

一株产赭曲霉毒素 A 黑曲霉的筛选与鉴定

张健^{1,2} 王小霞¹ 张颖³ 高强^{1*}

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(2. 天津实发中科百奥工业生物技术有限公司 天津 300462)

(3. 食品营养与安全教育部重点实验室 天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津 300457)

摘要:【目的】筛选出可产生赭曲霉毒素 A(OTA)的霉菌菌株。【方法】利用 CYA 和 YES 培养基从实验室 32 个霉菌样品中筛选目的菌株。利用高效液相色谱-荧光检测法对 OTA 产生菌进行初筛,利用高效液相色谱-质谱联用对 OTA 初筛菌株进行复筛。通过菌落形态、菌丝及分生孢子形态、ITS DNA 序列、 β -Tubulin 基因序列及 Calmodulin 基因序列分析等鉴定目的菌株。【结果】得到一株 OTA 产生菌株 1062,该菌株能在 25 °C 条件下,在 CYA、YES 和 CA 培养基中很好生长。结合形态学、对培养基的要求以及上述 3 个基因序列的进化树分析,该菌株属于黑曲霉(*Aspergillus niger*)。【结论】菌株 1062 具有 OTA 产生能力,是一株黑曲霉。

关键词: 赭曲霉毒素 A, 黑曲霉, 高效液相色谱, 质谱

Screening and identification of an ochratoxin A-producing *Aspergillus niger* strain

ZHANG Jian^{1,2} WANG Xiao-Xia¹ ZHANG Ying³ GAO Qiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin SF-Bio Industrial Bio-tec Co., Ltd., Tianjin 300462, China)

(3. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to screen the fungus strain that can produce ochratoxin A (OTA). [Methods] To this end, 32 fungal samples in our laboratory were cultivated in CYA and YES media, and screened using the high performance liquid chromatography with fluorescence detection, then rescreened using high performance liquid chromatography-mass spectrometry; According to the colony morphology, mycelial and conidia morphology as well as nucleotide sequence analysis of ITS, β -Tubulin gene and Calmodulin gene, the target strain was identified. [Results] One strain which could grow well in CYA, YES and CA media at 25 °C was selected and named as strain 1062. Strain 1062 was identified as *Aspergillus niger* species by cultural

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(No. 2012BAK17B11); 国家自然科学基金项目(No. 31201354, 31471725, 31370075); 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601599; 信箱: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-09-03; 接受日期: 2014-11-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-20

and morphological characteristics and phylogenetic analysis based on ITS rDNA, β -tubulin and Calmodulin gene sequences. [Conclusion] The strain 1062 is *A. niger* which can produce OTA.

Keywords: Ochratoxin A, *Aspergillus niger*, High performance liquid chromatography (HPLC), Mass spectrometry (MS)

赭曲霉毒素是曲霉属和青霉属的某些菌种产生的一类有毒次级代谢产物, 该类物质以异香豆素交联 L-苯丙氨酸为基本结构, 在此基础上包含多种衍生物, 其中赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是分布最广、毒性最强的一种真菌毒素, 已被国际癌症研究机构(IARC)定为 2B 类致癌物^[1-2]。由于 OTA 产生菌广泛分布于自然界, 同时 OTA 理化性质较稳定, 不易降解, 因此, OTA 的污染在全球范围内都比较严重, 在粮食、饲料和粮谷类食物中均有检出。鉴于 OTA 污染的严重性和广泛性, 对其生成机制、迁移及降解规律以及早期预警的研究已成为当今的研究热点。

