

黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的分离鉴定及其降解特性

李超波, 李文明, 杨文华, 李海星, 刘晓华, 曹郁生*

食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047

摘要: 【目的】黄曲霉毒素是一类强毒、致癌的真菌次级代谢产物。本文旨在筛选出能高效降解黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的细菌。【方法】以 AFB₁ 结构类似物香豆素为惟一碳源进行 AFB₁ 降解菌株初筛, 得到的活性菌株的培养液分别与 AFB₁ 标准品 (2.5 μg/mL) 共同作用, 以 AFB₁ 降解率为指标进行复筛。对降解活性最好的菌株通过形态、生理生化特性以及 16S rRNA 序列分析进行初步鉴定; 并对细胞浓度、pH、温度、金属离子等对菌株降解活性的影响进行考察。【结果】初筛获得了 10 株在香豆素培养基上生长良好的细菌, 复筛发现这些菌均具有良好的 AFB₁ 降解活性, 其中从金毛羚牛粪便中筛选出的菌株 F4 降解活性最好, 去除 AFB₁ 能力达到 90.03%。根据 F4 菌株 16S rRNA 序列同源性分析, 结合形态、生理生化特性, 初步确定菌株 F4 为施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)。F4 的降解活性与细胞浓度呈正相关。当 pH 7.0, 35°C, 菌细胞作用 72 h 后毒素降解率达到 82.91%。Mg²⁺ 可增强 F4 的降解活性, 降解率提高 7.68%, 而 Cu²⁺ 可抑制其降解活性, 降解率降低 51.1%。【结论】筛选到能高效降解 AFB₁ 的施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) F4, F4 降解毒素的活性物质主要存在于菌体细胞, 其作用受到温度、pH 等的影响, 可能是一种胞内酶。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁, 生物降解, 施氏假单胞菌, 分离鉴定

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1129-08

黄曲霉毒素是黄曲霉等真菌产生的具有强毒、致癌的次级代谢产物, 广泛存在于农产品和食品中。黄曲霉毒素有多种组分, 其中以 B₁ 的毒性最强, 因而世界卫生组织把黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 定为 IA 类致癌物质。AFB₁ 的分解温度为 268°C, 因而食品加工中的高温对其没有影响。

对 AFB₁ 的污染主要采取 3 种方法: (1) 防止污染; (2) 对污染物进行脱毒; (3) 抑制毒素在消化道中的吸收^[1]。其中 AFB₁ 清除脱毒的方法包括化学法、物理法和生物法。但是理化方法会对食品的品质

量和营养有不同程度的影响, 甚至引起污染。因此利用生物学方法, 尤其微生物降解真菌毒素受到密切注意。

AFB₁ 的生物降解^[2-3] 是指 AFB₁ 分子的毒性基团被微生物的代谢产物或者酶分解破坏, 产生低毒或者无毒的降解产物的过程, 毒素生物降解是一种化学反应的过程, 完全不同于吸附作用。一些真菌具有降解 AFB₁ 的能力, 包括绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、不明毛霉 (*Mucor ambiguus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、茎点霉 (*Phoma sp.*)、糙皮侧耳

基金项目: 国家自然科学基金 (31060022)

* 通信作者: Tel: +86-791-88327754; E-mail: yysccc@hotmail.com

作者简介: 李超波 (1985-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: achao0800@163.com

收稿日期: 2012-03-26; 修回日期: 2012-04-26

(*Pleurotus ostreatus*)、假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)、栓菌属(*Trametes versicolor*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)以及平革菌(*Phanerochaete sordida*)等^[4-11]。其缺点是降解时间较长且不完全,因而影响实际应用。

细菌降解 AFB₁ 的报道不多,已报道降解 AFB₁ 的细菌主要有类棒菌状诺卡氏菌(*Nocardia corynebacterioides*) DSM12676、分枝杆菌(*Mycobacterium* spp.)、和红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)^[12-17],以及嗜麦芽窄食单胞菌、橙红色粘球菌、红色棒状杆菌属和枯草芽胞杆菌的一些菌株^[4,18-20]。

本研究通过大量工作,筛选到了能高效降解 AFB₁ 的菌株,对菌株的分离和鉴定方法,菌株降解活性测定方法进行了研究,初步确定了去毒活性物质的性质,并考察了影响细胞降解 AFB₁ 的因素。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(Agilent),3K18 型 Sigma 高速冷冻离心机(Sigma),PB-10 型精密 pH 计(Sartorius),79-1 型磁力搅拌器(上海仪表供销公司)。AFB₁ 标准品(Fermentek 公司),香豆素(阿拉丁试剂有限公司),Milli-Q 超纯水,甲醇、乙腈(色谱纯,天津永大化学试剂),PVDF 滤膜(0.45 μm),TaKaRa Agarose Gel DNA Purification 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),细菌 DNAout 试剂盒

