量添加; 设置脱油毛叶山桐子粕以 0、5、10、15、20 g/L 的比例加入液体培养基, 以上作为单因素实验条件。

1.2.2.2 响应面实验

根据单因素实验结果, 以菌种密度为响应值, 探究接种量 (X₁)、初始 pH 值 (X₂)、碳酸钙含量 (X₃)、脱油毛叶山桐子粕添加量 (X₄) 对副干酪乳杆菌发酵工艺的影响。采用 Box-Behnken 实验设计, 选择 3 个水平 -1、0、1, 利用 Design Expert 10.0.3 软件设计四因素三水平 (见表 1) 的中心组合响应面优化实验。

表 1 四因素三水平响应曲面分析实验设计表
Table 1 4 factors 3 horizontal response surface analysis
experimental design table

因素	单位	符号	水平		
			-1	0	1
接种量	%	X ₁	2	3	4
初始 pH 值	-	X ₂	5	6	7
碳酸钙含量	%	X ₃	0	1.5	3.0
脱油毛叶山桐子 粕添加量	g/L	X ₄	0	1	5

1.2.3 培养基成分筛选

参照 Zhang 等^[12]的方法, 按照北京奥博星生物技术有限公司标准 MRS 液体培养基的成分比例自配培养基作为基础培养基对照 (下同), 分别以 50 g/L 的比例加入糖蜜、麦芽糖、D-果糖、蔗糖替换基础培养基中的碳源 (葡萄糖), 将两种最佳碳源以 1:1、

2:1、3:1 (m/m) 的比例进行复配, 将筛选出的最适比例的复配碳源分别设置为 10、30、50、70、90 g/L 不同质量浓度。参照 Ayivi 等^[13]的方法, 分别以 20 g/L 的比例将胰蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、酵母浸膏替换 MRS 培养基中的氮源 (蛋白胨), 将两种最佳氮源, 以 1:1、2:1、3:1 (m/m) 的比例进行复配, 将筛选出的最适比例的复配氮源分别设置为 10、30、50、70、90 g/L 不同质量浓度。

1.2.4 发酵液中细胞浓度测定

采用 GB 4789.35-2023 《食品微生物学检验 乳酸菌检验》中描述的稀释平板计数法对发酵液中的活菌数进行测定。

1.2.5 发酵条件优化前后去除黄曲霉毒素B₁的测定

使用优化前后两组副干酪乳杆菌 F50 进行 AFB₁ 去除实验, 将 2 mL 10 mg/mL 的 AFB₁ 加入到 50 mL 液体培养基中并接种副干酪乳杆菌 F50, 37 °C 油封培养 7 d, 每天测定 AFB₁ 含量。AFB₁ 的提取和测定参考 Yang 等^[14]描述方法, 用二氯甲烷作为毒素萃取剂, 将发酵液和萃取液按 1:2 比例进行萃取, 使用三氟乙酸衍生。HPLC 检测条件为: C18 柱 (柱长 150 mm, 柱内径 4.6 mm, 填料粒径 5.0 mm), 流动相为 65% 水、35% 有机 (乙腈: 甲醇 = 1:1), 流量为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样体积为 50 μL, 荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 360 nm 和 440 nm。AFB₁ 降解率按下式 (1) 计算。

$$R = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

(1)

式中:
R——AFB₁ 降解率, %;
C——对照组中 AFB₁ 含量, mg/mL;
T——实验组中 AFB₁ 含量, mg/mL。

1.2.6 非靶向代谢组学检测

1.2.6.1 样本信息

样本总共分两组, 组 A (优化前, O), 组 B (优化后, W) 每组六个, 其中 A 组中有三个加菌培养 (O1 add、O2 add、O3 add), 三个不加菌 (O1、O2、O3) 对照培养, B 组中有三个加菌培养 (W1 add、W2 add、W3 add), 三个不加菌 (W1、W2、W3)。

1.2.6.2 HPLC条件

色谱柱: HypersilGoldcolumn (C18), 柱温 40 °C, 流速 0.2 mL/min, 流动相 A: 0.1% 甲酸, 流动相 B: 甲醇。

1.2.6.3 质谱条件

扫描范围选择 m/z 100~1 500; ESI 源的设置如下:

喷雾电压 (SprayVoltage): 3.5 kV; 鞘气流量: 35 L/min; 辅助气流速: 10 L/min; 离子传输管温度: 320 °C; 离子导入射频电平: 60; 辅助气加热器温度: 350 °C; 极性: 正离子模式, 负离子模式; MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

1.3 数据处理与统计分析

1.3.1 单因素响应面优化实验数据分析

所有实验一式三份进行。数据表示为均值 $\pm$ 标准差。采用单因素方差分析法评估组间统计学意义, 其次采用 SPSS Statistics 20.0 的 Waller-Duncan 多范围检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

1.3.2 非靶向代谢组学数据分析

使用 GraphPad Prism 9 进行方差分析和 t 检验, 证明差异的统计学意义, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。使用 OECloud 工具在 <https://bioincloud.tech/> 处采用 Spearman 相关系数分析重要代谢物之间的相关性。

主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 使用 Wekemo Bioincloud (<https://www.bioincloud.tech>) 完成。使用 OPLS-DA 模型计算投影 (VIP) 值的变量重要性, 单因素分析 (t 检验) 计算统计显著性 (P 值), 并通过三个重复计算的 $VIP > 1.0$ 和 $P < 0.05$ 来选择差异代谢物。对于聚类热图, 使用差异代谢物强度区域的分数的数据进行归一化, <https://bioincloud.tech/task-meta> 工具绘制, 并利用 https://bioincloud.tech/standalone-task-ui/color_map 分析差异代谢物的富集途径。

