

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1481 - 1488; 4 December 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.011

植物乳杆菌 ZJ8 吸附伏马菌素 B₁ 和 B₂ 特性

张军¹, 乔雅菲¹, 王晓², 裴家伟¹, 郑钧予², 张柏林^{2*}

¹河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071000

²北京林业大学食品科学系, 北京 100083

摘要:【目的】研究了植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ZJ8 对伏马菌素 B₁ 和 B₂ 吸附作用与机制。【方法】采用高效液相色谱检测菌体对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率。【结果】菌株 ZJ8 对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率分别为 89.9%、95.0%，这种吸附特性与菌体活力无关，且随培养时间延长而增加。菌株 ZJ8 的吸附率在 pH 4 时达到最大，分别为 96.4% 和 99.0%。碱性和高温条件下都不利于菌株吸附伏马菌素。经强酸和 SDS 处理后，菌体对伏马菌素吸附率显著性上升。菌体细胞壁对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率高达 96.8% 和 100%。植物乳杆菌 ZJ8 胞壁成分中肽聚糖的吸附率最高，分别为 98.4% 和 100%。【结论】植物乳杆菌 ZJ8 可以通过吸附作用清除环境中的伏马菌素 B₁ 和 B₂，对吸附起主要作用的是菌体细胞壁上的肽聚糖。

关键词: 植物乳杆菌, 伏马菌素 B₁, 伏马菌素 B₂, 吸附作用

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209(2014)12-1481-08

伏马菌素 (Fumonisin, FBs) 是一组主要由串珠镰刀菌、多育镰刀菌等产生的一类水溶性的真菌毒素。自 1988 年由南非科学家 Gelderblom 首先从串珠镰刀菌分离出一组水溶性的代谢产物并命名为伏马菌素^[1]。到目前为止, 已经有 28 种伏马菌素被分离、鉴定, 其中伏马菌素 B₁ 和伏马菌素 B₂ 在自然界中存在广泛, 且毒性最强^[2]。毒理学及流行病学研究表明, 伏马菌素具有神经毒性、肺毒性、致癌性等, 可引起马脑白质软化症 (ELEM) 和猪肺水肿综合症 (PPE), 还可以诱发人类食道癌、肝癌、胃癌和胎儿神经管畸形等疾病^[3-4]。伏马菌素主要存在于玉米及玉米相关食品中, 而玉米是世界主要农作物, 是谷物食品和饲料的主要来源之一。因此, 伏马菌素的污染已引起世界各国的广泛重视, 在食品安全中的意

义越来越受到人们的重视, 成为继黄曲霉毒素后真菌毒素研究领域的又一个研究热点。目前国内关于伏马菌素的研究多限于检测及病理性方面的研究, 然而关于用微生物除去伏马菌素的研究尚未见任何报道。国外关于用微生物除去伏马菌素的研究相对多一些, V. Niderkorn 等通过研究 29 株乳酸菌和丙酸菌吸附伏马菌素的效果, 研究表明乳酸菌和丙酸菌普遍具有吸附伏马菌素的能力, 但菌株之间的差异很大; 其中明串珠菌 R1107 对 FB₁ 去除率高达 82%, 3 株乳酸乳球菌 CS43、CS197、CS202 对 FB₂ 高达 100%^[5-6]。Romina P. Pizzolitto 等研究表明酿酒酵母 CECT1891 和嗜酸乳杆菌 24 对伏马菌素 B₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 的吸附是独立的, 黄曲霉毒素 B₁ 没

基金项目: 国家“863 计划”——益生菌定向筛选与功能开发关键技术 (2008AA10Z335)

* 通信作者。Tel: +86-40-62336154; E-mail: zhangbolin888@163.com

作者简介: 张军 (1988 -), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: zhangjun2813@126.com