1.2 样品采取和培养基

样品采集:样品主要来源于动物粪便、发酵食品、霉菌污染的土壤污水、腐烂朽木、粮食等。

种子培养基为营养肉汤(pH7.0)。初筛培养基为 Hormisch 改良培养基(g/L)^[15]: KH₂PO₄ 0.25, MgSO₄·7H₂O 0.25, KNO₃ 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.005, FeCl₃·6H₂O 0.003, 琼脂 18, 香豆素 1.0, pH7.0; 121℃ 高压灭菌 20 min 后加入香豆素。发酵培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 8.5, KH₂PO₄, 葡萄糖 1, pH6.5; 121℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 降解 AFB₁ 菌株的分离与筛选

1.3.1 初筛:称取样品 10 g, 磨碎后置于装有 90 mL 无菌生理盐水的 250 mL 三角瓶中, 混匀后吸取

0.25 mL 上清液接种于 5 mL 种子培养基中, 37℃ 培养 24 h 后, 然后将菌液接种于初筛培养基中, 37℃ 培养 1 周, 观察菌株的生长情况。若变浑浊, 取样划线于初筛培养基平板上, 37℃ 培养, 生长后挑取菌落, 在初筛培养基上传代 3 次, 保存能以香豆素为碳源生长的菌株做进一步筛选。

1.3.2 复筛:取初筛菌株分别接种于 5 mL 种子培养基中, 37℃、150 r/min 振荡培养 24 h, 接着再以 5% 的接种量转接于 100 mL 发酵培养基中, 37℃、150 r/min 振荡培养 48 h, 取 975 μL 菌体发酵液与 25 μL AFB₁ 标准品(100 μg/mL) 置于灭菌的 1.5 mL 离心管中, 使其毒素终浓度为 2.5 μg/mL, 以无菌的发酵培养基加 AFB₁ 作为空白对照, 37℃、150 r/min 于暗处振荡培养 72 h, 3 次平行。反应结束后, 离心去除菌体, 取其上清液测样。

1.4 AFB₁ 的 HPLC 检测方法

参考 Teniola 等^[16]报道的方法。培养结束后, 反应混合液用等体积的二氯甲烷萃取 3 次, 除去二氯甲烷层, 室温下氮气缓慢吹干, 用 0.5 mL 流动相溶解残余物(浓缩 1 倍), 滤膜过滤, 混匀进样。色谱条件如下:

色谱柱为 CAPCELL PAK UG120 RP-C18 柱(250×4.6 mm, 5 μm), 进样量 20 μL, 流动相为水: 乙腈: 甲醇 = 6: 3: 1 (V/V/V), 柱温 30℃, 流速 1 mL/min, 检测波长 362 nm

AFB₁ 的去除率利用以下公式计算:

去除率 = (1 - 样品中 AFB₁ 峰面积 / 空白对照中 AFB₁ 的峰面积) × 100%

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 表型特征与生理生化鉴定:操作参照相关参考文献^[21-22]。

1.5.2 细菌 16S rRNA 基因序列测定及同源性分析:使用细菌 DNAout 试剂盒提取基因组 DNA。以引物对 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTAGGCTCAG-3' 和 1492 r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 特异性扩增 16S rRNA。PCR 扩增程序: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。采用试剂盒纯化并克隆 PCR 产物, 送往宝生物工程(大连)有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 使用 Blast 比对, 从 GenBank 数据库中获得与菌株 16S rRNA 同源的公认标准序列数据, 使用软件 Clustal X1.83

[23] 对齐后使用 MEGA4.0 [24] 计算序列相似性并作 Neighbour-Joining (NJ) 系统发育分析。首先用 Clustal X 进行多序列匹配, 按 Kimura 2-parameter 计算进化距离, 最后构建 NJ 系统发育树, 进化树分枝稳定性用 Bootstrap 分析, 重复 1000 次。

1.6 F4 菌株的去毒活性物质及降解动力曲线测定

为初步确定细菌降解活性物质, 将试验分为 4 组: (1) F4 培养液, 按 1.3.2 的方法条件培养。(2) 细胞悬液。将 F4 菌液离心得到菌细胞, 用 PBS (pH7.0) 洗涤 2 次, 然后重悬于等量的 PBS (pH7.0) 中。(3) 上清液。(4) 细胞悬液热处理组。取细胞悬液置于 100℃ 水浴中 10 min。

