

黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的分离鉴定、发酵条件的优化及活性组分分析

陈毅保, 刘昆仑, 杨趁仙, 李 艳, 李天赐, 贾叶萍, 张微漾

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为筛选出一株高效降解黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的菌株, 选取土壤为菌株来源, 进行富集培养, 经过以香豆素为唯一碳源的初筛和添加 AFB₁ 的复筛后, 对筛选得到的各菌株进行 16S rDNA 鉴定, 比对其测序结果, 选取降解 AFB₁ 最高的菌株, 探究发酵时间、发酵温度、初始 pH、接种量、培养基对菌株降解 AFB₁ 的影响规律, 通过正交试验优化发酵条件, 并对降解方式进行初步探索。结果表明: 经过初筛和复筛得到 7 株能够降解 AFB₁ 的菌株, 经鉴定均为伯克霍尔德菌属, 其中 *Burkholderia* sp. D6 的 AFB₁ 降解率最高; 最优发酵条件为以 LB 培养基为发酵培养基、发酵时间 84 h、发酵温度 37 °C、初始 pH 7.0、接种量 10%, 在此条件下 *Burkholderia* sp. D6 对 AFB₁ 的降解率为 (87.91 ± 2.32)%; 初步判断降解 AFB₁ 的活性组分是蛋白质或者酶。综上, 通过筛选得到了一种能够高效降解 AFB₁ 的菌株, 蛋白质或酶参与了 AFB₁ 的降解。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 伯克霍尔德菌; 降解

中图分类号: TS201.6; X172

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)01-0120-07

Isolation and identification of aflatoxin B₁ - degrading strains, optimization of fermentation conditions and analysis of active components

CHEN Yibao, LIU Kunlun, YANG Chenxian, LI Yan, LI Tianci,
JIA Yeping, ZHANG Weiyang

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to screen a strain that can efficiently degrade aflatoxin B₁ (AFB₁), soil was selected as the source of screening bacteria for enrichment culture. After preliminary screening with coumarin as the only carbon source and rescreening with AFB₁ added, and 16S rDNA identification was performed on the selected strains, and their sequencing results were compared. The strain with the highest degradation rate of AFB₁ was selected, the effects of fermentation time, fermentation temperature, initial pH, inoculation amount, and medium on the degradation rate of AFB₁ were studied, the fermentation conditions were optimized by orthogonal experiment, and the degradation method was preliminarily explored. The results showed that 7 strains capable of degrading AFB₁ were screened by preliminary screening and rescreening, which were identified as *Burkholderia* sp., and *Burkholderia* sp. D6 had the highest degradation rate of AFB₁. The optimal fermentation conditions were obtained as follows: LB fermentation medium, fermentation time 84 h, fermentation temperature 37 °C, initial pH 7.0, inoculation amount 10%. Under

these conditions, the degradation rate of AFB₁ was (87.91 ± 2.32)%. It was preliminarily judged that the active substance for degrading AFB₁ was protein or enzyme. In conclusion, a strain capable of efficiently degrading AFB₁ is screened, and protein or enzyme are involved in the degradation of AFB₁.

收稿日期: 2022-10-25; 修回日期: 2023-10-11

基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(222102110112); 国家自然科学基金(32202079); 河南工业大学博士基金(2019BS029)

作者简介: 陈毅保(1998), 男, 在读硕士, 研究方向为蛋白质化学与应用(E-mail) yibaoc998@163.com。

通信作者: 杨趁仙, 讲师, 博士(E-mail) yexyou@163.com。

Key words: aflatoxin B₁; *Burkholderia* sp.; degradation

黄曲霉毒素(AFT)是由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生的次级有毒产物,有很强的致癌、致畸和致突变性,其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)最稳定,毒性最强,其毒性是砒霜的 60 多倍,被列为 1 类致癌物质^[1]。动物食用被 AFB₁污染的饲料后,轻则出现食欲减退、恶心、呕吐等不良反应,影响产奶量和产蛋量,严重时还会导致昏迷、抽搐甚至死亡。AFB₁通过食物链的传导,对人体也有很大的伤害,它会引起肝脏功能衰竭,增加患癌症风险,长期接触小剂量的 AFB₁会导致慢性中毒^[2]。在合适的环境下,产毒真菌可以不断地产生有毒物质,在食品生产和贮存中, AFT 的污染难以避免^[3]。粮食在收割和后期加工过程中受气候、地域等因素的影响,容易受到霉菌的侵染,造成重大的经济损失^[4-6]。在饲料行业,常会因为类似的原因导致饲料受到污染,对动物的生命健康造成危害^[7]。根据联合国粮食及农业组织的统计,每年霉菌毒素污染的粮食约占全球粮食总量的 25%,造成的经济损失高达上千亿美元^[8]。粮食及饲料中 AFT 的污染问题,严重影响了我国农业、畜牧业及饲料行业的健康发展。因此,如何有效去除 AFT 已成为未来重要的研究发展方向。