收稿日期: 2014-03-17; 修回日期: 2014-05-28

有竞争微生物与伏马菌素 B₁ 的结合位点^[7]。

乳酸菌具有比表面积大表面结构复杂等特性, 利于吸附伏马菌素, 且乳酸菌有抗突变、抗肿瘤及抗癌等活性; 对真菌毒素、多环芳烃和杂环胺类物质普遍具有吸附作用。国内外报道关于抗突变的乳酸菌菌株, 主要包括: 乳杆菌属、乳球菌属和肠球菌属等。因此, 本实验主要选取植物乳杆菌、戊糖乳杆菌、尿肠球菌和乳酸乳球菌等作为被选菌株。以筛选到的对伏马菌素 B₁ 和 B₂ 具有较高吸附率的植物乳杆菌菌株为材料, 探讨乳杆菌吸附伏马菌素的特性, 旨在为利用乳杆菌开展伏马菌素生物脱除方面的应用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 所选菌株分别为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)、尿肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*), 共 12 株, 均由中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC) 收藏; 1 株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 由河北农业大学食品科技学院微生物实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 伏马菌素 (FB₁、FB₂) 新加坡 Pribolab 公司; 邻苯二甲醛 (OPA) Aladdin 公司; 四硼酸钠 Aladdin 公司; β-巯基乙醇北京九州同业生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯); 乙腈 (色谱纯) 等; 2475 型高效荧光液相色谱仪美国 Waters 公司; 紫外/可见分光光度计北京普析通用仪器有限公司; 反向 Luna-C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Phenomenex) 等。

1.2 菌体悬液的制备

将 12 株乳酸菌按 4% 接种量转接于 MRS 液体培养基中, 37℃ 培养 18 - 22 h。枯草芽孢杆菌 3% 接种量转接于 LB 培养基中, 37℃ 摇床培养 12 - 16 h。将培养液离心 (4℃, 4000 × g, 10 min) 收集菌体, 无菌水离心洗涤 2 次, 据各菌体生长曲线调整菌体浓度为 5 × 10⁹ cfu/mL。该菌悬液于 4℃ (12 h 内) 保存待用。

1.3 伏马菌素的检测

1.3.1 伏马菌素溶液配制: 将 1 mg 伏马菌素 FB₁ 和 FB₂ 标准品分别用 1 mL 的乙腈-水溶液 (1:1) 溶

解, 配成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液, 于 -18℃ 冰箱保存。使用时配制浓度为 100 μg/mL (FB₁ = 100 μg/mL, FB₂ = 100 μg/mL) 的工作液, -4℃ 避光保存待用。

1.3.2 伏马菌素的检测: 参照文献 [8-11]。荧光检测器激发波长 335 nm, 发射波长 430 nm, 流动相 A 为纯乙腈, B 为甲醇: 磷酸二氢钠 (0.05 mol/L, pH = 3.35 用磷酸调) = 1:1, 梯度洗脱见表 1 柱温 30℃, 流速 1 mL/min, 进样量 5 μL

表 1. 流动相梯度洗脱比例

Table 1. The proportion of mobile phase gradient elution

t/min	A/%	B%
0	10	90
6	10	90
6-7	60	40
7-13	60	40
14	10	90
14-16	10	90

A, acetonitrile; B, carbinol: NaH₂PO₄ (0.05 mol/L, pH = 3.35) = 1:1.

1.4 菌体对伏马菌素吸附率的测定

取供试菌株悬液 1 mL 离心 (4℃, 4000 × g, 10 min) 收集菌体, 加 950 μL 无菌水, 50 μL 伏马菌素工作液 (FB₁ = 100 μg/mL, FB₂ = 100 μg/mL), 得到含有 5 μg/mL 伏马菌素 (FB₁ = 5 μg/mL, FB₂ = 5 μg/mL) 的菌悬液。将该混合液 37℃ 培养 4 h, 离心 (4℃, 4000 × g, 10 min) 收集上清。将上清液过 0.22 μL 的滤膜, 用 HPLC 法检测伏马菌素 B₁ 和 B₂ 的含量。以不含乳酸菌细胞的 5 μg/mL 伏马菌素水溶液 (FB₁ = 5 μg/mL, FB₂ = 5 μg/mL) 作为空白对照。并测定 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。

菌体对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率按下式计算:

伏马菌素 B₁ 吸附率 (%) = [(空白样中伏马菌素 B₁ 的含量 - 上清液中伏马菌素 B₁ 的含量) / 空白样中伏马菌素 B₁ 的含量] × 100%

伏马菌素 B₂ 吸附率 (%) = [(空白样中伏马菌素 B₂ 的含量 - 上清液中伏马菌素 B₂ 的含量) / 空白样中伏马菌素 B₂ 的含量] × 100%

吸附稳定性: 将上述方式菌体与伏马菌素培养离心后的菌体沉淀, 加入乙腈: 水 (1:1) (每 5 × 10⁹ cfu/mL 菌体加入 1 mL), 超声 6 min, 离心后取上清液, 利用 HPLC 法测定洗脱液中伏马菌素的含量。

1.5 吸附伏马菌素菌株的筛选

将 13 株供试菌按操作 1.2 与 1.3 所述分别制

备菌悬液,并测定 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。

1.6 吸附伏马菌素稳定性

将上述方式菌体与伏马菌素培养离心后的菌体沉淀,加入乙腈:水(1:1)(每 5×10^9 cfu/mL 菌体加入 1 mL),超声 6 min,离心后取上清液,利用 HPLC 法测定洗脱液中伏马菌素的含量。