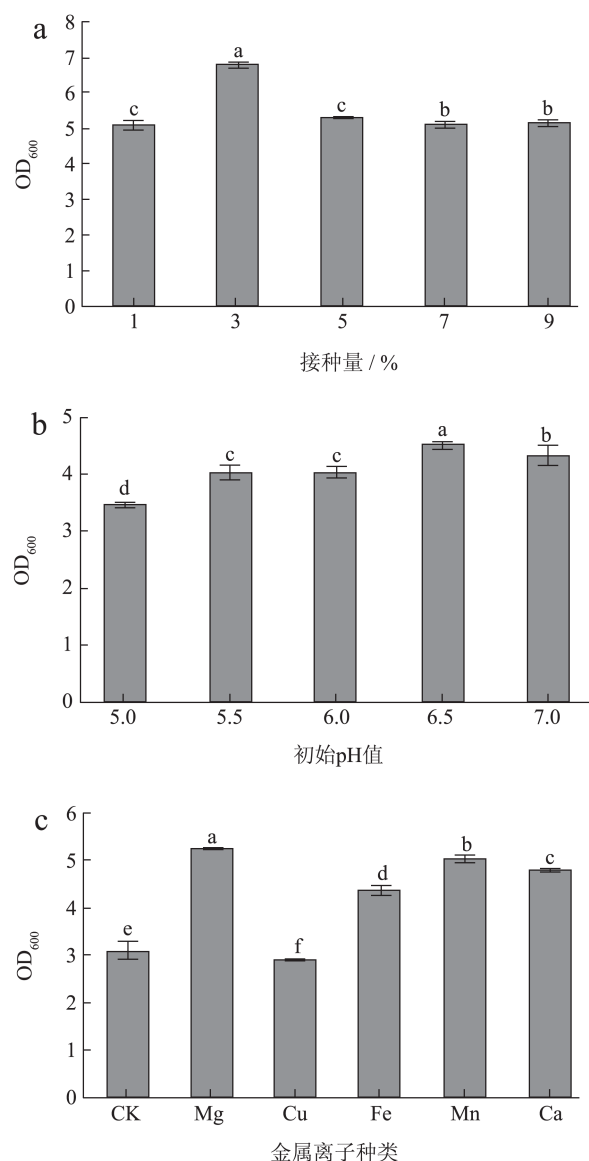
2 结果与讨论

2.1 发酵培养条件及响应面实验结果

2.1.1 培养条件单因素实验结果

如图 1a, 接种量为 3% 时菌种密度最大, 随着接种量的增加, 过高的生长密度使副干酪乳杆菌发生营养竞争, 从而抑制菌种继续生长。图 1b 所示, 培养基初始 pH 值为 6.5 时菌种密度最大, 在高密度培养工艺中, 通过适当调高培养基的初始 pH 值, 从而提高在发酵过程中的恒定 pH, 可以获得更高的活菌数和更好的生长效果。如图 1c, 相较添加其它金属离子, 添加 Mg^{2+} 离子的效果最好, 原因可能是镁离子激活了副干酪乳杆菌生长和代谢相关的酶, 并有助于维持培养基的弱碱性环境, 进而促进细胞的增殖和生长。如图 1d, 碳酸钙的添加量为 2% 时菌种密度最高, 添加

碳酸钙^[15]有利于培养环境中 pH 值的稳定, 避免生长中乳酸的大量积累胁迫菌种生长, 但高质量浓度的碳酸钙, 破坏了培养环境 pH 的稳定, 从而降低了菌种密度。图 1e 结果发现, 番茄汁^[16]作为生长因子更有利于副干酪乳杆菌生长, 其中含有丰富的维生素、矿物质以及多种抗氧化物质, 其中的抗氧化物质可以中和自由基, 减少氧化应激, 从而保护细胞免受损害。毛叶山桐子成本低, 通常其作为油料所使用。脱油后的毛叶山桐子残渣会直接丢弃, 但其中含有丰富的营养物质^[17], 如蛋白质、脂肪、灰分等多种必需微量元素。因此, 本文试图添加脱油毛叶山桐子粕, 促进对废物的利用和减少培养基成本。图 1f 所示, 添加量为 5 g/L 时菌种密度最高, 较高的添加量会导致培养基中营养成分过于丰富, 形成高渗透压环境, 降低乳酸菌生长速率和繁殖能力。



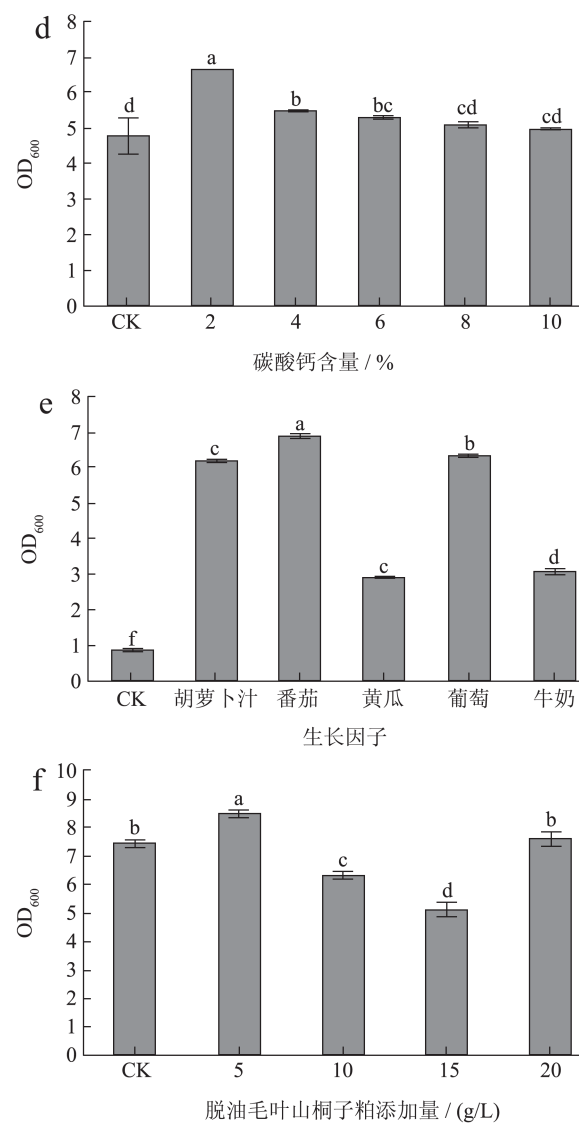


图 1 培养条件单因素实验结果

Fig.1 Results of single factor experiment on cultivation conditions

注：图中小写字母表示每组数据间的显著性差异。

2.1.2 响应面实验结果

2.1.2.1 菌种密度模型建立与分析

如表 2 所示，通过对实验数据进行二次回归方程分析，将响应变量与实验变量联系起来。采用 Design expert 10.0 软件对实验数据进行多元回归拟合，设接种量 (X_1)、初始 pH 值 (X_2)、碳酸钙含量 (X_3) 和脱油毛叶山桐子粕含量 (X_4)，以菌种密度 OD₆₀₀ 为响应值进行多元回归拟合，得到二次多项回归方程： $Y=8.79+0.49X_1+0.89X_2+0.4X_3+0.37X_4+1.18X_1X_2-0.09X_1X_3-1.32X_1X_4-0.37X_2X_3-0.64X_2X_4-0.7X_3X_4-1.67X_1^2-1.19X_2^2-1.36X_3^2-1.25X_4^2$ 。