AFT 的脱除方法分为物理法、化学法和生物法,物理法和化学法存在污染环境、成本高、降低食品的营养价值等缺点^[9],因此利用微生物降解食品或饲料中的 AFT 越来越受青睐。研究发现,微生物降解毒素的方式主要包括两个方面:一是利用微生物的次级产物如酶降解 AFT,得到无毒或低毒产物;二是微生物自身对 AFT 产生吸附作用,实现 AFT 的可逆脱除。Khanafari 等^[10]利用植物乳杆菌 PTCC1058 处理含 0.24 mg/kg AFB₁的玉米样品,在 37 °C 下培养 7 d 后,AFB₁的降解率达到 77%。阴佳璐等^[11]研究证明,浑浊红球菌 PD630 可以降解 AFB₁,在优化条件下其对 AFB₁的降解率高达 93.24%,且该菌的培养上清液对 AFB₁的降解率为 81.67%,表明该降解过程可能与微生物的分泌物有关。目前已发现多种菌株对 AFB₁具有降解能力,如芽孢杆菌属、假单胞菌属、非产毒曲霉等,但关于伯克霍尔德菌降解 AFB₁的报道却很少。基于此,本研究筛选能高效降解 AFB₁的菌株,丰富菌株资源,并对降解方式进行初步探索,以期对 AFB₁的高效脱除奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

土壤,河南省舞钢市花生地采集; AFB₁标准品(纯度 > 98%); 甲醇、乙腈为色谱级; 香豆素为分析纯; DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司。

初筛液体培养基: KH₂PO₄ 0.25 g, FeCl₃ · 6H₂O 0.003 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.005 g, 纯水 1 000 mL, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min 后加入 40 μL 1 mg/mL 香豆素 - 乙醇溶液。

香豆素初筛平板: (NH₄)₂SO₄ 5 g, KH₂PO₄ 2.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 2.05 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.5 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.106 g, 琼脂 23 g, 纯水 1 000 mL, pH 6.0, 灭菌后加入 40 μL 1 mg/mL 香豆素 - 乙醇溶液。

NB 培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 纯水 1 000 mL, pH 7.0。

LB 培养基: NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 纯水 1 000 mL。

TB 培养基: 酵母粉 24 g, 蛋白胨 12 g, 甘油 4 mL, KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 9.4 g, 纯水 1 000 mL。

MRS 培养基: 牛肉膏 5 g, 酵母粉 4 g, 葡萄糖 20 g, 吐温 - 80 1 mL, K₂HPO₄ 2 g, 乙酸钠 5 g, 柠檬酸三铵 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.05 g, 纯水 1 000 mL, pH 6.2。

PBS 缓冲液: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.49 g, pH 7.4。

1.1.2 仪器与设备

e2695 型高效液相色谱仪, YT - CJ - 1ND 型超净工作台, MLS - 3750 高压蒸汽灭菌锅, ZD - 85A 型气浴恒温振荡器, JY92 - II N 超声波细胞粉碎机, GL - 20C 高速冷冻离心机。

1.2 试验方法

1.2.1 AFB₁高效降解细菌的分离和筛选

初筛: 取 10 g 土壤加入 100 mL 无菌水中, 用玻璃珠打散, 37 °C 振荡 2 h 得到细菌悬液, 取 10% 的细菌悬液接种到 LB 培养基中, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 1 d 后得到细菌富集液。取 10% 的细菌富集液接种到含有香豆素的初筛液体培养基中, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 5 d。用无菌 PBS 缓冲液稀释细菌培养液 (10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵), 分别吸取 20 μL 稀释液涂布于香豆素初筛平板上, 37 °C 培