1.7 菌株吸附 FB₁ 和 FB₂ 交互作用

将筛选出的植物乳杆菌 ZJ8 分别只加 FB₁(FB₁ = 5 μ g/mL),只加 FB₂(FB₂ = 5 μ g/mL),FB₁ 和 FB₂(FB₁ = 5 μ g/mL, FB₂ = 5 μ g/mL)同时加入,分别检测伏马菌素的吸附率。

1.8 影响乳杆菌吸附伏马菌素的物理因素

①将植物乳杆菌 ZJ8 (5×10^9 cfu/mL)(以下同)与伏马菌素(FB₁ = 5 μ g/mL, FB₂ = 5 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C 分别培养 10 min、30 min、1 h、2 h、4 h。②将 ZJ8 (5×10^9 cfu/mL)与伏马菌素(FB₁ = 5 μ g/mL, FB₂ = 5 μ g/mL)分别在 4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 培养 4 h。培养结束后,取样测定不同培养时间及温度下菌体的伏马菌素吸附率。

将 ZJ8 分别悬浮于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 3、4、5、6)和 Tris-HCl 缓冲液(pH 7、8)中,添加伏马菌素工作液使伏马菌素最终浓度为 5 μ g/mL(FB₁ = 5 μ g/mL, FB₂ = 5 μ g/mL),混匀后 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,按操作 1.4 测定 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。以不含乳杆菌的缓冲液与伏马菌素工作液混合,作为空白对照。

1.9 不同处理方式下菌体的吸附特性

热、酸及 SDS 处理参照 El-Nezami 等的报道^[12]。将处理后的菌体按操作 1.4 测定伏马菌素吸附率。取未经处理的菌体作为对照。

1.10 吸附伏马菌素后乳杆菌的活力状况

将 ZJ8 菌悬液 1 mL (5×10^9 cfu/mL)分别与 5 μ g/mL FB₁、5 μ g/mL FB₂ 和 5 μ g/mL FB₁、FB₂ 混合,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 4 h,离心(4000 \times g, 5 min)取菌体沉淀,用无菌水离心洗涤 1 次,悬浮于 1 mL 生理盐水中,利用梯度稀释法进行平板计数,观察菌体的生长状况。取 1 mL 供试菌悬液计数作为对照。

1.11 植物乳杆菌吸附伏马菌素机制的研究

1.11.1 菌体胞外多糖对其吸附伏马菌素的影响:

取 ZJ8 菌悬浮(5×10^9 cfu/mL) 1 mL,在 4 $^{\circ}$ C 下 4000 \times g 离心 10 min 收集菌体,加入 1 mol/L 的 NaCl 溶液中,超声 5 min^[13],离心(4000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)收集菌体,无菌水离心洗涤 2 次,按 1.4 所

述测定处理后菌体的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。

1.11.2 菌体细胞壁对其吸附伏马菌素的影响:①

无细胞提取物:取植物乳杆菌 ZJ8 菌悬液(5×10^9 cfu/mL),稀释 3 倍,冰浴超声破碎 30 min,功率为 400 W,工作 5 s 间歇 5 s。待破碎完毕后,4000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,去除未破碎的菌体,将上清液于 12000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,分别收集上清液及沉淀。上清液即为无细胞提取物,沉淀为乳杆菌菌体粗提细胞壁^[14]。取上清液添加 FB₁/FB₂。使浓度为 5 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 4 h,按 1.4 所述测定无细胞提取物的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。②乳杆菌细胞壁的提取根据刘景圣等报道的方法^[15],在提取的细胞壁中加入 FB₁ 和 FB₂,使其均浓度为 5 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,测定乳杆菌细胞壁的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。③细胞壁磷壁酸的提取参照 Zhao 的方法^[16],在提取的磷壁酸中加入 FB₁ 和 FB₂,使其浓度为 5 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,测定 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。④细胞壁肽聚糖的提取:将上步所得沉淀重新溶于 10% TCA 中,沸水浴搅拌处理 20 min,处理完毕后迅速冷却至室温,15000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 收集沉淀,反复洗涤 3 次,将得沉淀悬浮于乙醚,中 30min,再于 15000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 收集沉淀,用无菌去离子水洗涤 2 次,加入 FB₁ 和 FB₂,使其浓度为 5 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,测定菌体细胞壁肽聚糖的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率。⑤乳酸菌原生质体的制备参照韩璞等的方法^[17]。按操作 1.3 所述测定供试菌株原生质体的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率,以不含原生质体的高渗稳定液与 FB₁ 和 FB₂ 混合,作为空白对照。