从表 2 可以看出，该回归模型极显著，失拟项不显著，同时模型回归系数 $R^2=0.948\ 2$ ，调节后的

$R^2=0.896\ 4$ ，表明 89.64% 的数据可用该模型解释，说明方程可靠性较高，模型拟合程度好，实验值与预测值比较接近。因此，可以用该模型对菌种密度进行分析和预测。

表 2 菌种密度模型及回归系数的回归分析结果

Table 2 Regression analysis results of strain density model and regression coefficient

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	64.66	14	4.62	18.30	<0.000 1	**
接种量	2.85	1	2.85	11.30	0.004 7	**
初始 pH 值	9.54	1	9.54	37.81	<0.000 1	**
碳酸钙含量	1.88	1	1.88	7.45	0.016 3	*
脱油毛叶山桐子粕添加量	1.61	1	1.61	6.39	0.024 1	*
X_1X_2	5.59	1	5.59	22.17	0.000 3	**
X_1X_3	0.03	1	0.032	0.13	0.725 4	
X_1X_4	6.97	1	6.97	27.62	0.000 1	**
X_2X_3	0.53	1	0.53	2.11	0.168 2	
X_2X_4	1.63	1	1.63	6.44	0.023 6	*
X_3X_4	1.95	1	1.95	7.71	0.014 8	*
X_2	18.14	1	18.14	71.88	<0.000 1	**
X_2^2	9.16	1	9.16	36.31	<0.000 1	**
X_3^2	11.95	1	11.95	47.35	<0.000 1	**
X_4^2	10.19	1	10.19	40.39	<0.000 1	**
残差	3.53	14	0.25			
失拟项	3.25	10	0.32	4.52	0.079 4	
纯误差	0.29	4	0.07			
总和	68.19	28				

$R^2=0.948\ 2$ $R^2_{adj}=0.896\ 4$

注：* 表示为显著， $P<0.05$ ；** 表示为极显著 $P<0.01$ 。

通过分析方差数据可以看出，一次项接种量、初始 pH 值对菌种密度具有极显著影响，碳酸钙含量、脱油毛叶山桐子含量对菌种密度具有显著影响。分析各因素的主效应关系为：pH 值 > 接种量 > 碳酸钙含量 > 脱油毛叶山桐子含量。其二次项交互作用 X_1X_2 、 X_1X_4 对菌种密度具有极显著的影响， X_2X_4 、 X_3X_4 对菌种密度具有显著的影响^[18]。

2.1.2.2 验证实验结果

根据回归方程模型，以菌种密度最大值为优化目标，得到预测的最优条件为：接种量为 3.5%、pH 值为 6.7、添加碳酸钙 1.7%、脱油毛叶山桐子 0.32 g/L。在此最优条件下，经 3 次平行实验，实际菌种密度为 9.15×10^9 CFU/mL，与预测总菌种密度 9.20×10^9 CFU/mL，在 5% 偏差范围内相差不大，证实了预测值和实验值

之间的良好相关性。

2.2 培养基碳氮源实验结果

由于培养中的碳源和氮源对微生物的生长具有重要意义,本文进一步对培养基中的碳源、氮源以及添加量进行优化。如图 2a,在 5 种碳源中,采用糖蜜作为碳源,菌种密度最高,其次为麦芽糖。据报道,麦芽糖和糖蜜^[19]更容易被菌种利用,因此,对麦芽糖和糖蜜进行复配。糖蜜是工业副产物,价格低廉,并且其中含有可以被微生物利用的蔗糖、还原糖和棉实糖。此外,糖蜜还含有蛋白质、多种矿物质、维生素、纤维素、胺类等成分,为微生物提供了全面的营养支持,可以促进微生物代谢产物的合成。麦芽糖作为碳源,经过一系列转化后可以产生能量(ATP)和副干酪乳杆菌生长必需的前体物质,并且通过刺激相关合成基因的启动和相应酶系的合成,加速菌体的生长和代谢过程。如图 2b 所示,当糖蜜和麦芽糖比例为 3:1 时菌种密度最大,图 2c 最佳添加量为 10 g/L。同理,对氮源进行优化,图 2d 结果显示,蛋白胨的效果最佳,其次为酵母浸粉。蛋白胨是由蛋白质经酶或酸水解后得到的产物,含有丰富的氨基酸、肽段等氮源物质,容易被微生物吸收和利用。酵母浸粉中的叶酸、尼克酸、钴胺素等维生素类物质在微生物的生长和代谢过程中起着重要作用,有助于增强菌体的抗氧化能力、抗酸能力等,从而提高菌体在不利环境下的生存能力。如图 2e,最佳复配结果是蛋白胨:酵母浸粉为 3:1,图 2f 最佳添加量为 50 g/L。