目前对于 OTA 生成机制的研究已经有一定的进展, 可以确认 OTA 的苯基丙氨酸部分来自于莽草酸途径, 二氢异香豆素部分来自于聚五酮途径^[3]。青霉和曲霉产生 OTA 的途径并不相同, 相比青霉, 对于曲霉中 OTA 生成机制的研究更为欠缺^[4]。为了深入开展 OTA 的相关研究, 需要不断丰富 OTA 产生菌的资源库, 只有通过对大量 OTA 产生菌的比较基因组学的研究^[5-7], 才有可能挖掘出新的 OTA 合成调控关键基因, 彻底阐明 OTA 的合成机制。因此, 当务之急就是筛选并鉴定不同种属的 OTA 产生菌。目前, 已报道的 OTA 产生菌主要包括: 青霉和曲霉这两个属。青霉属中, 鲜绿青霉(*Penicillium viridicatum*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、变幻青霉(*Penicillium variable*)、波兰青霉(*Penicillium polonicum*)、圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)和日耳曼青霉(*Penicillium nordicum*)等可以产生 OTA。曲霉属中, 赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*)、佩特曲霉(*Aspergillus petrakii*)、洋葱曲霉(*Aspergillus alliaceus*)、硫色曲霉(*Aspergillus sulphureus*)、蜂蜜

曲霉(*Aspergillus melleus*)及寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等也能产生 OTA^[2]。

本研究利用 YES 和 CYA 培养基, 通过高效液相色谱结合荧光检测和质谱检测的方法, 从实验室保存的 32 株霉菌中筛选分离 OTA 产生菌株。通过传统形态学分类特征, 结合对 ITS、Calmodulin 和 β -Tubulin 等 3 个基因部分片段的多基因系统发育分析对菌株进行鉴定, 旨在丰富 OTA 产生菌株的资源库并为进一步开展 OTA 相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 32 株霉菌与 *Escherichia coli* DH5 α 菌株均由本实验室保存。

1.1.2 培养基: PDA 培养基、酵母浸膏蔗糖培养基(YES)、察氏酵母膏琼脂培养基(CYA)与察氏培养基(CA)的配制见文献[8]。

1.1.3 主要试剂: OTA 标品购于 Fermentas 公司, 霉菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司, pMD18-T Easy vector 购于宝生物工程(大连)有限公司, PCR 产物胶回收试剂盒、PCR MasterMix 与 DNA MarkerIII 购于天根生化科技(北京)有限公司, 色谱甲醇、色谱乙腈购于 Fisher 公司, 冰乙酸(分析纯)购于天津市北方天医化学试剂厂。

1.1.4 主要仪器设备: 高效液相色谱仪 Agilent 1100、荧光检测器 G1321A 和质谱 Agilent 1260 购自美国安捷伦科技有限公司; 恒温式电热水浴锅 H1650-W 购自天津市中环实验电炉有限公司; 电泳仪 JY-SPCT 购自北京六一仪器厂; 高速离心机 5418 和 PCR 仪 Mastercycler nexus 购自美国 Eppendorf 公司; 扫描式电子显微镜 S-3400N 购自日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 产 OTA 菌株筛选: 将所有 32 株霉菌菌株接种到 PDA 培养基平板上 25 °C 培养 5 d, 三点接种法将菌株接种到 CYA 和 YES 培养基, 25 °C 避光培养 7 d, 用打孔器从菌落中心到外沿依次取直径为 9 mm 的 3 块带有菌丝体的培养物放入 2 mL 离心管中, 加入 500 μ L 甲醇振荡 1 min, 避光静置 1 h, 用孔径 0.22 μ m 滤器过滤, HPLC-FLD 及 HPLC-MS 进行检测和鉴定 OTA^[9-10]。

HPLC-FLD 检测条件^[11]: 采用 Kromstar™ HPLC 反相 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 柱温: 30 °C; 激发波长 330 nm, 发射波长 460 nm; 流动相: 乙腈:水:乙酸=99:99:2 (体积比); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L。

质谱条件: 大气压电喷雾离子源(API-ESI), 正离子扫描模式; 毛细管电压 4 kV; 干燥气体温度 300 °C, 雾化器压力 60 psi, 干燥气体流速 10 L/min。

1.2.2 菌株形态特征观察: 对分离到的菌株采用 PDA、CA、YES 和 CYA 平板培养后, 采用光学显微镜及扫描电镜对菌落、菌丝和孢子等结构进行观察, 并参照《真菌鉴定手册》^[12]和《中国真菌志》^[13]进行鉴定。