养 5 d, 选取生长良好的单菌株连续 3 次划线于香豆素初筛平板上, 纯化菌株。

复筛: 将纯化的单菌株接种到 LB 培养基, 37 °C、160 r/min 下过夜培养, 得到种子液, 以 10% 的接种量吸取种子液到 NB 培养基, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 2 d 得到发酵液。取 200 μ L 质量浓度为 1 mg/L AFB₁ 标准溶液于灭菌的 10 mL EP 管中, 另加 800 μ L 发酵液, 混匀, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 3 d。对照组用 800 μ L 无菌发酵培养基与 200 μ L 1 mg/L AFB₁ 溶液混合, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 3 d。测定培养液中 AFB₁ 的含量, 计算 AFB₁ 降解率。

1.2.2 AFB₁ 含量的测定

参照 GB 5009.22—2016 测定 AFB₁ 含量。样品经 0.22 μ m 有机相滤膜过滤后进样。液相色谱条件: C18 色谱柱; 激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm; 流动相为甲醇-乙腈-水(体积比 2:2:6); 流速 1 mL/min; 柱温 30 °C; 运行时间 14 min; 进样量 20 μ L。

1.2.3 菌株鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取出 DNA 后进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送至上海生物工程有限公司测序。将拼接后的序列在 NCBI 网站 [National Center for Biotechnology Information (nih.gov)] 进行 BLAST 比对分析。

1.2.4 菌株生长曲线的测定

从平板上挑取单菌落接入 LB 培养基, 37 °C、160 r/min 下振荡培养, 每隔一定时间在 600 nm 下测定吸光度 (OD₆₀₀ 值), 通过 OD₆₀₀ 值评估细胞浓度, 监测细菌的生长情况。

1.2.5 发酵条件的优化

以一定的接种量吸取培养的种子液到发酵培养基中, 在一定温度、160 r/min 下振荡培养 2 d 得发酵液。取 200 μ L 质量浓度为 1 mg/L AFB₁ 溶液于灭菌的 10 mL EP 管中, 另加 800 μ L 发酵液, 混匀, 在一定温度、160 r/min 下振荡培养一定时间, 测定 AFB₁ 含量, 计算 AFB₁ 降解率。

1.2.6 AFB₁ 降解方式的研究

1.2.6.1 物理吸附和生物降解的研究

取 10 mL AFB₁ 降解率最高的菌株发酵液于 4 °C、5 000 r/min 条件下离心 15 min, 收集上清液备用; 将发酵液离心沉淀使用无菌超纯水洗涤 3 次, 加入 10 mL 生理盐水重悬菌体, 制备菌悬液; 分别向 800 μ L 发酵液、上清液和菌悬液中加入 200 μ L 1 mg/L 的 AFB₁ 标准溶液, 同时以 800 μ L 无菌 LB 培

养基和 200 μ L AFB₁ 标准溶液作为空白对照, 于 37 °C、160 r/min 条件下避光振荡培养 72 h。每组处理做 3 个平行, 试验重复 2 次, 测定 AFB₁ 含量, 计算 AFB₁ 降解率。

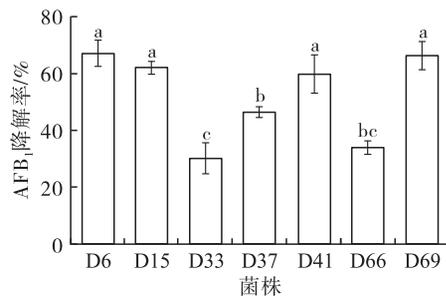
1.2.6.2 降解 AFB₁ 的活性组分理化性质的研究

分别吸取 5 mL AFB₁ 降解率最高的菌株发酵后的上清液进行热处理(沸水中加热 30 min 后恢复至室温)、蛋白酶 K 处理(终质量浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K, 55 °C 处理 2 h) 和蛋白酶 K + SDS 处理(终质量浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K + 1% SDS, 55 °C 处理 2 h)。分别向 800 μ L 处理样品中加入 200 μ L 1 mg/L AFB₁ 标准溶液, 同时以 800 μ L 无菌 LB 培养基和 200 μ L AFB₁ 标准溶液作为空白对照, 37 °C、160 r/min 下振荡培养 72 h。每组处理做 3 个平行, 试验重复 2 次, 测定 AFB₁ 含量, 计算 AFB₁ 降解率。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