上述 4 组中分别加入 AFB₁ 标准品, 使 AFB₁ 终浓度为 2.5 μg/mL, 以 PBS (pH7.0) 加 AFB₁ 作为空白对照, 37℃, 150 r/min 暗处振荡培养, 分别在 4 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 取样检测 AFB₁ 浓度, 3 次平行。反应结束后, 菌体细胞通过离心去除, 取上清液用 HPLC 测定毒素残留。

1.7 反应细胞的 AFB₁ 洗脱萃取试验

微生物对 AFB₁ 的脱毒作用有 2 种情况, 吸附或降解。为排除菌株的吸附作用, 采用洗脱萃取方法进行检查。(1) 取与 AFB₁ 作用后的细胞分散于 1.0 mL PBS (pH7.0) 中, 37℃ 保温 10 min, 离心, 重复处理 3 次, 用 HPLC 分析洗脱液中的 AFB₁。(2) 取与毒素作用后的细胞用 1.0 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 除去二氯甲烷层, 室温下氮气缓慢吹干, 用 0.5 mL 流动相溶解残余物 (浓缩 1 倍), 过膜处理, HPLC 检测萃取到的 AFB₁, 计算洗脱率。参照二氯甲烷对 AFB₁ 的萃取回收率, 以 AFB₁ 浓度为 2.5 μg/mL 的 PBS 作为空白对照。

1.8 影响 F4 细胞降解活性的因素

1.8.1 细胞浓度的影响: 制备不同浓度的 F4 细胞, 制备方法见 1.6, 同时通过稀释涂平板计数 (培养基为营养琼脂)。使其最终反应体系中初始细胞浓度分别为 1×10^8 CFU/mL、 5×10^8 CFU/mL、 1×10^9 CFU/mL、 5×10^9 CFU/mL 和 1×10^{10} CFU/mL, 作用 72 h, 其它条件与 1.6 相同。以 PBS (pH7.0) 加毒素作为空白对照。以下试验反应体系中细胞浓度均为 1×10^9 CFU/mL。

1.8.2 pH 的影响: 选择不同起始 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0) 的 PBS 重悬细胞进行 AFB₁ 降解试验。以各自 pH 的 PBS 加毒素作为空白对照。

1.8.3 温度的影响: 选择不同降解温度, 分别为 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、35℃、37℃ 和 40℃。以 PBS (pH7.0) 加毒素作为空白对照。

1.8.4 金属离子、EDTA 及 L-半胱氨酸 (L-cysteine, L-Cys) 的影响: 在反应体系中加入金属离子 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} (分别以 $ZnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $CuSO_4$ 的形式)、EDTA 以及 L-Cys, 使终浓度均为 10 mmol/L, 并以不加上述物质的细胞悬液作为一个对照, 然后进行降解实验。以 PBS (pH7.0) 加毒素作为空白对照。

1.9 数据分析

采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。试验结果数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同组之间的差异性采用 one-way ANOVA 方法进行比较, $P < 0.05$ 表示差异显著具有统计学意义。

2 结果和分析

2.1 菌株的初筛

初筛获得 10 株有降解活性的细菌 (表 1), 这些菌株在以香豆素为唯一碳源的培养基中生长良好。其中 7 株菌分离于动物粪便, 2 株菌分离自土壤, 1 株菌分离于发酵食品, 其降解 AFB₁ 的活性见表 1。

表 1 分离自不同样品的降解 AFB₁ 的菌株
Table 1 AFB₁-degrading isolates from various samples

Isolate	Source	Coumarin as sole carbon source	AFB ₁ Degradation (%) ± SD
24	Fermentation food	grow	49.68 ± 3.00 ^b
40	Soil	grow	39.50 ± 0.79 ^a
J	Soil	grow	69.28 ± 2.88 ^d
F4y	<i>Budorcas taxicolor</i> feces	grow well	73.54 ± 2.87 ^d
F4	<i>Budorcas taxicolor</i> feces	grow well	90.03 ± 4.88 ^f
F5w	<i>Mongolian horse</i> feces	grow	70.10 ± 1.77 ^d
F6	<i>Mongolian onager</i> feces	grow	68.10 ± 2.96 ^{cd}
F7	<i>Rex rabbit</i> feces	grow well	84.56 ± 6.66 ^e
F8	<i>Boer goat</i> feces	grow	71.56 ± 3.30 ^d
F11	Fish gut	grow	60.50 ± 1.77 ^e