1.2.3 ITS、 β -Tubulin 与 Calmodulin 核苷酸序列的扩增及测定: (1) 基因组 DNA 的提取: 液氮研磨法破壁后, 取大约 100 mg 研磨物转至 1.5 mL 离心管中, 用霉菌基因组提取试剂盒进行菌株基因组 DNA 提取; (2) PCR 扩增: ITS 序列使用 ITS1 和 ITS4 引物进行扩增^[14]; β -Tubulin 序列使用 Bt2a 和 Bt2b 引物进行扩增^[15]; Calmodulin 序列使用 cmd5 和 cmd6 引物进行扩增^[16]。PCR 采用 50 μ L 反应体系: 模板 DNA (50 mg/L) 3 μ L, 引物(10 mmol/L)各 2 μ L, 2×Taq PCR MasterMix 25 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L; 反应条件分别为: ITS: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。 β -Tubulin: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。Calmodulin: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循

环; 72 °C 10 min。(3) PCR 扩增产物的回收及序列测定: 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 PCR 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。将目的 DNA 片段与 pMD18-T Easy 载体连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 进行蓝白斑筛选挑取白色菌落, 过夜培养后用细菌质粒小提试剂盒提取质粒并进行 PCR 验证, 将阳性克隆送到北京奥克鼎盛公司测序。

1.2.4 系统发育分析: 将测序得到的 ITS、Calmodulin 和 β -Tubulin 序列在 NCBI 中使用 BLAST 比对后申请 GenBank 登录号。使用 MEGA 4.1 软件 ClustalW 方法进行聚类分析, 以 Neighbour-Joining 法构建分子系统发育树, 在分支上标记 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值评估系统发育树的置信度, 从而确定各菌株的亲缘关系及分类地位。

2 结果与分析

2.1 HPLC-FLD 及 HPLC-MS 检测结果

首先通过 HPLC-FLD 测定 OTA 标品的保留时间, 然后在同样条件下测定样品, 观察相似时间的出峰情况, 筛选可能的 OTA 产生菌, 本实验在 32 株霉菌中初筛出 3 株 OTA 疑似产生菌株。对初筛菌株的 OTA 疑似峰进一步进行质谱分析, 确认有一株 OTA 产生菌, 我们将其命名为 1062。OTA 标准品典型的色谱及质谱图见图 1A 和图 2A; 该菌株典型的色谱及质谱图见图 1B 和图 2B。由图 1A 可知, 所试条件下 OTA 标品的出峰时间为 12.069 min, 无其它杂峰; 图 1B 中 1062 菌株的 OTA 的出峰时间为 12.069 min, 前期有杂峰。OTA 保留时间高度吻合。图 2A 中标品的分子离子峰[M+H]⁺为 404.1, 图 2B 中 1062 菌株 OTA 的分子离子峰同样为 404.1。

2.2 1062 菌株的形态学分析

1062 菌株在 CA 平板表面 25 °C 培养 7 d 的菌落直径在 35–39 mm 之间, 整体呈棕色, 最外围有一圈白色菌丝, 中间颜色最深为棕色孢子, 表面干燥, 整体较薄无褶皱(图 3A)。该菌株在相同条件下, 在 YES 培养基上的菌落直径在 73–75 mm 之间, 整