由香豆素初筛平板初步筛选获得 18 株生长状态良好的菌株, 加入 AFB₁ 标准溶液进行复筛后得到 7 株可有效降解 AFB₁ 的菌株, 分别为 D6、D15、D33、D37、D41、D66、D69, 结果如图 1 所示。



注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 1 菌株筛选结果

由图 1 可知, D6 对 AFB₁ 降解率最高, 达到 66.93%, 因此选择 D6 进行后续试验。

2.2 菌株鉴定

将筛选得到的 7 株菌株进行 16S rDNA 测序, 序列结果在 NCBI 数据库中进行比对, 结果如表 1 所示。

表 1 筛选菌株的鉴定结果

菌株	相似菌株	相似率/%
D6	<i>Burkholderia territorii</i> strain S2	99
D15	<i>Burkholderia cenocepacia</i> strain Z6	99
D33	<i>Burkholderia contaminans</i> strain CN10	99
D37	<i>Burkholderia</i> sp. DOP - Ma3	99
D41	<i>Burkholderia contaminans</i> strain CN10	99
D66	<i>Burkholderia contaminans</i> strain HA09	99
D69	<i>Burkholderia contaminans</i> strain HA09	99

由表1可知,根据得到的相似率达99%的菌株,初步推断7株菌株均为伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)细菌。*Burkholderia* sp. D6序列已上传至Genbank,序列号为SUB11770381 D6-16S ON945598。

2.3 *Burkholderia* sp. D6 菌株生长曲线

Burkholderia sp. D6 菌株的生长曲线见图2。

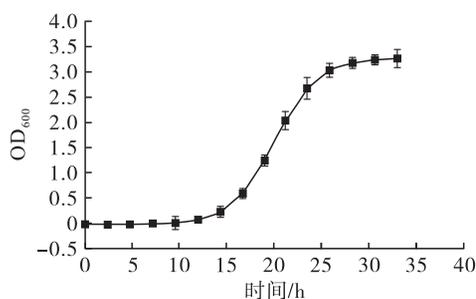


图2 *Burkholderia* sp. D6 菌株的生长曲线

由图2可知,*Burkholderia* sp. D6 菌株在18 h时达到对数生长期,24 h进入停滞期。因此,将*Burkholderia* sp. D6 菌株接入LB培养基培养18 h得到种子液,再将种子液接入NB培养基,以提高菌株对AFB₁的降解效率,进行后续发酵条件优化。

2.4 发酵条件优化的单因素试验

2.4.1 发酵时间对菌株降解 AFB₁ 的影响

在NB培养基、接种量10%、发酵温度37℃条件下,考察发酵时间对菌株降解AFB₁的影响,结果见图3。

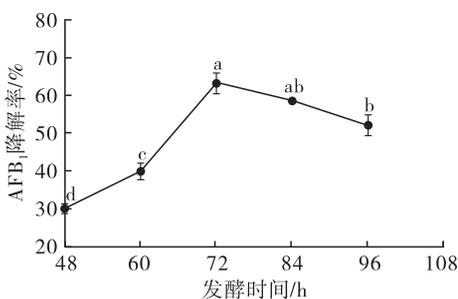


图3 发酵时间对菌株降解 AFB₁ 的影响

由图3可知,随着发酵时间从48 h延长到72 h, D6对AFB₁的降解率呈现上升的趋势,72 h时, AFB₁降解率达到最高,继续延长发酵时间, AFB₁降解率降低。这一趋势与张文双等^[12]分离出的地衣芽孢杆菌降解AFB₁的结果相似。微生物具有一定的生长繁殖周期,随发酵时间延长,细菌进入对数生长期,生长迅速,积累越来越多的代谢产物。72 h后细菌进入衰亡期,其形态发生显著变化,发生衰退或自溶,存活率下降,致使其吸附降解AFB₁的能力减弱。故选择发酵时间72 h进行进一步研究。