The values are means of three replicates and their standard deviations. Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

2.2 复筛

10 株菌均具有良好的 AFB₁ 降解活性, 其中 F4 的降解能力最强, 降解率达到 90.03%; F7 的降解能

力次之(表1)。因此选择菌株 F4 进行进一步的研究。

2.3 降解活性菌株的鉴定

F4 菌株在营养琼脂培养基上为红色的圆形菌落,菌落边缘整齐,表面凸起湿润光滑。细胞为细小短杆状,革兰氏阴性。其主要生理生化特性见表2。

表2 菌株 F4 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of isolate F4

Item	Result	Item	Result
Maltoseutilization	+	Nitrate reduction	+
Sucrose utilization	+	Citrate utilization	+
D-Fructose utilization	+	Growth on 2% NaCl	+
Glucoseutilization	+	Growth on 5% NaCl	-
α -Galactose utilization	+	Growth on 7% NaCl	-
D-Xylose utilization	+	V-P test	-
Oxidase	+	M-R test	-
Starch hydrolysis	+	Growth at 4°C	-
Tween 80hydrolysis	+	Growth at 41°C	+
Gelatin hydrolysis	-	Catalase	+

“+” and “-” represents the positive and negative response, respectively.

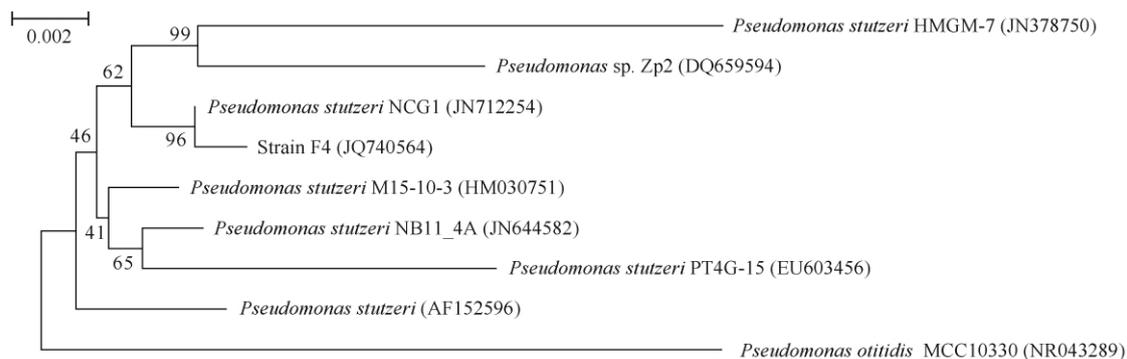


图1 菌株 F4 及相关种群 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain F4 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap (1000 re-samplings). Bar: 0.2% sequence divergence.

2.5 反应细胞的毒素洗脱萃取

取与 AFB₁ 反应后的 F4 细胞进行洗脱试验, PBS 重复洗脱 3 次, 取样用 HPLC 分析, 均未检测到 AFB₁; 用二氯甲烷对活细胞进行萃取, 该溶剂对 AFB₁ 的萃取回收率为 80.60%, HPLC 检测, 细胞萃取液中 AFB₁ 为 3.17%, 而对照组为 80.60% (表3)。

吸附脱毒的微生物, 比如乳酸菌^[25], 主要是通过细胞壁吸附毒素, 死亡细胞仍具有结合能力, 这种结合是可逆的, 反复洗脱或加入有机溶剂都能使毒素游离出来。本实验中, 热处理的 F4 细胞丧失了脱

毒活性, 已说明 F4 的去毒作用不是吸附结合。而对反应后的 F4 活细胞, 经反复水洗或者二氯甲烷萃取, 几乎检测不到 AFB₁, 进一步证实了 F4 菌株的脱毒作用不是吸附结合。

2.4 F4 培养物对 AFB₁ 的降解作用

对 F4 培养液、菌细胞、培养液上清以及热处理细胞降解 AFB₁ 的能力进行了比较, 见图2。结果发现培养液有着较高的降解活性, 达到 90.03%。菌细胞对 AFB₁ 也有着高效的降解活性, 作用 48 h 降解率达到 64.64%, 72 h 达到 82.84%, 接近对应时间培养液的水平。而上清液降解活性较低, 约为 10%。100°C 热处理后活性基本消失。可见, F4 去毒活性物质主要存在于菌细胞, 而不是上清液。无论培养液还是细胞, 对 AFB₁ 的降解在 72 h 达到最高水平。

