



研究报告

假单胞菌胞外酶降解黄曲霉毒素 B₁ 的酶学性质宋茂鹏¹ 马现永² 邓盾^{*2} 王永飞^{*1}¹ 暨南大学生物工程学系 广东 广州 510632² 广东省农业科学院动物科学研究所 畜禽育种国家重点实验室 农业农村部华南动物营养与饲料重点实验室 广东省动物育种与营养公共实验室 广东畜禽肉品质量安全控制与评定工程技术研究中心 广东 广州 510640**摘要:**【背景】黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 毒性强、污染普遍, 目前尚无有效的防治办法。**【目的】**为了发掘高效的 AFB₁ 降解菌并探索其降解特性, 对红树林污泥样品中一株 AFB₁ 降解菌株 (HAI2) 的酶学性质进行分析。**【方法】**以 AFB₁ 结构类似物为唯一碳源, 筛选出一株高效的 AFB₁ 降解菌, 利用 16S rRNA 基因测序结果鉴定菌株, 并结合 HPLC 研究菌株对 AFB₁ 的降解特性。**【结果】**HAI2 的 16S rRNA 基因序列与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*, NR 113651.1) 的相似性高达 99.85%, 其主要降解 AFB₁ 的活性物质为胞外蛋白质, HAI2-AFB₁ 降解酶的最适 pH 值为 7.0, 最适温度为 37 °C, Fe²⁺、Ca²⁺ 和 Zn²⁺ 会抑制 AFB₁ 的降解率, Cu²⁺ 和 Mn²⁺ 可以提高 AFB₁ 的降解率。HAI2 上清液对 100 ng/mL 的 AFB₁ 降解 24 h 的降解率为 71.52%。此外, *P. putida* HAI2 还可抑制被黄曲霉菌感染的玉米中 AFB₁ 的合成, AFB₁ 含量可减少 63.46%。**【结论】**假单胞菌 *P. putida* HAI2 具有较高的降解 AFB₁ 能力, 其主要降解活性物质为胞外蛋白, 在食品和饲料行业具有较大的应用前景。**关键词:** 黄曲霉毒素 B₁, 筛选, 假单胞菌, 酶学性质, 胞外蛋白

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (C31802103); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313004); Guangzhou Science and Technology Plan (2018040100224); Qingyuan Innovation and Entrepreneurship Research Team Project (2018002); Talent Plan of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (201803); Innovation Team Project of Modern Agricultural Industrial Technology System of Guangdong Province (2019KJ112, 2019KJ115)

***Corresponding authors:** DENG Dun: Tel: 86-20-85161289; E-mail: dengdun2008@126.com
WANG Yongfei: Tel: 86-20-32742408; E-mail: wyfmsm@163.com

Received: 15-01-2020; **Accepted:** 08-04-2020; **Published online:** 08-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(C31802103); 广东省自然科学基金(2018A030313004); 广州市科技计划(2018040100224); 清远市创新创业科研团队项目(2018002); 广东省农业科学院人才计划(201803); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2019KJ112, 2019KJ115)

***通信作者:** 邓盾: Tel: 020-85161289; E-mail: dengdun2008@126.com

王永飞: Tel: 020-32742408; E-mail: wyfmsm@163.com

收稿日期: 2020-01-15; **接受日期:** 2020-04-08; **网络首发日期:** 2020-06-08

Characterization of an extracellular aflatoxin B₁ degrading enzyme from a *Pseudomonas* strain

SONG Maopeng¹ MA Xianyong² DENG Dun^{*2} WANG Yongfei^{*1}

¹ Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

² Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; State Key Laboratory of Animal Breeding; South China Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Animal Breeding and Nutrition Public Laboratory; Guangdong Provincial Poultry Meat Quality, Quality Control and Evaluation Engineering Technology Center, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract: [Background] Aflatoxin B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) is a highly toxic and widespread mycotoxin. At present, there is no effective method to control its pollution. **[Objective]** To discover efficient AFB₁ degrading bacteria and explore its degradation characteristics, enzymatic properties of an AFB₁ degrading strain (HAI2) from mangrove sludge samples were analyzed. **[Methods]** Using the structural analogue of AFB₁ as the sole carbon source, a highly efficient AFB₁ degrading strain was screened out, then 16S rRNA gene sequencing technology was used to identify the strain species, and HPLC was used to analyze the strain's degradation characteristics to AFB₁. **[Results]** 16S rRNA gene sequence of HAI2 shares 99.85% homology with *Pseudomonas putida* (NR 113651.1). The main component of degradation AFB₁ was extracellular protein. According to the analysis of enzymatic properties, the optimum pH value of HAI2-AFB₁ degrading enzyme was 7.0 and the optimum temperature was 37 °C. Fe²⁺, Ca²⁺, and Zn²⁺ could inhibit the degradation rate of AFB₁, and Cu²⁺ and Mn²⁺ could increase the degradation rate of AFB₁. The degradation rate of 100 ng/mL AFB₁ by HAI2 supernatant was 71.52% for 24 h. Besides, *P. putida* HAI2 could inhibit AFB₁ synthesis in corn infected by *Aspergillus flavus*, and the content could be reduced by 63.46%. **[Conclusion]** *P. putida* HAI2 had a high ability to degrade AFB₁, and its main degradation active substance was extracellular protein, with a large application prospect in the food and feed industry.