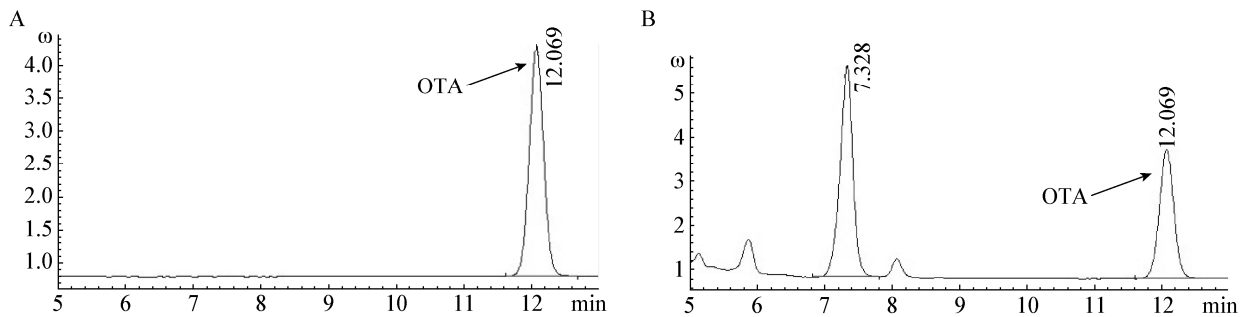


图 1 OTA 标样(A)及 1062 样品(B)色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of OTA standard (A) and Sample 1062 (B)

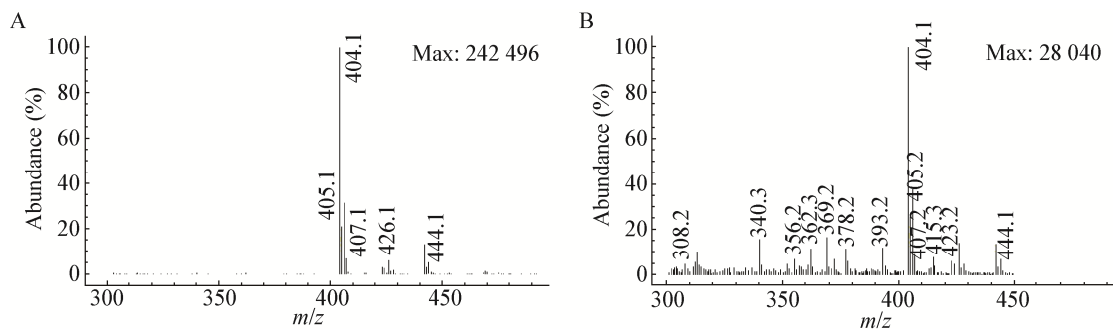


图 2 在正离子模式下 OTA 标样(A)及 1062 样品(B)的 API-ESI 质谱图

Figure 2 API-ESI MS spectra of OTA standard (A) and sample 1062 (B) in the positive ion mode

体呈黄色,质地薄,中心稍有凸起,菌落表面有大量褶皱呈辐射状沟纹,干燥,从内向外分为 4 个部分,最中间一圈颜色呈淡黄色,向外一圈为白色,第三圈为鲜黄色,最外一圈为白色菌丝,菌落边缘不齐,菌落表面长有大量菌丝并带有灰白色孢子(图 3B);该菌株在 CYA 培养基上的菌落直径在 49–51 mm 之间,菌落整体呈棕色,有大量的棕色孢子并有少许小水珠状渗出液,整体薄有大量褶皱,中间有一圆形褶皱,褶皱从中间向外沿呈放射状,菌落最外围呈黄色乳黄色菌丝,菌落边缘整齐(图 3C)。

菌株的显微特征见图 3D–E:分生孢子梗细长,菌丝中存在隔膜,菌丝顶端连接分生孢子头,上面

有大量孢子,属于典型的曲霉属细胞形态。

2.3 ITS、 β -Tubulin 和 Calmodulin 的序列登录号及系统发育分析

ITS 序列长度测得 599 bp; β -Tubulin 测得 555 bp; Calmodulin 测得 585 bp, 它们的 GenBank 登录号分别为 KM259827、KM189806 和 KM189807。在 NCBI 中通过 BLAST 程序与已有的核酸序列进行比对后,以 Neighbour-Joining 法构建 ITS、 β -Tubulin 和 Calmodulin 序列的系统发育树,3 个系统发育树共同表明 1062 菌株与黑曲霉有较高的同源性,结合形态学分析将 1062 菌株鉴定为黑曲霉,实验室将其命名为 *Aspergillus niger* 1062 (图 4–6)。