2.4.2 发酵温度对菌株降解 AFB₁ 的影响

在NB培养基、接种量10%、发酵时间72 h条件下,考察发酵温度对菌株降解AFB₁的影响,结果见图4。

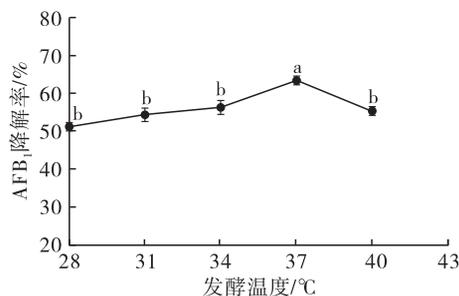


图4 发酵温度对菌株降解 AFB₁ 的影响

由图4可知,随着发酵温度从28℃升高到37℃, D6对AFB₁的降解率呈现上升的趋势,37℃时, D6对AFB₁的降解率达到最高,40℃时反而下降。其原因可能是温度影响细菌分泌酶的活性和细菌细胞膜的通透性,进而影响菌株的生长繁殖和降解AFB₁的能力^[13]。刘亚楠等^[13]研究表明,在28~40℃范围内枯草芽孢杆菌对AFB₁的降解率先升高后降低,并在37℃达到最大。刘畅等^[14]研究表明,重组表达的多铜氧化酶降解黄曲霉毒素的最佳发酵温度也为37℃。故选择发酵温度37℃进行进一步研究。

2.4.3 初始 pH 对菌株降解 AFB₁ 的影响

用1 mol/L KOH调整NB培养基pH分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,在接种量10%、发酵时间72 h、发酵温度37℃条件下,考察初始pH对菌株降解AFB₁的影响,结果见图5。

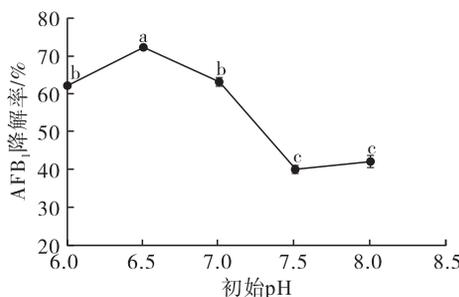


图5 初始 pH 对菌株降解 AFB₁ 的影响

由图5可知,培养基的初始pH对AFB₁降解效果有较大影响。随着初始pH从6.0升高到6.5, D6对AFB₁的降解能力呈现上升的趋势,在pH为6.5时, D6的AFB₁降解率达到最高, pH从6.5升高到8.0时, AFB₁降解率反而下降。其原因可能是pH影响酶活性、膜电荷、膜结构稳定性以及微生物对培养基中营养成分的吸收等,进而影响微生物的生长速率^[15]。在pH为6.5时D6的AFB₁降解率最高,

pH 为 7.0 或 7.5 时 AFB₁ 降解率偏低,说明偏碱性条件不利于 D6 的生长。故选择 pH 6.5 进行进一步研究。

2.4.4 接种量对菌株降解 AFB₁ 的影响

在 NB 培养基、发酵时间 72 h、发酵温度 37 °C 条件下,考察接种量对菌株降解 AFB₁ 的影响,结果见图 6。

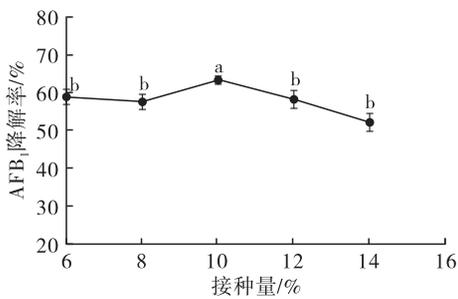


图 6 接种量对菌株降解 AFB₁ 的影响

由图 6 可知,在接种量 6% 和 8% 时,AFB₁ 降解率变化平缓,接种量为 10% 时 AFB₁ 降解率达到最高值,继续加大接种量,D6 降解 AFB₁ 的能力下降。过低的菌株浓度会延长发酵过程的适应期,增加能耗和杂菌污染的风险。过高的菌株浓度可能导致营养物质被大量消耗,致使产物合成阶段营养物质不足,容易造成菌体“早衰”或“自溶”^[16]。不同的菌种生长状况及繁殖能力不同,初始接种浓度也会有差异,如张文双^[12]、刘亚楠^[13]等研究发现,芽孢杆菌在接种量在 5% 时 AFB₁ 降解率达到最高。综合考虑,选择接种量 10% 进行进一步研究。