1.12 数据分析

所有实验均重复测定 3 次,实验数据采用平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS17.0 统计软件对实验数据进行统计分析,做 t 检验及单、双因素方差分析。

2 结果和分析

2.1 吸附伏马菌素菌株的筛选

从表 2 可以看出,12 株乳酸菌和 1 株枯草芽孢杆菌对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附效果不同,菌株间差异较大。乳酸菌对伏马菌素普遍具有吸附效果,且菌株间差异较大,其中植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)对伏马菌素的吸附效果比较好,且对 FB₂ 的吸附效果明显高于

FB₁ 的吸附效果, 乳酸菌对伏马菌素的吸附没有种的特异性, 同一种内吸附率有高有低。如所选植物乳杆菌中, ZJ8 吸附率最高, 对 FB₁, FB₂ 的吸附率分别为 89.9%、95.0%, B37 吸附率最低, 分别为

48.2%、81.4%。因 ZJ8 吸附率最高, 且其分离基物为酸面团, 为食源性乳酸菌; 所以, 本实验选用植物乳杆菌 *L. plantarum* ZJ8 作进一步的吸附特性研究对象。

表 2. 不同菌株的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率

Table 2. The percentage of FB₁ and FB₂ bound by the strains tested

Species	Strain	FB ₁ -binding rate / %	FB ₂ -binding rate / %	Content of FB ₁ after wash / (μg/mL)	Content of FB ₂ after wash / (μg/mL)
<i>L. plantarum</i>	B37	48.2 ± 1.30	81.4 ± 2.63	—	—
<i>L. plantarum</i>	B10	75.5 ± 1.74	82.1 ± 2.45	—	—
<i>L. plantarum</i>	B31	86.1 ± 1.23	91.3 ± 1.72	4.03 ± 0.24	2.69 ± 0.08
<i>L. plantarum</i>	ZJ46	85.9 ± 0.56	84.1 ± 2.94	4.15 ± 0.21	2.41 ± 0.10
<i>L. plantarum</i>	ZJ8	89.9 ± 1.78	95.0 ± 1.63	3.87 ± 0.18	2.47 ± 0.14
<i>L. pentosus</i>	X28	59.9 ± 1.98	86.6 ± 2.68	—	—
<i>L. pentosus</i>	X5	86.4 ± 2.30	93.2 ± 1.96	3.48 ± 0.16	2.47 ± 0.09
<i>L. pentosus</i>	X10	85.8 ± 1.87	90.1 ± 2.21	4.18 ± 0.23	2.64 ± 0.14
<i>L. pentosus</i>	ZJ28	56.7 ± 1.36	88.9 ± 3.26	—	—
<i>E. faecium</i>	RS5	80.2 ± 1.63	27.9 ± 1.54	—	—
<i>E. faecium</i>	RS9	78.8 ± 2.30	28.0 ± 1.41	4.02 ± 0.19	1.40 ± 0.11
<i>L. lactis</i>	BY21	21.5 ± 1.65	43.2 ± 1.79	—	—
<i>B. subtilis</i>	168	10.3 ± 2.05	17.8 ± 1.87	—	—

2.2 吸附伏马菌素稳定性

将供试菌株与伏马菌素培养离心后的菌体沉淀, 加入乙腈: 水 (1:1) (每 2 × 10⁹ CFU /mL 菌体加入 1 mL), 超声 6 min, 离心后取上清液, 检测 FB₁ 和 FB₂ 的含量。由表 2 可知菌体对 FB₂ 吸附后稳定性明显高于吸附 FB₁ 后的稳定性。其中, 尿肠球菌 RS9 基本上全部被洗脱下来, 其它菌体吸附 FB₁ 后大约有 90% 被洗脱下来, 而菌体吸附 FB₂ 后大约只有 50% 被洗脱下来, 进一步说明菌体更易吸附 FB₂ 且吸附后稳定性较好。

2.3 菌株吸附 FB₁ 和 FB₂ 交互作用

将植物乳杆菌 ZJ8, 在只加入 FB₁ (FB₁ = 5 μg/mL), 只加入 FB₂ (FB₂ = 5 μg/mL), 或 FB₁ 和 FB₂ (FB₁ = 5 μg/mL, FB₂ = 5 μg/mL), 同时加入等情况下共同培养, 分别检测伏马菌素的吸附率, 结果如表 3。

表 3. 菌株 ZJ8 吸附 FB₁ 和 FB₂ 交互作用的影响

Table 3. The binding effects of interaction between FB₁ and FB₂

Toxin	FB ₁ -binding rate / %	FB ₂ -binding rate / %
FB ₁	90.3 ± 1.63	—
FB ₂	—	94.6 ± 1.98
FB ₁ and FB ₂	89.9 ± 1.78	95.0 ± 1.76

* : P < 0.05, ** : P < 0.01 compared with strains without treatments.