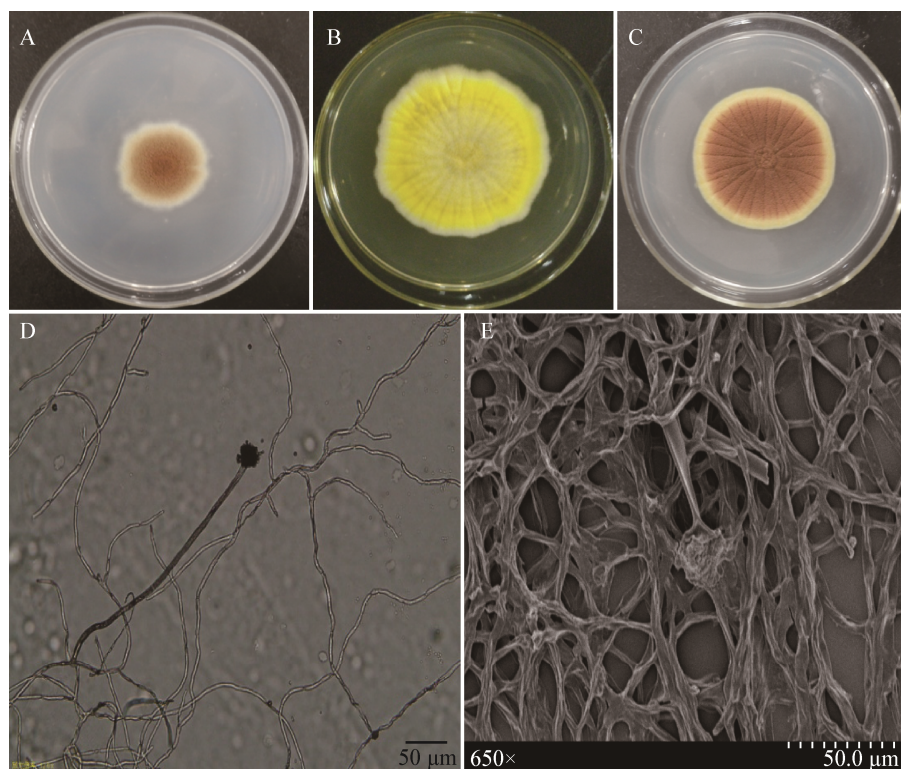


图3 1062菌株的宏观形态及显微特征

Figure 3 Macroscopic morphology and microscopic characteristics of 1062

注: A-C: 25 °C 培养 7 d 的 1062 菌落; A: CA; B: YES; C: CYA. D-E: 1062 显微特征; D: 电子显微镜(400×); E: 扫描电镜(650×).

Note: A-C: Colonies of strain 1062 at 25 °C for 7 d; A: CA; B: YES; C: CYA. D-E: Microscopic characteristics of strain 1062; D: Electron microscope (400×); E: SEM (650×).

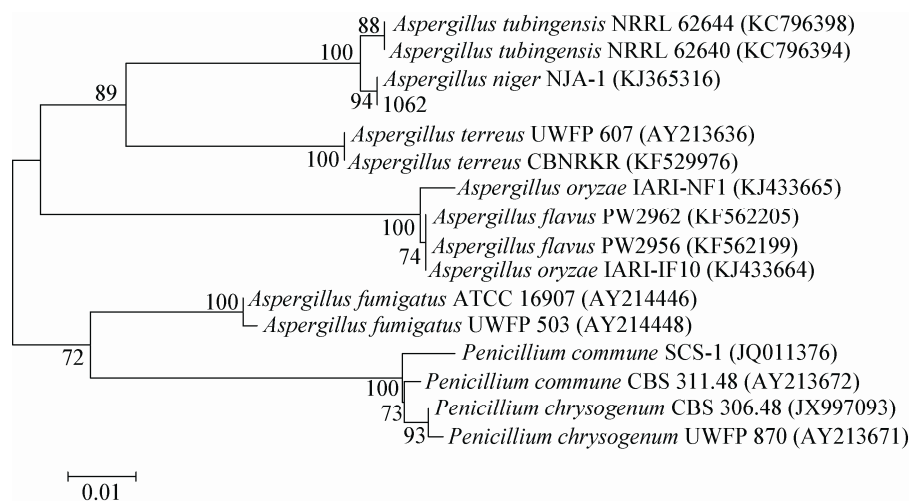


图4 1062菌株基于ITS DNA序列的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of ITS DNA sequence in strain 1062