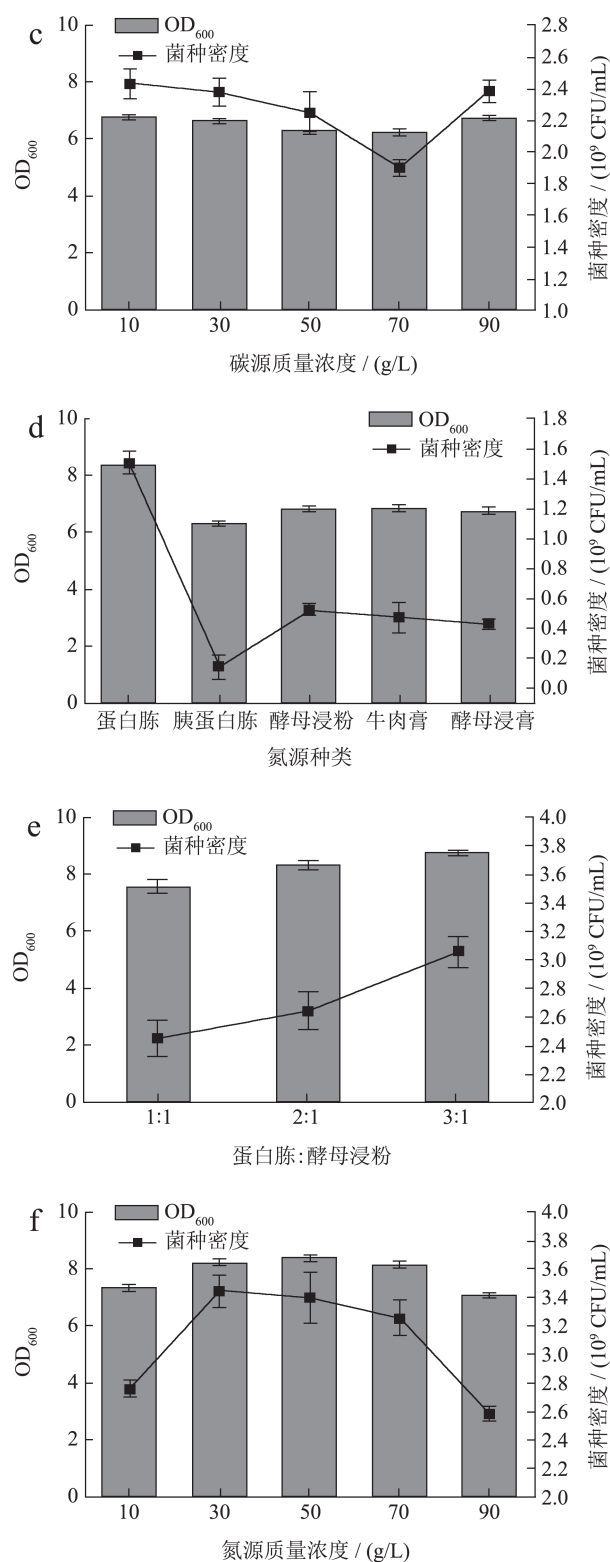
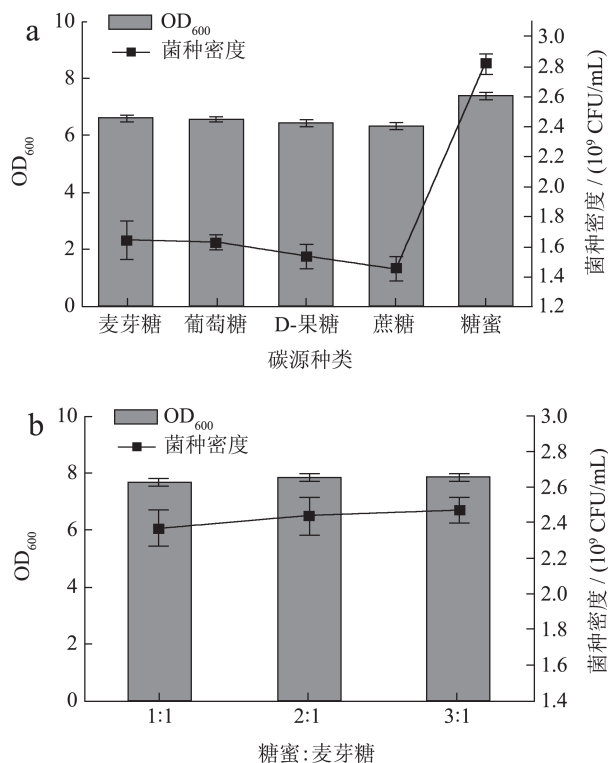


图 2 培养基成分单因素实验结果

Fig.2 Results of single factor experiment of medium composition

2.3 去除黄曲霉毒素实验结果

图 3 所示,经过高密度培养优化后的副干酪乳杆菌 F50 在对 AFB₁ 的去除方面有显著的效果,优化后的 F50 发酵液在第三天毒素去除率最高,达到

了48.17%，已达到其他同类益生菌毒素去除率水平，未优化的F50发酵液在第一天毒素去除率最高为18.15%，说明优化后的副干酪乳杆菌F50发酵液可以在3 d内持续对毒素产生去除作用。副干酪乳杆菌培养3 d后逐步死亡，从而造成毒素从菌种体内裂解释放^[20]，因此后续降毒效果下降，但整体优化后的毒素去除率仍高于优化前。