方差分析表明 ($P < 0.01$), 当仅仅 FB₁ 或 FB₂ 和菌株 ZJ8 共同培养时, 菌株 ZJ8 对 FB₁ 的吸附率无差异; 当仅仅 FB₂ 或 FB₁ 和 FB₂ 一起与菌株 ZJ8 共同培养时, 菌株 ZJ8 对 FB₂ 的吸附率也无差异。这说明菌株 ZJ8 吸附 FB₁ 和 FB₂ 时并无交互作用发生, 不存在两个毒素间的竞争性抑制。故为了方便工作, 后续试验中采用同时加入 FB₁ 和 FB₂ 的方式来检测菌株 ZJ8 吸附 FB₁ 和 FB₂ 的效果。

2.4 影响乳杆菌吸附伏马菌素的物理因素

2.4.1 培养时间: 由图 1-A 可知, 在培养 30 min 内, 植物乳酸菌 ZJ8 对 FB₁ 的吸附速度较快, 30 min 后增长比较缓慢, 1 h 后变化不大; 而 ZJ8 对 FB₂ 的吸附率更快, 在培养 10 min 时, 对 FB₂ 的吸附率达 85.5%。这说明菌株对 FB₂ 的吸附明显强于对 FB₁, 且对 FB₂ 的吸附速度较快。EL-Nezam 等报道, 鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) LGG 及 LC-705 与黄曲霉毒素 AFB₁ 的吸附率在 10 h 内即达到 78% 以上^[13]。这说明供试乳酸菌菌株吸附伏马菌素与吸附黄曲霉毒素的过程比较接近, 具体机理有待进一步探讨。

2.4.2 温度: 由图 1-B 可知, 在 4 - 37℃ 范围内, 随培养温度上升, 植物乳杆菌 ZJ8 吸附 FB₁ 和 FB₂ 的效果逐渐提高。当培养温度上升到 50℃ 时, 菌株

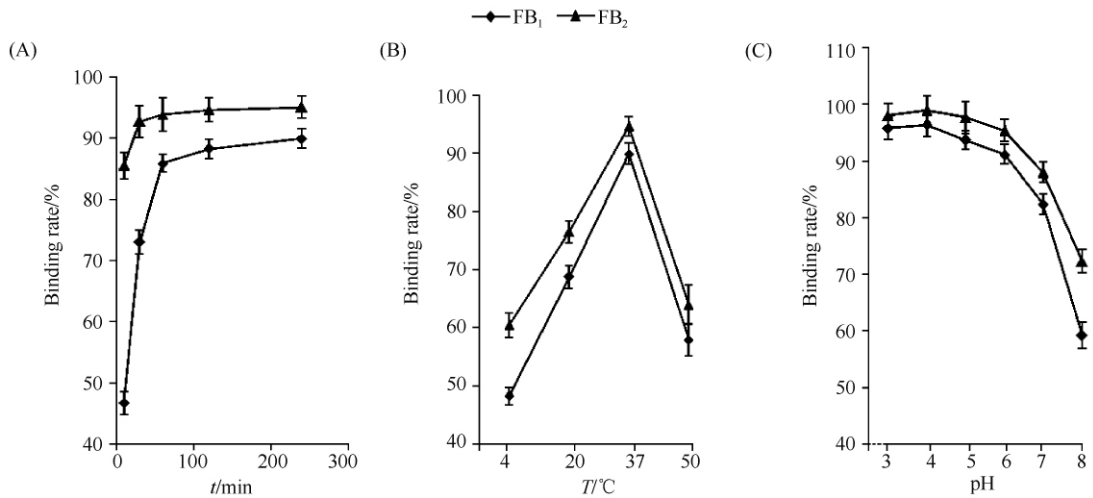


图 1. 培养时间 (A)、温度 (B) 和 pH (C) 对植物乳杆菌 ZJ8 吸附伏马菌素的影响

Figure 1. Effects of incubation time (A), temperatures (B) and pH (C) on FB bond by strain ZJ8.