2.4.5 培养基条件对菌株降解 AFB₁ 的影响

在发酵时间 72 h、发酵温度 37 °C、接种量 10% 条件下,考察培养基对菌株降解 AFB₁ 的影响,结果如图 7 所示。

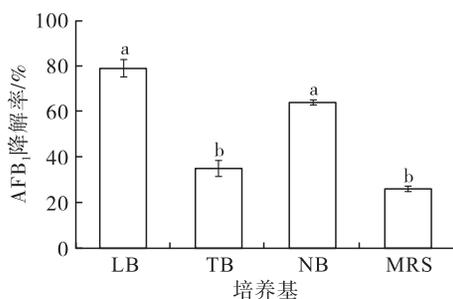


图 7 培养基对菌株降解 AFB₁ 的影响

由图 7 可知,在 LB 培养基中 D6 对 AFB₁ 的降解率最高,达到 79.13%,远高于其他组。NB 培养基对 AFB₁ 的降解效果次之,MRS 培养基的效果最差。这与张杨杨^[17]的研究结果一致,其原因可能是 TB 和 MRS 培养基中的一些成分影响菌株的生长进而影响对 AFB₁ 的降解。因此,综合考虑选择 LB 培

养基为后续优化发酵条件所用培养基。

2.5 发酵条件优化的正交试验

选择 LB 培养基,以发酵时间、发酵温度、初始 pH、接种量为试验因素,根据单因素试验结果,每个因素选取 3 个水平,选用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验,优化 D6 的发酵条件。正交试验因素与水平如表 2 所示,正交试验设计及结果如表 3 所示。

表 2 正交试验因素与水平

水平	A 发酵时间/h	B 发酵温度/°C	C 初始 pH	D 接种量/%
1	60	28	6.0	8
2	72	37	6.5	10
3	84	40	7.0	12

表 3 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	AFB ₁ 降解率/%
1	1	1	1	1	63.87
2	1	2	2	2	71.31
3	1	3	3	3	57.88
4	2	1	2	3	62.12
5	2	2	3	1	81.71
6	2	3	1	2	70.31
7	3	1	3	2	77.69
8	3	2	1	3	78.84
9	3	3	2	1	69.29
K ₁	193.06	203.68	213.02	214.87	
K ₂	214.14	231.86	202.72	219.31	
K ₃	225.82	197.48	217.28	198.84	
R	10.92	11.46	4.85	6.82	

由表 3 可知,各因素对 AFB₁ 降解率的影响大小依次为发酵温度 > 发酵时间 > 接种量 > 初始 pH,最佳因素水平组合为 A₃B₂C₃D₂,即发酵时间 84 h、发酵温度 37 °C、初始 pH 7.0、接种量 10%,在此条件下进行 3 次平行试验验证,得到 AFB₁ 平均降解率为 (87.91 ± 2.32)%。Burkholderia sp. D6 在 AFB₁ 降解菌中具有一定的优势,如从土壤中筛选出的链霉菌 GDAAS003 的上清液对 50 μg/L AFB₁ 降解 96 h 降解率为 90.50%^[18],仅略高于本研究菌株 Burkholderia sp. D6 对 200 μg/L AFB₁ 的降解率,而链霉菌 GDAAS003 的上清液对 100 μg/L AFB₁ 降解 96 h 降解率仅为 75.68%^[18]。解淀粉芽孢杆菌 Y1-B1(72 h,85.96%)^[17]、铜绿假单胞菌 A6(72 h,85.69%)^[19]、假单胞菌 M8(72 h,71.8%)^[20]、克雷伯氏菌(72 h,74%)^[21]等与本研究菌株降解 AFB₁ 的能力相当。

2.6 AFB₁ 降解方式的研究

2.6.1 物理吸附和生物降解的分析

物理吸附作用是指由细菌细胞壁或者细胞壁的

主要成分如多糖、肽聚糖等对 AFB₁ 的吸附作用,主要是范德华力起作用,是一个可逆的过程。生物降解是微生物在其生命活动中产生的某些物质,改变了霉菌毒素的原有结构,将其转化为低毒甚至无毒的物质^[9]。发酵液、上清液和菌悬液对 AFB₁ 的降解率见图 8。