毒活性, 已说明 F4 的去毒作用不是吸附结合。而对反应后的 F4 活细胞, 经反复水洗或者二氯甲烷萃取, 几乎检测不到 AFB₁, 进一步证实了 F4 菌株的脱毒作用不是吸附结合。

2.6 影响 F4 细胞降解活性的因素

通过以上试验可初步确定 F4 菌株降解 AFB₁ 活性物质主要存在于细胞, 可能是胞内酶的作用。而酶的催化活性与酶浓度、pH、温度以及激活剂和抑制剂密切相关, 下面主要从这几方面进行考察。

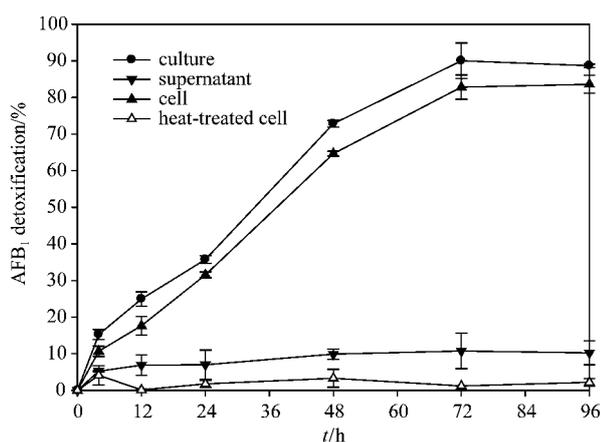
图2 菌株 F4 培养液、上清液及菌细胞对 AFB₁ 的降解作用

Fig. 2 Detoxification of strain F4 culture, supernatant, cell and heat treated cell.

表3 反应细胞的 AFB₁ 洗脱萃取效果Table 3 Effect of washing and extraction on release of AFB₁ remaining in F4 cell

Treatment	Wash with PBS			Extract with dichloromethane	
	Firsttime	Secondtime	Third time	F4 cell	Control
AFB ₁ released (%) ± SD	0	0	0	3.17 ± 0.22	80.60 ± 3.08

The values are means of three replicates and their standard deviations. The control represents the capacity for extracting AFB₁ with dichloromethane.

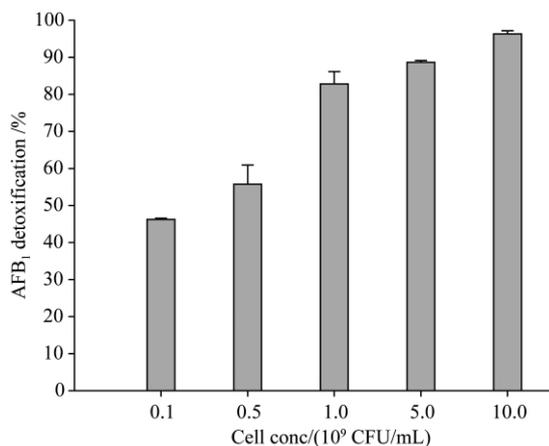
图3 菌浓度对 F4 细胞降解 AFB₁ 的影响

Fig. 3 Effect of strain F4 cell concentration on AFB₁ degradation.

2.6.3 温度对 F4 降解 AFB₁ 的影响: 温度对 F4 菌株降解毒素的水平有着显著的影响。温度在 35℃ 时降解率最高, 为 82.91%。温度升高或降低都会大大影响 AFB₁ 的降解, 温度为 20℃ 时, 降解率为 60.55%; 40℃ 时, 降解率为 68.22% (图 5)。

2.6.4 金属离子、EDTA 以及 L-Cys 对 F4 降解 AFB₁ 的影响: 金属离子对降解活性有一定影响。Mg²⁺ 对 AFB₁ 降解有增强作用, 降解率增加 7.68%;

2.6.1 细胞浓度的影响: 从图 3 可看出, F4 对 AFB₁ 的降解率与细胞浓度呈正相关。当细胞浓度为 1 × 10⁸ CFU/mL 时, 降解率只有 46.25%; 细胞浓度为 1 × 10⁹ CFU/mL 时, 降解率升至 82.84%; 当细胞浓度为 1 × 10¹⁰ CFU/mL 时, 降解率高达 96.32%。这可能是因为细胞浓度增大时, 降解酶的浓度也相应的增加, 于是底物 AFB₁ 的降解率也相应提高。

2.6.2 pH 对 F4 降解 AFB₁ 的影响: 从图 4 可看出, pH 对 F4 菌株降解毒素的水平有着显著的影响。pH 约为 7.0 时, 降解率为 81.92%; pH 为 5.5 时, 毒素的降解率下降到 61.22%。当 pH 上升时降解率也出现下降。