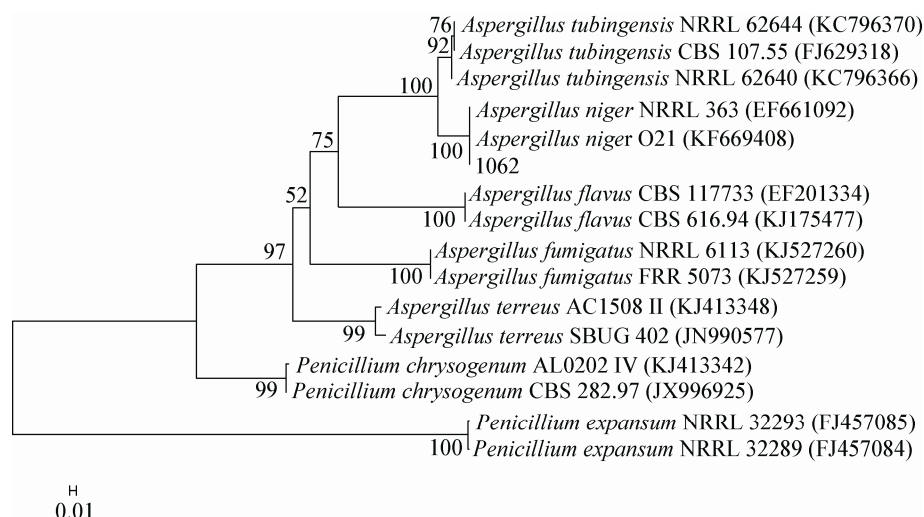


图 5 1062 菌株基于 β -Tubulin DNA 序列的系统发育树
Figure 5 Phylogenetic tree of β -Tubulin DNA sequence in strain 1062

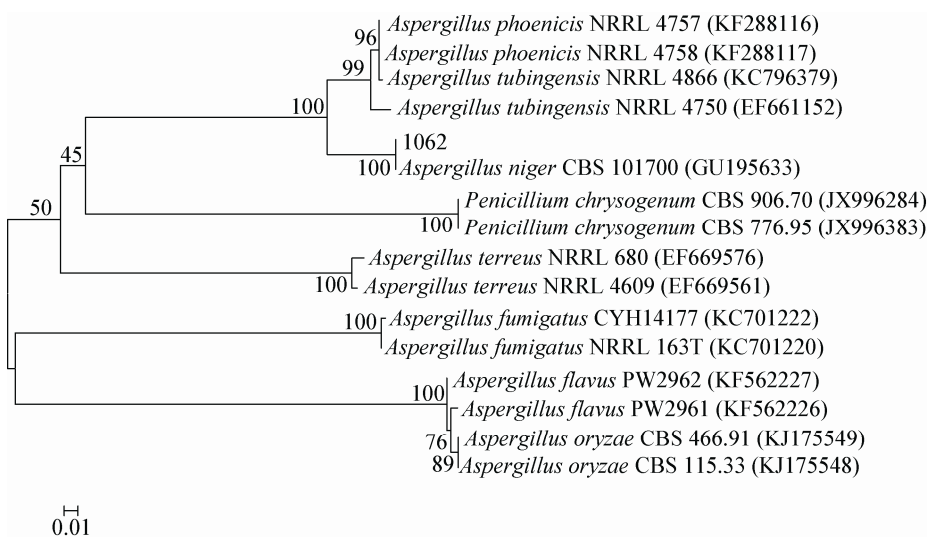


图 6 1062 菌株基于 Calmodulin DNA 序列的系统发育树
Figure 6 Phylogenetic tree of Calmodulin DNA sequence in strain 1062