ZJ8 的 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率开始下降。说明高温不利于菌株 ZJ8 吸附伏马菌素。Zinedine 研究指出, 乳酸菌在 25°C 时对 AFB₁ 的吸附率达到最大, 在 15°C 及 37°C 下则吸附率较低^[18]。我们的结果证实, 培养温度不同, 菌株 ZJ8 吸附伏马菌素的效率不同, 这一结果与 Zinedine 的研究结论是相似的。

2.4.3 pH: 由图 1-C 可知, 在 pH 为 3 到 7 时, 菌株吸附 FB₁ 和 FB₂ 的能力都较高, 且在 pH 为 4 时达到最大值, 对 FB₁ 的吸附率为 96.4%, 而对 FB₂ 的吸附率更高, 只能检测到极微量的 FB₂, 接近 100%。当 pH 大于 7 时, 菌株对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率迅速下降, 说明碱性条件下不利于菌株对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附。

2.5 不同处理方式下菌体的吸附特性

由表 4 可以看出, 热灭活处理后, 菌株 ZJ8 对 FB₁ 和 FB₂ 吸附率与未处理菌株相比无显著性差异。这说明菌体细胞对伏马菌素的吸附作用与其活力无关, 并非生理代谢作用所引起。酸处理后, 菌株 ZJ8 对伏马菌素的吸附率呈极显著上升, 只能检测到极少量的 FB₁ 和 FB₂, 基本上接近 100%。SDS 处理并没有影响显著菌株 ZJ8 吸附 FB₁ 的效果, 但导致 FB₂ 的吸附率呈极显著上升。通常, SDS 处理可以除去菌体表面蛋白, 暴露出更多结合位点, 使菌株吸附 FB₂ 的效率呈极显著上升。鉴于 FB₁ 和 FB₂ 的结合位点可能不同, 故对菌株 ZJ8 的 FB₁ 吸附率影响不大。

表 4. 菌体活力对 FB₁ 和 FB₂ 吸附率的影响

Table 4. The percentage of FB₁ and FB₂ bound to viable cells, heat-treated and acid-treated bacterial cells

Treatment	FB ₁ -binding rate/%	FB ₂ -binding rate/%
Viable	89.9 ± 1.78	95.0 ± 1.76
Heat-treated	89.5 ± 2.10	94.7 ± 2.78
Acid-treated	99.0 ± 1.21**	99.7 ± 1.10**
SDS-treated	90.7 ± 1.23	99.3 ± 1.16**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ compared with viable strains.

2.6 菌体吸附伏马菌素后的活力

由表 5 可知, 两株乳酸菌在加入 FB₁、FB₂ 及 FB₁、FB₂ 同时加入的情况下与空白对照无显著性差异, 与空白对照比较起来, 活菌数只是略微降低。这说明在 5 μg/mL 的浓度级别下加入 FB₁、FB₂ 对乳酸菌无显著性影响, 而乳酸菌的许多益生功能都是在其具有生理活性的状态下实现的, 所以乳酸菌在吸附伏马菌素后还具有活力发挥其益生功能。

表 5. 吸附伏马菌素后菌体的生长状况

Table 5. Growth of the strain ZJ8 bound to FB₁ and FB₂

Strains	Cell concentrations / Lg (cfu/mL)			
	Blank	FB ₁	FB ₂	FB ₁ + FB ₂
ZJ8	9.20 ± 0.51	9.02 ± 0.68	9.04 ± 0.58	8.93 ± 0.79

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ compared with viable strains.

2.7 植物乳杆菌吸附伏马菌素机制的研究

由表 6 可知, 植物乳杆菌 ZJ8 除去胞外多糖后与未处理相比, 对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率并未发生显著变化, 这说明胞外多糖对两株乳杆菌吸附伏马菌素的能力影响不大。

表 6. 菌体不同成分的吸附率

Table 6. The binding ability of different cellular components

Substance	FB ₁ -binding rate/ %	FB ₂ -binding rate/ %
Normal cells	89.9 ± 1.78	95.0 ± 1.76
Cells removed EPS	87.8 ± 1.94	93.4 ± 1.80
Spheroplasts	7.1 ± 1.52	18.6 ± 1.34
Cell-free extract	4.5 ± 0.91	7.4 ± 1.16
Cell wall	96.8 ± 1.46	100
Teichoic acids	8.3 ± 1.74	12.7 ± 2.45
Peptidoglycans	98.4 ± 0.47	100

菌株 ZJ8 的无细胞提取物对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率都很低,仅有 4.5% 和 7.4%。其原生质体对 FB₁ 和 FB₂ 也具有较低的吸附率,分别为 7.1% 和 18.6%;可能是菌株的原生质体表面的膜磷脂有一定的吸附位点。但菌株 ZJ8 的细胞壁对伏马菌素的吸附率极高,对 FB₁ 的吸附高达 96.8%;而对于 FB₂ 来说,培养液中根本无法检测到 FB₂ 的存在,吸附率达到 100%。因此,说明菌体吸附伏马菌素起主要作用是菌体的细胞壁。