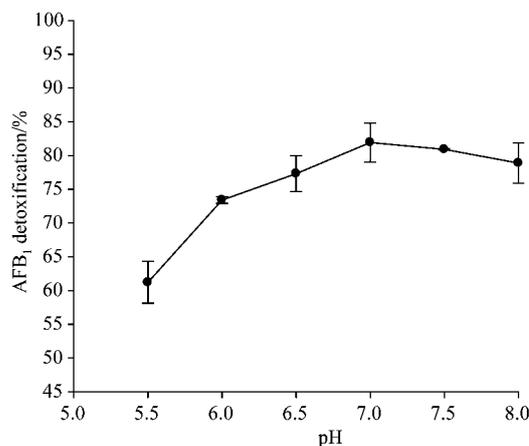
图4 pH 对 F4 细胞降解 AFB₁ 的影响

Fig. 4 Effects of pH on AFB₁ degradation with strain F4 cell.

Cu²⁺ 抑制降解活性, 降解率下降 51.1%。而其他金属离子、EDTA 以及 L-Cys 对 F4 降解 AFB₁ 没有显著的影响 (图 6)。

对温度、pH 敏感是酶的特点之一, F4 细胞降解 AFB₁ 应当是一种酶促反应。

3 讨论

虽然真菌毒素一般比较稳定, 但在自然界中并没有无限制的积累, 除了环境因素如 pH、温度、光线

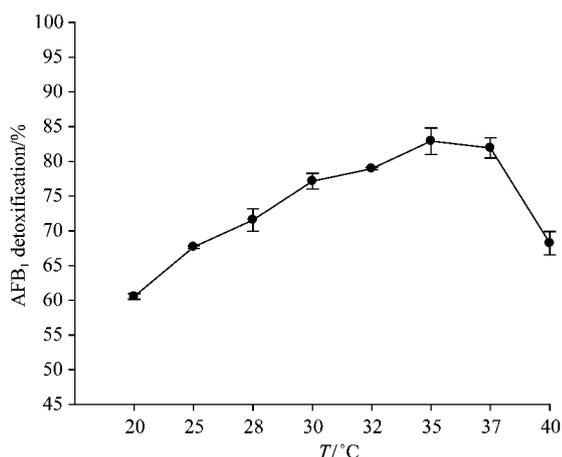


图5 温度对 F4 细胞降解 AFB₁ 的影响

Fig. 5 Effects of temperature on AFB₁ degradation with strain F4 cell.

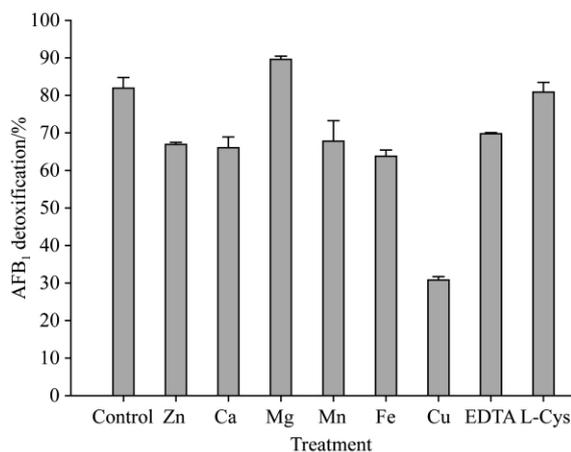


图6 金属离子、EDTA 以及 L-Cys 对 F4 细胞降解 AFB₁ 的影响

Fig. 6 Effects of metal ions, EDTA and L-Cys on AFB₁ degradation with strain F4 cell.

等理化因素的影响, 毒素的生物降解是一个重要的过程。微生物种类繁多, 几乎能代谢自然界所有的物质, 因而可以从各种生态环境中分离出需要的微生物, 包括能够降解真菌毒素的微生物。这也在降解黄曲霉毒素微生物的分离中得到了验证。Petchkongkaew 等^[26] 从泰国传统发酵豆制品 Thua-nao 中分离到能去除 AFB₁ 的芽胞杆菌。Teniola 等^[16] 从多环芳烃污染的土壤中分离得到红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*), 具有降解 AFB₁ 的能力。关舒等^[18] 从动物粪便中分离出一株嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 其发酵液对毒素的降解率达到 82.5%。