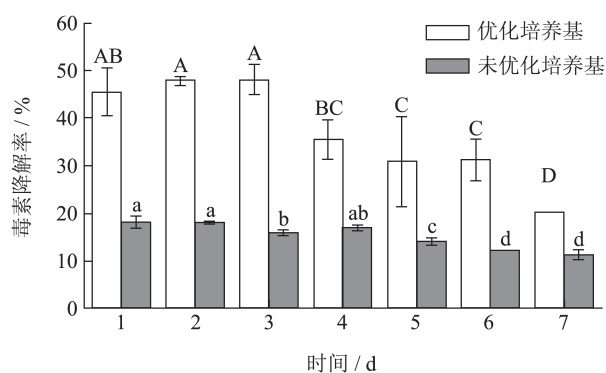


图3 黄曲霉毒素降解率随时间变化

Fig.3 The degradation rate of aflatoxin varies over time

注：大写字母表示优化培养基组间数据显著性差异；小写字母表示未优化培养基组间数据显著性差异。

2.4 非靶向代谢组学实验结果

2.4.1 主成分分析

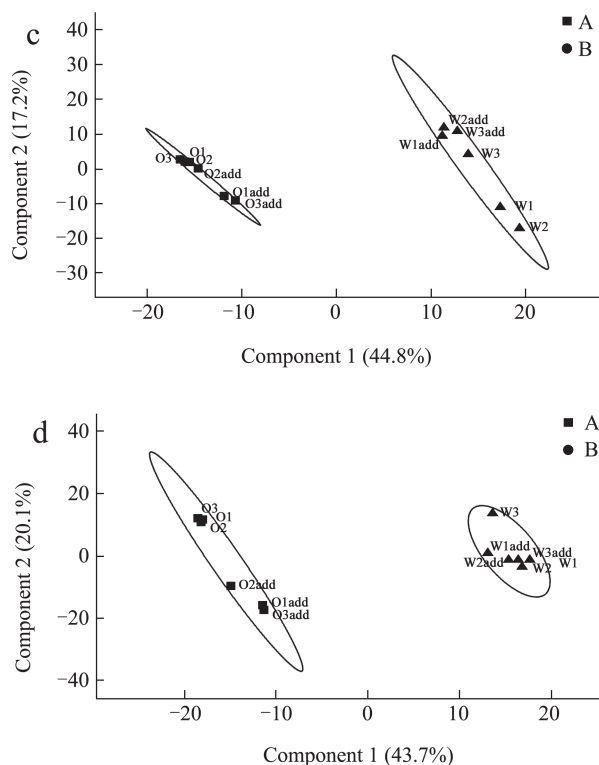
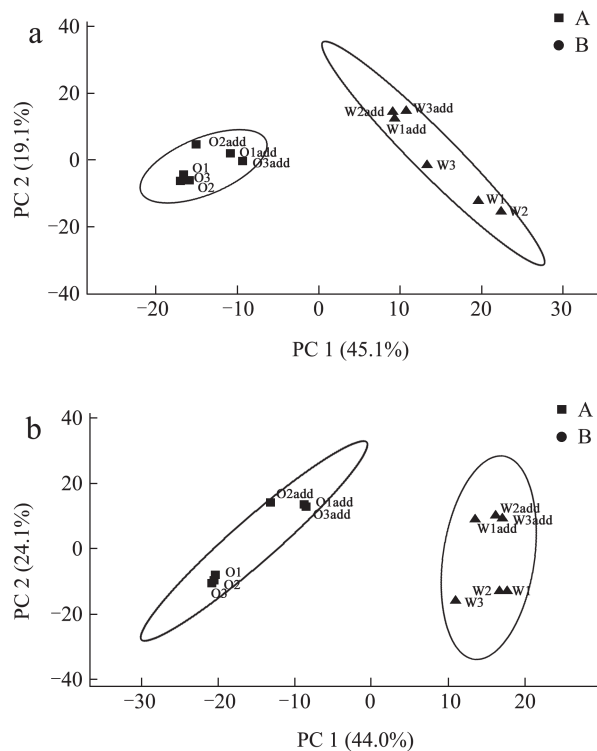


图4 PCA 主成分分析以及 PLS-DA 得分图

Fig.4 PCA principal component analysis and PLS-DA score chart

注：(a) 正离子模式下主成分分析；(b) 负离子模式下主成分分析；(c) 正离子模式下 PLS-DA 得分图；(d) 负离子模式下 PLS-DA 得分图。

采用 PCA 和 PLS-DA 对优化前后副干酪乳杆菌的代谢物进行分析，可以总体上反映各样本组间的总体差异和组内样本的变异度。在正离子图 4a 和负离子图 4b 模式下，PC1 的贡献率分别是 45.1% 和 44%，PC2 的贡献率分别是 19.1% 和 24.1%。由于 PC1 是解释数据变化的主要成分^[21]，并结合图中的置信椭圆分析，因此两组数据差异显著。PLS-DA 进一步分析不同样品之间相似度及差异性分析，正离子图 4c 和负离子图 4d 模式下，Component1 分别是 44.8% 和 43.7%，这说明第一个 PLS 成分在解释数据集变异性方面起到了重要作用。结果表明在优化前的 A 组和优化后的 B 组在正负离子检测模式下差异显著，表现出明显的分离趋势，并且在排除培养基本身成分影响的组内差异，代谢产物差异是显著存在的，为进一步分析奠定了基础。

2.4.2 差异代谢物聚类分析

经 LC-MS 检测，优化前后副干酪乳杆菌发酵上清液中总的差异代谢物有 535 种，含量增加的差异代

谢物有 268 种, 含量降低的差异代谢物有 267 种。在 535 种差异代谢物中, 差异倍数较大的是脂类、多肽、核酸、类固醇、有机酸 5 种类别, 分别占比 24%、19.6%、18.9%、12%、8.23%。

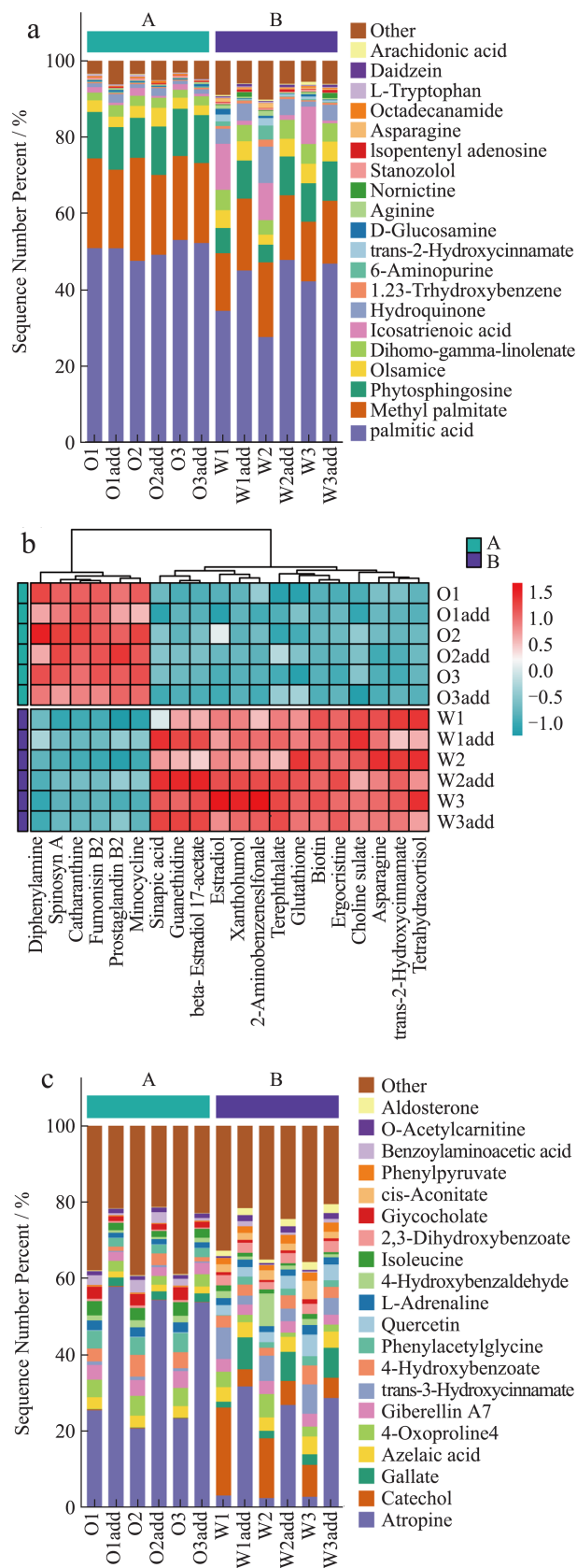


图 5 正负离子代谢物差异热图以及分类图

Fig.5 Differential heat map and classification map of positive and negative ion metabolites