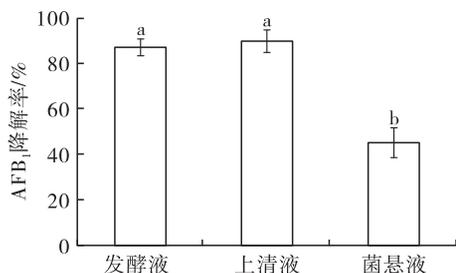


图 8 发酵液、上清液和菌悬液对 AFB₁ 的降解率

由图 8 可知:发酵液和上清液的效果几乎相当,对 AFB₁ 的降解率分别为 87.91% 和 89.12%,没有显著性差异($p > 0.05$);上清液的降解率远高于菌悬液。因此,初步判断 D6 对 AFB₁ 的降解效果主要是由胞体分泌到上清液中的物质起作用,生物降解起主导作用。郭钰婷^[22]研究发现,铜绿假单胞菌上清液组和细胞悬浮液组对 AFB₁ 的降解率分别为 60.96% 和 31.86%,判断该细菌可能存在两条毒素脱除途径:一是上清液中存在活性降解物质,二是菌体有一定的吸附作用。李超波等^[23]研究菌体对于 AFB₁ 是降解还是吸附作用时发现,细菌菌体对 AFB₁ 去除率远高于上清液,之后经过对菌体热处理和毒素洗脱实验,证明菌株是有吸附降解活性的。

2.6.2 降解 AFB₁ 的活性组分的理化性质

对 D6 上清液进行不同处理,测定其对 AFB₁ 降解效果的影响,结果如图 9 所示。

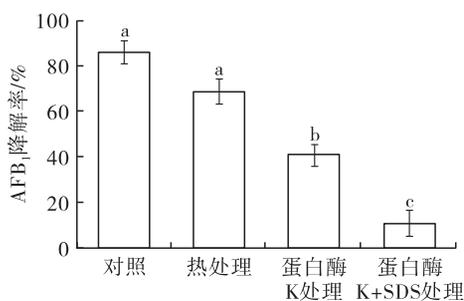


图 9 不同处理下上清液对 AFB₁ 的降解率

由图 9 可知,经过热处理后的上清液 AFB₁ 降解率为 68.76%,与对照组相比有所降低,但差异不显著($p > 0.05$)。这表明上清液中的活性物质可能具有一定的热稳定性。经过蛋白酶 K 和蛋白酶 K + SDS 处理后,AFB₁ 降解率分别为 41.18% 和 6.12%,降解率明显下降。其他 AFB₁ 降解菌中也发现了类

似的结果,如耐盐性嗜盐四方球菌^[24]、荧光假单胞菌铜^[25]、铜绿假单胞菌^[19]。本研究中,蛋白酶 K 处理的培养物上清液中 AFB₁ 降解活性较低,而蛋白酶 K + SDS 处理后,培养物上清液中 AFB₁ 降解活性几乎被完全破坏。因此,初步推断降解 AFB₁ 的活性组分可能是蛋白质或者酶。刘亚楠等^[13]研究表明,蛋白酶 K 处理枯草芽孢杆菌后,AFB₁ 降解率降低了 5.05%,SDS 处理后,AFB₁ 降解率显著降低了 36.72% ($p < 0.05$),初步推测培养物上清液降解 AFB₁ 的活性组分是蛋白质或者酶。Sangare 等^[26]研究发现,蛋白酶 K 和蛋白酶 K + SDS 处理显著降低了培养物上清液对 AFB₁ 的降解活性,初步判断是蛋白质或者酶参与 AFB₁ 的降解。

3 结论

本研究筛选出了一株对 AFB₁ 有良好降解能力的菌株 *Burkholderia* sp. D6,该菌株以 LB 培养基为发酵培养基,在发酵时间 84 h、发酵温度 37 °C、初始 pH 7.0、接种量 10% 的条件下,对 AFB₁ 的降解率为 (87.91 ± 2.32)%,并且初步判断降解 AFB₁ 的活性物质是蛋白质或者酶。该研究丰富了 AFB₁ 降解菌株资源库,初步探索了菌株降解黄曲霉毒素的途径,为后续降解机制研究及其工业化应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] DORNER J W, COLE R J, BLANKENSHIP P D. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts[J]. *Biol Control*, 1998, 12(3): 171-176.
- [2] 庞惠萍,丁泽,苏娜,等. 黄曲霉毒素 B₁ 致肝脏损伤的机制[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(12): 110-113.
- [3] HOVE M, VAN POUCKE C, NJUMBE-EDIAGE E, et al. Review on the natural co-occurrence of AFB₁ and FB₁ in maize and the combined toxicity of AFB₁ and FB₁ [J]. *Food Control*, 2016, 59: 675-682.
- [4] MOUSAVI KHANEGHAH A, EŞ I, RAEISI S, et al. Aflatoxins in cereals: State of the art[J/OL]. *J Food Saf*, 2018, 38(6): 12532[2022-10-25]. <https://doi.org/10.1111/jfs.12532>.
- [5] 丁小霞. 中国产后花生黄曲霉毒素污染与风险评估方法研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [6] 马慧慧. 寄生曲霉菌在不同饲料原料中产生黄曲霉毒素 B₁ 的差异性及其机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [7] 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.