一般在分离降解毒素的活性微生物时应当注

意: (1) 从安全和应用考虑, 从发酵食品中筛选有降解活性的微生物是一个很好的方向。研究表明一些受污染的粮食谷物经过发酵后, 其 AFB₁ 含量明显降低^[27], 说明发酵食品中可能存在具有降解 AFB₁ 活性微生物。(2) 一些动物消化道中的微生物具有降解真菌毒素的能力, 能抑制和降低真菌毒素在胃肠道中的吸收, 因此可考虑从动物肠内容物中分离能降解 AFB₁ 的菌株。(3) 土壤中具有丰富的微生物资源, 污染物会对微生物产生选择性压力, 从而形成有降解活性微生物的富集, 给定向筛选提供了途径。

AFB₁ 是二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物, 基本结构为一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮(香豆素)(图7)。前者为基本毒性结构, 后者与致癌有关。香豆素是所有黄曲霉毒素的基本分子结构, 这意味着能以香豆素作为惟一碳源的微生物也可以利用 AFB₁, 而香豆素的分解, 必然导致 AFB₁ 的降解。

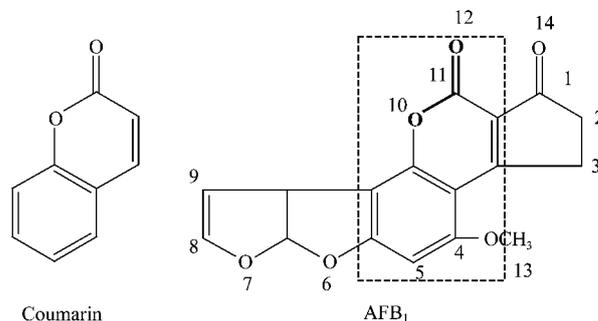


图7 香豆素和 AFB₁ 的分子结构

Fig. 7 Molecular structure of coumarin and AFB₁.

在定向筛选时, 常常加入目标底物或者结构类似物作为碳源或营养物进行分离。香豆素是一种常规化工原料, 安全方便, 价格低廉。本试验以香豆素为惟一碳源筛选 AFB₁ 降解菌, 取得了很好的效果。10 株能较好利用香豆素的细菌都有较高的降解 AFB₁ 的活性。Lee 等^[28] 研究表明 AFB₁ 的内酯环结构与其荧光特性、生物活性密切相关, 其内酯环断裂后产生一种非荧光化合物, 可大大降低其毒性和致畸性。这提示我们内酯环是降解反应活性基团之一, 微生物可能分解了 AFB₁ 中的香豆素基团, 导致 AFB₁ 的降解。

通过对培养液、菌细胞、上清液去毒活性的比较, F4 菌株降解 AFB₁ 的活性物质主要存在于细胞中, 对温度、pH 敏感。Mg²⁺ 可增强 F4 细胞的降解活性, 而 Cu²⁺ 则抑制其活性, 提示 F4 菌株的活性物质可能是一种胞内酶。有关酶的分离和性质, 降解产物的性质、毒性、结构的变化, 还有待进一步的研究。

4 结论

分离到一株能高效降解 AFB₁ 的细菌 F4, 其培养液对添加的 AFB₁ 降解率达到 90.03%。通过生理生化鉴定以及 16S rRNA 序列比对分析, 初步鉴定为 *Pseudomonas stutzeri*。F4 去毒活性物质主要存在于菌体细胞, 可能是一种胞内酶。以 AFB₁ 的结构类似物香豆素为惟一碳源进行 AFB₁ 降解菌株初步筛选, 是一种可行、安全的方法。