注: (a) 正离子分组百分比堆积柱形图; (b) 正离子差异代谢物集聚类热图; (c) 负离子分组百分比堆积柱形图; (d) 负离子差异代谢物集聚类热图; (e) 生物角色堆积分类图。

基因通过不同的色块来表示, 颜色的深浅反映了基因表达量的大小, 红色通常代表高表达, 而蓝色代表低表达。这些色块通过水平和垂直方向上的线连接起来, 表示基因之间的相互作用、调控关系或共表达模式。如图 5b 正离子聚类热图所示, 天门冬素、生物素、谷胱甘肽、芥子酸、对苯二甲酸盐 / 酯、四氢皮质醇、17-乙酸-17-BETA-雌二酯、硫酸胆碱、2-氨基苯磺酸酯呈现高表达状态; 生物碱、二甲胺四环素、二苯胺、聚酮化合物衍生的大环内酯呈现低表达状态。如图 5d 负离子聚类热图所示, L-谷氨酸盐、雌二醇上调呈现

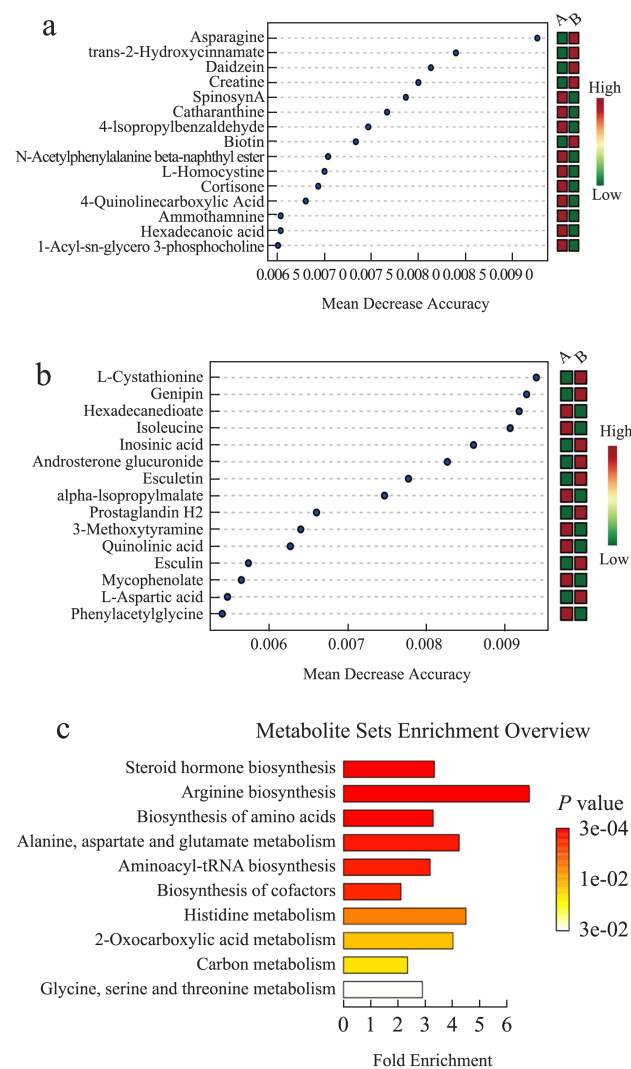
高表达状态；1-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、3,4-二羟苯丙氨酸下调呈现低表达状态。其高表达的物质中，谷胱甘肽^[22]可以在副干酪乳杆菌生长过程中的乳酸胁迫反应起关键作用，可以提高菌种耐酸性，增加生长繁殖活力。芥子酸可减弱耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中的生物膜形成和毒力因子的产生^[23]，并且作为抗氧化剂可以中和真菌产毒过程中的活性氧和自由基，有助于抑制黄曲霉生长和黄曲霉毒素的产生。对苯二甲酸酯类化合物（PAEs）在生物降解方面的研究中，可能会导致部分可能包括黄曲霉等多种霉菌的生长抑制以及毒素降解。

图 5a、5c 分组百分比堆积柱形图所示，优化高密度培养后，二十碳三烯酸和对苯二酚、邻苯二酚、没食子酸盐、醛固酮含量增加。生物角色图 5e 所示，优化培养后有机酸含量明显提升，利用优化后培养基以及培养条件培养的副干酪乳杆菌发酵液加菌组中出现了类固醇的成分，多肽类成分增多。其中没食子酸盐具有广谱的抗菌作用^[24]，可以抑制红色毛癣真菌、白色念珠菌生长以及黄曲霉等真菌孢子发芽。巨型芽孢杆菌中鉴定的 3 种肽对黄曲霉生长和 AFB₁ 具有很强的抑制作用，每种类型的肽都包含一系列不同数量的天冬氨酸残基^[25]，这与下文的代谢通路图相符合。有机酸通过降低 AFB₁ 生物合成相关基因的表达来抑制毒素的产生^[26]。优化后的上清液中出现了几茶酚、醛固酮成分，而儿茶酚对白色念珠菌和皮真菌有抑制活性，可用作局部防腐剂^[27]，有助于避免黄曲霉感染。

图 6a、6b 随机森林图中优化后副干酪乳杆菌 F50 发酵液中 L-半胱氨酸、次黄嘌呤核苷酸、雄酮葡萄糖醛酸、天冬酰胺、反式-2-羟基肉桂酸乙酯优化培养后上调。将各组中的显著差异代谢物分别在 KEGG 化合物数据库中进行检索，并获得相关代谢通路。通过 $pFDR < 0.05$ 、代谢物数目和富集比这三个筛选标准最终绘制出 KEGG 富集通路结果。横坐标为富集倍数， P 值的大小用颜色表示，颜色越深， P 值越小。由图 6c 可知显著代谢通路有类固醇激素合成、精氨酸生物合成、氨基酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢、氨酰生物合成、辅助因子生物合成、组氨酸代谢。图 6d 代谢通路图，主要描述了氨基酸-tRNA 的生物合成过程，涉及了多种氨基酸（如 L-Valine、L-Leucine、L-Isoleucine 等），这些氨基酸-tRNA 随后在蛋白质合成过程中被用来编码蛋白质的氨基酸序列。已有研究，谷胱甘肽及其转移酶对家禽 AFB₁ 感染具有一定的防护和解毒作用^[28]。培养基优化之后的副干