3 讨论

关于 OTA 产生菌的筛选方法报道得很多^[9-10,17], 多是利用特殊的培养基培养菌株后, 凭肉眼观察菌落周围的荧光, 以此来作为初筛的依据。但本课题组通过预实验证明该方法主观性强, 对荧光较弱的菌株筛选假阴性高。直接采用高效液相色谱结合荧光检测器分析菌落浸提液更为可靠。关于 OTA 产生菌的鉴定, 目前主流的方法是形态结合分子的多

相鉴定^[5,18]。这是由于某些 OTA 产生菌株种间的形态学或生理生化差异极不显著, 而且形态特征有时还会受环境因素的影响^[19], 采用传统的方法很难对这些菌株形成鉴定特征。本实验中的 1062 菌株在菌落及微观形态方面与曲霉属描述很相似, 但具体到种却无法单从其表观形态进行简单判断。因此我们选取 ITS、Calmodulin 和 β -Tubulin 序列对 1062 菌株做分子鉴定, 通过系统发育分析, 最终将其鉴

定为黑曲霉(*A. niger*)。

黑曲霉是公认的食品领域的传统发酵菌株,其产品包括各种有机酸和酶制剂等。但是由于越来越多的黑曲霉产 OTA 研究结果的出现,该菌株的安全性开始受到越来越多的质疑。本研究筛选到的 OTA 生产菌株经鉴定为黑曲霉,证实黑曲霉群内确有部分特殊菌株可产生 OTA。该菌株可以作为今后黑曲霉安全性问题研究中的阳性对照,通过菌株多样性分析可为阐明传统发酵菌株与产赭曲霉毒素菌株的区别做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Varga J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products[J]. Trends in Food Science and Technology, 2006(17): 72-81
- [2] Shu XL, Shi QS, Ouyang YS, et al. Generation and identification of ochratoxin[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(10): 2183-2185 (in Chinese)
疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 赭曲霉毒素的产生及鉴别[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2183-2185
- [3] Niessen L, Schmidt H, Mühlencoert E, et al. Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A-producing fungi[J]. Food Additives and Contaminants, 2005, 22(4): 324-334
- [4] O'Callaghan J, Stapleton PC, Dobson ADW. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli[J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43(4): 213-221
- [5] Ferracin LM, Fier CB, Vieira ML, et al. Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(3): 137-145
- [6] Gallo A, Knox BP, Bruno KS, et al. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179: 10-17
- [7] Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88[J]. Genome Research, 2011, 21(6): 885-897
- [8] Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage[M]. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1997: 423-426
- [9] Bragulat MR, Abarca ML, Cabanes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(2): 139-144
- [10] Jiang CM, Shi JL, Liu YL. Methods for quick screening out ochratoxin-producing isolates[J]. Journal of Northwest A&F University, 2012, 40(3): 169-174 (in Chinese)
蒋春美, 师俊玲, 刘延琳. 赭曲霉毒素产生菌筛选方法的对比与优选[J]. 西北农林科技大学学报, 2012, 40(3): 169-174
- [11] Hernández MJ, García-Moreno MV, Durán E, et al. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 566(1): 117-121
- [12] Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science Press, 1979: 129-135 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学出版社, 1979: 129-135
- [13] Qi ZT. Chinese Fungi: *Aspergillus* and Related Teleomorph[M]. Beijing: Science Press, 1997: 100-102 (in Chinese)
齐祖同. 中国真菌志: 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 100-102
- [14] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322
- [15] Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330
- [16] Hong SB, Go SJ, Shin HD, et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species[J]. Mycologia, 2005, 97(6): 1316-1329
- [17] Hernández MJ, García-Moreno MV, Durán E, et al. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 566(1): 117-121
- [18] Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 135-141
- [19] Chen FM. The sequence of ITS region and its application of fungus[J]. China Forestry Science and Technology, 2007, 21(2): 5-7 (in Chinese)
陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发, 2007, 21(2): 5-7