参考文献

- [1] Bata A, Lásztity R. Detoxication of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10 (6-7) :223-228.
- [2] Mishra HN, Das C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, 43 (3) :245-264.
- [3] Bhatnagar D, Lillehoj EB, Bennett JW. Mycotoxins and Animal Foods. Boston: CRC Press, 1991:816-826.
- [4] Mann R., Rehm HJ. Degradation products from aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1976, 2 (4) :297-306.
- [5] Shantha T. Fungal degradation of aflatoxin B₁. *Natural Toxins*, 1999, 7 (5) :175-178.
- [6] Motomura M, Toyomasu T, Mizuno K, Shinozawa T. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research*, 2003, 158 (3) :237-242.
- [7] Liu DL, Yao DS, Liang R, Ma L, Cheng WQ, Gu LQ. Detoxification of aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food Chemistry and Toxicology*, 1998, 36 (7) : 563-574.
- [8] Liu DL, Yao DS, Liang YQ, Zhou TH, Song YP, Zhao L, Ma L. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chemical Toxicology*, 2001, 39 (5) :461-466.
- [9] Zjalic S, Reverberi M, Ricelli A, Granito VM, Fanelli C. *Trametes versicolor*: a possible tool for aflatoxin control. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107 (3) :243-249.
- [10] Sardjono ESR, Raharjo S, Rahayu K. Detoxification of aflatoxin B₁ by extracellular enzymes of *Aspergillus oryzae* KKB4. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 2004, 11 (1) :30-34.
- [11] Wang J, Ogata M, Hirai H, Kawagishi H. Detoxification of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 314 (2) :164-169.
- [12] Ciegler A, Lillehoj EB, Peterson RE, Hall HH. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1966, 14 (6) :934-939.
- [13] Line JE, Brackett RE. Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 1995, 58 (1) :91-94.
- [14] Smiley RD, Draughon FA. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *Journal of Food Protection*, 2000, 63 (3) : 415-418.
- [15] Hormisch D, Brost I, Kohring GW, Giffhorn F, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Holzapfel WH. *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B₁ degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27 (6) :653-660.
- [16] Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Jany KD, Alberts JF, Vanzyl WH, Holzapfel WH. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556^T. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105 (2) :111-117.
- [17] Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, Vanzyl WH. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109 (1-2) :121-126.
- [18] Guan S, Ji C, Zhou T, Li J, Ma Q, Niu T. Aflatoxin B₁ degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9 (8) :1489-1503.
- [19] Guan S, Zhao L, Ma Q, Zhou T, Wang N, Hu X, Ji C. *In vitro* efficacy of *Myxococcus fulvus* ANSM068 to biotransform aflatoxin B₁. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11 (10) :4063-4079.
- [20] Gao X, Ma Q, Zhao Q, Shan Y, Ji C. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *European Food Research Technology*, 2011, 232 (6) :957-962.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.

- [22] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第8版. 北京:科学出版社,1984.
- [23] Thompson, JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) :4876-4882.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8) :1596-1599.
- [25] El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chemical Toxicology*, 1998, 36 (4) :321-326.
- [26] Petchkongkaew A, Taillandier P, Gasaluck P, Lebrihi A. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B₁ and ochratoxin a detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104 (5) :1495-1502.
- [27] Dam R, Tam SW, Satterlee LD. Destruction of aflatoxins during fermentation and by-product isolation from artificially contaminated grain. *Cereal Chemistry*, 1977, 54 (3) :705-714.
- [28] Lee LS, Dunn JJ, Delucca AJ, Ciegler A. Role of lactone ring of aflatoxin B₁ in toxicity and mutagenicity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1981, 37 (1) :16-17.

Isolation and characterisation of an aflatoxin B₁-degrading bacterium

Chaobo Li, Wenming Li, Wenhua Yang, Haixing Li, Xiaohua Liu, Yusheng Cao*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract: [Objective] Aflatoxins are toxic and carcinogenic fungal metabolites. The aim of this research was to isolate aflatoxin B₁ (AFB₁)-degrading bacteria. [Methods] Samples from various sources were screened by using coumarin as the sole carbon source. The strains that could grow in the medium with coumarin carbon source were detected for their degradation of AFB₁ ability by addition of AFB₁ (2.5 μg/mL) to the cultured broth. Among the positive strains, F4 strain with the highest activities was identified according to its morphological, physiological and biochemical properties together with phylogenetic analysis of its 16S rRNA sequence. The effects of degradation conditions such as bacterial cell concentration, pH, temperature, metal ions on the degrading AFB₁ were investigated. [Results] Ten isolates showed good AFB₁ reduction activity and they could grow well on coumarin carbon source. Strain F4, obtained from *Budorcas taxicolor* feces could reduce AFB₁ by 90.03% after incubation in the liquid medium at 37°C for 72 h. F4 was preliminary identified to be *Pseudomonas stutzeri* with morphology, physiological and biochemical properties and 16S rRNA gene sequence. The active degrading component existed in the cell of F4, and the degrading activity was interrelated with cell concentration, temperature, pH and metal ions. [Conclusion] An AFB₁-degrading strain F4 was isolated from animal feces and identified as *Pseudomonas stutzeri*. The active component of AFB₁ degradation was mainly in the cell of F4.

Keywords: Aflatoxin B₁, Biodegradation, *Pseudomonas stutzeri*, Characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060022)

* Corresponding author. Tel: +86-791-88327754; Fax: +86-791-88333708; E-mail: yysccc@hotmail.com

Received: 26 March 2012/Revised:26 April 2012