酪乳杆菌，谷氨酸代谢通路增强，L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-半胱氨酸、蛋氨酸、组氨酸代谢含量较高。谷胱甘肽的合成第一条途径为谷氨酸转化为 α -酮戊二酸、谷氨酰胺或与半胱氨酸、甘氨酸一起转化为谷胱甘肽提升去毒能力，还可以氧化脱氨基生成 α -酮戊二酸和氨，前者可以进入三羧酸循环产能或异生成糖^[29]，增加高密度发酵所需营养物质；第二条途径为 L-苏氨酸参与同型半胱氨酸生物合成，进而合成谷胱甘肽去毒。组氨酸在体内主要参与蛋白质合成、作为多种酶的辅因子。

因此，本文对 AFB₁ 的去除能力提升机制探究结果为，优化培养后的副干酪乳杆菌代谢产物中，出现了抑制真菌毒素形成的芥子酸，提高了具有广谱抑菌作用的有机酸和抑制真菌孢子萌发的没食子酸的产量，谷氨酸和 L-苏氨酸代谢通路增强，促进对 AFB₁ 感染有解毒作用的谷胱甘肽的生物合成。多种氨基酸代谢通路增加，间接影响了蛋白质以及多肽合成，从而增加了对 AFB₁ 有降解作用的关键酶合成。



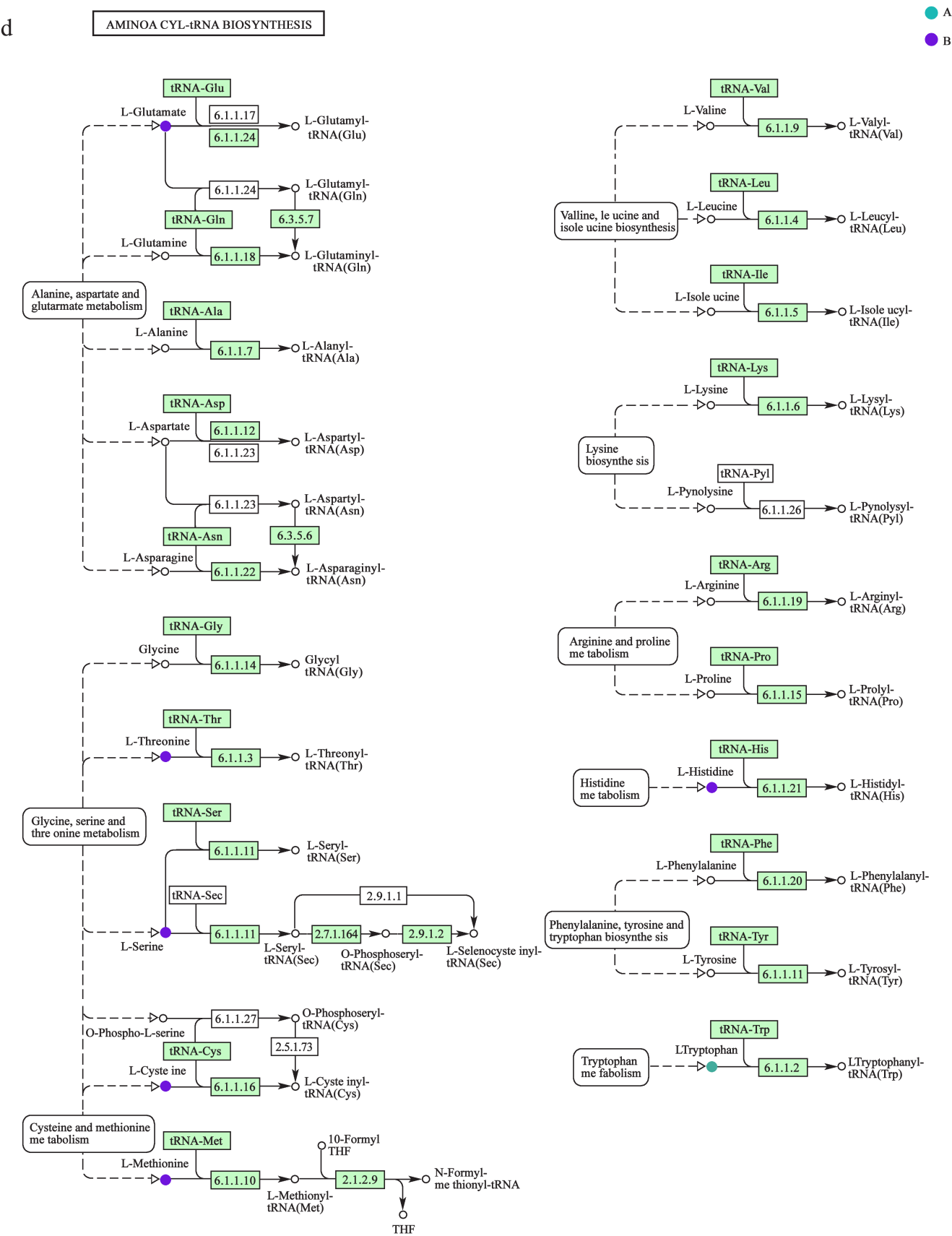


图 6 随机森林以及代谢通路图

Fig.6 Random forest and metabolic pathway map

注：（a）正离子随机森林；（b）负离子随机森林；（c）富集生物通路分析；（d）代谢差异通路。

3 结论

本文围绕培养基成分和培养条件两个方面对具有生防作用的副干酪乳杆菌进行高密度发酵工艺优化。并对脱油毛叶山桐子废渣和糖蜜进行废物利用,降低了高密度发酵成本。高密度发酵的最佳条件下,单因素和响应面实验结果表明,副干酪乳杆菌 F50 最适接种量为 3.5%、pH 值 6.7、添加碳酸钙 1.7%、添加脱油毛叶山桐子 3.2 g/L,采用油封发酵方式,最终副干酪乳杆菌 F50 的密度可以从 7.3×10^8 CFU/mL 提高到 1.7×10^{10} CFU/mL,约为常规培养的 23 倍,远超副干酪乳杆菌的同类型高密度发酵结果,达到同类结果的二倍左右。同时副干酪乳杆菌 F50 对 AFB₁ 的降解率从 18.15% 提升到了 48.17%。采用基于 LC-MS 的非靶向代谢组学技术,对优化前后副干酪乳杆菌 F50 的代谢产物进行解析,由于添加脱油毛叶山桐子粕植物成分,涉及芥子酸、儿茶酚的产生和有机酸的提高;此外发现 L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-半胱氨酸、蛋氨酸和谷氨酸代谢通路增加,与具有天冬氨酸残基的多肽以及谷胱甘肽的生物合成有关,并可能有助于 AFB₁ 的降解酶(漆酶、过氧化物酶和内酯酶)的合成。