由菌体细胞提取细胞壁,再到纯化肽聚糖的过程中,逐步去除了杂蛋白、磷壁酸、脂类等物质。植物乳杆菌 ZJ8 的胞壁肽聚糖对伏马菌素吸附率最高,分别高达 98.4% 和 100%;菌体细胞壁中另一重要成分磷壁酸对于伏马菌素的吸附能力较差,仅达 8.3% 和 12.7%。因此,对伏马菌素吸附起主要作用的是菌体细胞壁上的肽聚糖。

3 结论和展望

本实验对 13 株菌株吸附伏马菌素 B₁ 和 B₂ 的效果进行检测表明,不同菌株间表现出不同的吸附率,且菌株对 FB₂ 的吸附率明显高于对 FB₁ 的吸附率。所有供试菌株中,植物乳杆菌 ZJ8 对伏马菌素 B₁ 和 B₂ 具有较高的吸附效果,分别达到 89.9% 和 95.0%。并且植物乳杆菌 ZJ8 对 FB₁ 和 FB₂ 的吸附没有交互作用发生,FB₁ 和 FB₂ 的结合位点不同,无竞争性抑制。菌株 ZJ8 对 FB₂ 吸附后的稳定性要高于对 FB₁ 吸附后稳定性。

在与伏马菌素的共培养过程中,时间、温度、pH 处理均能不同程度地影响植物乳杆菌 ZJ8 吸附 FB₁ 和 FB₂ 的效果。其中,延长培养时间会促进菌株 ZJ8 的 FB₁ 和 FB₂ 吸附效果,pH 4 时菌株 ZJ8 的

FB₁ 和 FB₂ 的吸附率最大,高温不利于菌株 ZJ8 吸附伏马菌素。

经热灭活处理后,菌株的吸附率未发生显著变化,这说明菌体细胞对伏马菌素的吸附作用与其活力无关,并非生理代谢作用所引起。经过强酸、TCA 处理后,菌体对伏马菌素的吸附率都会提高,其中,酸处理会破坏多糖糖苷键,释放单糖,进一步产生醛基。同时,酸处理还会破坏蛋白质及多肽中的硫胺键,产生肽段释放氨基酸。这使细胞壁肽聚糖层的交联度降低,出现“小孔”,增加了伏马菌素与细胞壁甚至是细胞膜相互作用的机会^[19],而完整菌体细胞是不可能实现的。SDS 能够去除细胞表面的蛋白成分。因此,SDS 处理后蛋白脱落的位置,可能成为了新的吸附位点。细胞壁作为菌株 ZJ8 吸附伏马菌素的主要结构,其 FB₁ 和 FB₂ 的吸附率分别高达 96.8% 和 100%。进一步的工作表明,植物乳杆菌 ZJ8 细胞壁成分中的肽聚糖具有很高的 FB₁ 和 FB₂ 吸附率,分别为 98.4% 和 100%,这说明菌体细胞壁上的肽聚糖是吸附伏马菌素 B₁ 和 B₂ 的最主要成分。

近年来,乳酸菌在抗肿瘤、抗突变和提高机体免疫力等方面的研究不断增加,逐渐获得了广泛认可。作为生物方法之一,在国内运用乳杆菌去除伏马菌素本研究尚属首例,且筛选出来的植物乳杆菌菌株 ZJ8 来源于酸面团材料,为食源性乳酸菌,未来可以以此研发出相关乳酸菌制品,在肠道内吸附伏马菌素,从而降低乃至消除伏马菌素对人和动物的危害。

参考文献

- [1] Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(7): 1806-1811.
- [2] Mogensen JM, Larsen TO, Nielsen KF. Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B₂ in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 4853-4857.
- [3] Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 1990, 57:269-275.
- [4] Harrison LR, Colvin BM, Greene JT. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a

- toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1990, 2 (3) : 217-221.
- [5] Niderkorn V, Morgavi DP, Pujos E. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(4) : 406-415.
- [6] Niderkorn V, Boudra H, Morgavi DP. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101, 849-856.
- [7] Romina P, Mario A, Ana M. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 156, 214-221.
- [8] Lin W, Pei Y, Dong W. Determination of fumonisins B₁ in corn by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 2004, 23(1) : 15-17. (in Chinese)
林维宣, 裴轶君, 董伟峰. 固相萃取-高效液相色谱法测定玉米中伏马毒素 B₁. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(1) :15-17.
- [9] Quan Y, Wang S, Han Y, Zhang Y, Wang J. Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B₁ and B₂ in Corn. *Food and Fermentation industries*, 2005, 31 (8) : 87-90. (in Chinese)
权英, 王硕, 韩英素, 张燕, 王俊平. 高效液相色谱法检测玉米中的伏马毒素 B₁ 和 B₂. 食品与发酵工业, 2005, 31(8) :87-90.
- [10] Ross PF, Rice LG, Plattner RD, Osweiler GD, Wilson TM, Owens DL, Nelson HA, Richard JL. Concentrations of fumonisin B₁ in feed associated with animal health problems. *Mycopathologia*, 1991, 114: 129-135.
- [11] Ma L, Yuan C, Shi W, Dai Y, Huang K. Determination of fumonisins in puffed corn products by HPLC. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2010, 26 (1) : 88-91. (in Chinese)
马丽艳, 袁长梅, 石文婷, 戴蕴青, 黄昆仑. 高效液相色谱法测定膨化玉米制品中的伏马菌素 FB₁ 和 FB₂. 上海农业学报, 2010, 26(1) :88-91.
- [12] El-Nezami H, Polychronaki N, Salminen S, Mykkanen H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (7) : 3545-3549.
- [13] Hernandez MA, Guzman PD, Garcia HS. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 395-403.
- [14] Yamaoto Y, Higuchi M, Poole LB. Identification of a new gene response for the oxygen tolerance in aerobic life of *Streptococcus mutans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64 (5) :1106-1109.
- [15] Liu J, Cai D, Sun T. Extraction of peptidoglycan in *Lactobacillus acidophilus* cell wall. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2008, 30 (4) : 605-609. (in Chinese)
刘景圣, 蔡丹, 孙涛. 嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4) :605-609.
- [16] Zhao HF, Zhou F, Qi YQ, Piotr D, Bai FL, Piotr W, Zhang BL. Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to bind Benzo(a) pyrene and the mechanism of the process. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59: 67-71.
- [17] Han P, Tan H, Wan S, Guo H, Guo X, Luo Y. Studies on protoplasts preparation and regeneration condition of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 10 (1) : 10-18. (in Chinese)
韩璞, 田洪涛, 苑社强, 郭红敏, 郭兴华, 罗云波. 罗伊氏乳杆菌原生质体的制备与再生条件的研究. 中国食品学报, 2010, 10(1) :10-18.
- [18] Zinedine A, Faïd M, Benlemlih M. In vitro reduction of aflatoxin B₁ by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2005, 1 (7) : 67-70.
- [19] Qie Y, Zhang J, Pan X, Pei J, Zhang B. Binding of benzo (a) pyrene by *Lactobacilli* strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (7) : 956-964. (in Chinese)
漆叶琼, 张佳涛, 潘向辉, 裴家伟, 张柏林. 乳杆菌吸附苯并芘的特性. 微生物学报, 2011, 51(7) :956-964.

Absorption of fumonisin B₁ and B₂ by *Lactobacillus plantarum* ZJ8

Jun Zhang¹, Yafei Qiao¹, Xiao Wang², Jiawei Pei¹, Junyu Zheng², Bolin Zhang^{2*}

¹College of Food Science & Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China

²School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Objective] We studied the ability of *Lactobacillus plantarum* ZJ8 to bind fumonisins FB₁ and FB₂. [Methods] The percentage of FB₁ and FB₂ bound by the strain was measured by HPLC after bacterial cells and FB₁ and FB₂ were co-incubated in MRS media at 37°C for 4 h. [Results] The percentage of FB₁- and FB₂-binding was 89.9% and 95.0%, respectively. The FBs-binding rate of strain ZJ8 reached the maximum at pH 4. Binding of FBs was poor under alkaline conditions and high temperatures. After acid and SDS treatment, the FBs-binding rate significantly increased. The percentage of FB₁- and FB₂-binding was 96.8% and 100% for the cell walls of strain ZJ8, respectively. Moreover, about 96.8% FB₁ and 100% FB₂ was bound to the peptidoglycan of strain ZJ8's cell walls. [Conclusions] *L. plantarum* ZJ8 has potential to remove fumonisins. The peptidoglycan of cell walls from strain ZJ8 was proved to be the main site of FBs-binding.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, fumonisins FB₁, fumonisins FB₂, binding

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2008AA10Z335)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62336154; E-mail: zhangbolin888@163.com

Received: 17 March 2014/ Revised: 28 May 2014

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。