- [8] SARMA U P, BHETARIA P J, DEVI P, et al. Aflatoxins: Implications on health[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2017, 32(2): 124 – 133.
- [9] 陈毅保, 杨趁仙, 刘昆仑, 等. 黄曲霉毒素 AFB₁ 的脱除及其机制研究进展[J/OL]. *中国油脂*, 2022: 1 – 15 [2022 – 10 – 25]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.TS.20220615.1127.012.html>.
- [10] KHANAFARI A, SOUDI H, MIRABOULFATHI M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production in corn[J]. *Iran J Environ Health Sci Eng*, 2007, 4(3): 163 – 168.
- [11] 阴佳璐, 唐语谦, 任杰, 等. 浑浊红球菌 PD630 对黄曲霉毒素 B₁ 的生物降解特性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(2): 39 – 46.
- [12] 张文双, 孟宇飞, 胡申才. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(8): 143 – 148.
- [13] 刘亚楠, 彭丹丹, 王敏, 等. 枯草芽孢杆菌 Q125 降解黄曲霉毒素 B₁ 发酵条件优化及活性物质分析[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(4): 9 – 15.
- [14] 刘畅, 马现永, 马三梅, 等. 降解黄曲霉毒素 B₁ 的乳酸片球菌重组多铜氧化酶学性质[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(13): 72 – 78.
- [15] 董慧燕, 许艳华, 牛永武, 等. 铜绿假单胞菌 M4 菌株降解黄曲霉毒素 B₁ 的条件优化研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(3): 50 – 57.
- [16] 孙丰芹. 固态发酵法去除花生粕中的黄曲霉毒素 B₁ [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2010.
- [17] 张杨杨. 降解黄曲霉毒素 B₁ 解淀粉芽孢杆菌的筛选及其毒素降解活性产物分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- [18] 邓盾, 唐嘉虹, 王永飞, 等. AFB₁ 降解菌的分离鉴定、降解条件优化及降解产物毒性评估[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(3): 596 – 606.
- [19] 徐阳. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选及其活性酶的纯化[D]. 南京: 南京理工大学, 2019.
- [20] 于丽娜, 王明清, 张初署, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选及鉴定研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 167 – 171.
- [21] 谢澳文, 樊磊, 韩一鸣, 等. 降解 AFB₁ 的克雷伯氏菌分离、鉴定及降解机理初步研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(2): 64 – 70.
- [22] 郭钰婷. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- [23] 李超波, 李文明, 杨文华, 等. 降解黄曲霉毒素微生物筛选中降解与吸附结合作用的区分[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(5): 17 – 21.
- [24] ADEBO O A, NJOBEH P B, SIDU S, et al. Aflatoxin B₁ degradation by liquid cultures and lysates of three bacterial strains[J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 233: 11 – 19.
- [25] LI J, HUANG J, JIN Y, et al. Aflatoxin B₁ degradation by salt tolerant *Tetragenococcus halophilus* CGMCC 3792 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121: 430 – 436.
- [26] SANGARE L, ZHAO Y, FOLLY Y M E, et al. Aflatoxin B₁ degradation by a *Pseudomonas* strain [J]. *Toxins*, 2014, 6(10): 3028 – 3040.

(上接第 113 页)

- [28] JAHANGEER M, MAHMOOD Z, MASHOOQ A, et al. Comparative assessment of biomedical and nutritional status of dry fruits: A review[J]. *Life Sci J Pakistan*, 2019, 1(1): 24 – 33.
- [29] RAMOS A, COESEL S, MARQUES A, et al. Isolation and characterization of a stress – inducible *Dunaliella salina* Lcy – β gene encoding a functional lycopene β – cyclase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(5): 819 – 828.
- [30] COESEL S N, BAUMGARTNER A C, TELES L M, et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for psy and pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress[J]. *Mar Biotechnol*, 2008, 10(5): 602 – 611.