总之,本研究明确了副干酪乳杆菌 F50 高密度发酵培养条件并为进一步分析副干酪乳杆菌 F50 去除毒素机制奠定了基础,这些结果为微生物高密度培养和食品安全控制提供了参考。

参考文献

- [1] SHAHVERDI S, BARZEGARI A A, VASEGHI BAKHSHAYESH R, et al. *In-vitro* and *in-vivo* antibacterial activity of potential probiotic *Lactobacillus paracasei* against staphylococcus aureus and escherichia coli [J]. Heliyon, 2023, 9(4): e14641.
- [2] AUNSBJERG S D, HONORÉ A H, MARCUSSEN J, et al. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 194: 46-53.
- [3] EL-SAADONY M T, SAAD A M, TAHA T F, et al. Selenium nanoparticles from *Lactobacillus paracasei* HM1 capable of antagonizing animal pathogenic fungi as a new source from human breast milk [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(12): 6782-6794.
- [4] SADEGHI A, EBRAHIMI M, RAEISI M, et al. Biological control of foodborne pathogens and aflatoxins by selected probiotic LAB isolated from rice bran sourdough [J]. Biological Control, 2019, 130: 70-79.
- [5] 肖柯,张霖,朱寒剑,等.乳酸菌对真菌毒素的减毒研究进展[J].食

- 品科学,2022,43(15):283-293.
- [6] YE L, WANG Y, SUN L, et al. The effects of removing aflatoxin B1 and T-2 toxin by lactic acid bacteria in high-salt fermented fish product medium under growth stress [J]. LWT, 2020, 130: 109540.
 - [7] 郑亚平,王均豪,王晨晨,等.植物乳植杆菌j26高密度发酵工艺优化及其发酵豆乳的应用[J].现代食品科技,2024,40(10):154-164.
 - [8] JIANG J, ZHANG D, NIU J, et al. Extremely high-performance production of rhamnolipids by advanced sequential fed-batch fermentation with high cell density [J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 326: 129382.
 - [9] 汪乐盛,李科,方莎莎,等.丁酸梭菌高密度发酵及产孢条件优化[J].食品与发酵工业,2024,50(24):107-113.
 - [10] DISHISHA T, STÅHL Å, LUNDMARK S, et al. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation [J]. Bioresource Technology, 2013, 135: 504-512.
 - [11] 陈辰,朱润琪,刘丽,等.副干酪乳杆菌zg19发酵烟草废水产L-乳酸的响应面优化[J].中国酿造,2018,37(2):100-105.
 - [12] ZHANG Y, DAI X, JIN H, et al. The effect of optimized carbon source on the synthesis and composition of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus paracasei* [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(4): 4023-4032.
 - [13] AYIVI R D, IBRAHIM S A, KRASTANOV A, et al. The impact of alternative nitrogen sources on the growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. Bulgaricus [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(10): 7986-7997.
 - [14] GANG Y, BIN L, KEWEI C et al. Isolation and evaluation of probiotics from traditional Chinese foods for aflatoxin B1 detoxification: *Geotrichum candidum* XG1 (yeast) and mechanistic insights [J]. Food Chemistry, 2024, 452: 139541.
 - [15] 李宜春.内源乳法益生菌微胶囊冻干菌粉的制备及其特性研究[D].烟台:烟台大学,2018.
 - [16] 王英,周剑忠,施亚萍,等.副干酪乳杆菌fm-lp-4菌株的高密度培养条件优化[J].江苏农业科学,2018,46(19):211-215.
 - [17] 杨静,张娟,李浪,等.毛叶山桐子粕的营养价值及重金属元素含量分析[J].动物营养学报,2020,32(11):5482-5490.
 - [18] 徐显睿,李翠凤,张宗博,等.响应面法优化乳双歧杆菌Z-1高密度发酵培养基[J].食品工程,2020,3:39-47.
 - [19] 兰水.不同碳源机械搅拌发酵制备细菌纤维素的研究[D].上海:东华大学,2014.
 - [20] 王玲.热灭活乳酸菌细胞吸附展青霉素机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2020.
 - [21] 汪琪,高雁,薛娟娟,等.液相色谱-质谱非靶向代谢组学分析3种不同生产原料波杂发酵饮品的代谢差异[J].食品科学,2024, 45(23):81-92.
 - [22] ZENG L, SI Z, ZHAO X, et al. Metabolome analysis of the response and tolerance mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to formic acid stress [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2022, 148: 106236.

- [23] FOHAD M H, NASSER A A, JAVED A K et al. Sinapic acid attenuates biofilm formation and virulence factor production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from raw camel milk: An *in vitro* and *in silico* approach [J]. International Dairy Journal, 2024, 155: 105955.
- [24] RAHMAWATI I, PRATAMA A W, PRATAMA S A, et al. Gallic acid: A promising bioactive agent for food preservation and sustainable packaging development [J]. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 2024, 10: 100776.
- [25] CHEN Y, KONG Q, LIANG Y. Three newly identified peptides from bacillus megaterium strongly inhibit the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* [J]. Food Control, 2019, 95: 41-49.
- [26] MOON Y S, KIM H M, CHUN H S, et al. Organic acids suppress aflatoxin production via lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus* [J]. Food Control, 2018, 88: 207-216.
- [27] QU S Y, LIU Y H, LIU J T, et al. Catechol compounds as dual-targeting agents for fish protection against *Ichthyophthirius multifiliis* infections [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 151: 109717.
- [28] MURCIA H W, DIAZ G J. Protective effect of glutathione *S*-transferase enzyme activity against aflatoxin B1 in poultry species: Relationship between glutathione *S*-transferase enzyme kinetic parameters, and resistance to aflatoxin B1 [J]. Poultry Science, 2021, 100(8): 101235.
- [29] QUE Z, WEI M, JIANG W, et al. Transcriptomic-metabolomic analysis reveals the effect of copper toxicity on fermentation properties in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 475: 134903.