Keywords: Aflatoxin B₁, screening, *Pseudomonas*, enzymatic properties, extracellular protein

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*A. parasiticus*)、集蜂曲霉(*A. nomius*)和溜曲霉(*A. stamarii*)等丝状真菌产生的一类结构类似、强毒性的次生代谢产物^[1-2],目前已知的黄曲霉毒素有20余种,常见的有AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁和AFM₂,其中AFB₁毒性最强^[3]。AFB₁在没有经过代谢活化之前毒性不强,但在肝脏内通过羟基化作用转化成强毒性的AFM₁,严重损害机体免疫系统,甚至致癌、致畸和致突变^[4]。1993年世界卫生组织癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将AFB₁划定为Ia类致癌物^[5]。AFB₁不仅污染花生、玉米、高粱和大米等农产品,而且会通过食物链进入到家禽、鱼类、猪和牛在内的多种动物体内,严重影响畜产品的质量和产量^[6],不但给农

牧业造成了严重的经济损失,也给人类健康带来了巨大的安全隐患^[7]。因此,黄曲霉毒素污染问题亟待解决,对其脱毒方法的研究具有重要意义^[8]。

近年来,科研人员对AFB₁的脱毒方法进行了研究,主要有碱处理法、氧化处理法、高温法、吸附剂法和抗氧化剂法等,但是这些方法具有破坏营养、脱毒不彻底和成本高等缺陷,实际的防控和脱毒效果并不理想,还有可能产生其他有害物质^[9-10]。因此,寻找一种既能脱除毒素、又能保持食品中原有的营养和风味且经济实惠的降解方法是目前的研究趋势,而生物脱毒法就具有这些优点。近年来人们发现许多微生物如类棒状杆菌诺卡氏菌(*Nocardia corynebacterioides* DSM12676)、红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*)、嗜麦芽窄食单胞菌

(*Stenotrophomonas maltophilia*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)及弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)等细菌^[11-13]都具有降解 AFT 的能力。一些真菌如假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)^[14]、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、黑曲霉(*Aspergillus nige*)^[15]等也具有降解 AFT 的能力,但是真菌具有培养时间较长、代谢产物复杂、在一定条件下可能产生其他类型毒素等缺点,制约了其在霉菌毒素降解领域的应用^[16]。相比之下,细菌在 AFT 降解方面具有较强的适用性^[17]。

尽管生物降解应用前景很广阔,但 AFT 分子结构复杂、毒性强,大多数微生物对 AFT 都没有降解作用,很难筛选到降解能力比较强的菌株。通常的筛选策略是从含有毒素的样品中进行筛选,如发霉的饲料、土壤、动物肠道等。截至目前,高效降解 AFB₁ 的菌株仍然较少。扩大菌株的筛选范围、获取多种多样的菌株或是破解这一局面的途径。红树林污泥的微生物多样性丰富,目前尚无从中分离 AFB₁ 高效降解菌的报道。因此,本研究通过从红树林污泥中分离得到降解 AFB₁ 的菌株,并进一步对其降解效果、酶学性质及胞外蛋白质进行分析,以期生物降解 AFB₁ 提供更多的种质资源,也为进一步研究其降解机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2019 年 3 月从广东省深圳市大亚湾红树林公园采集红树林污泥。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

富集培养基参照闵勇等^[18]方法配制,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min 后,冷却至 50 °C 加入 0.1 g/L 香豆素。LB 培养基参照文献^[19]配制,马铃薯葡萄糖培养基(Potato Dextrose Medium, PDM)参照文献^[20]配制,以上 2 种培养基灭菌条件同富集培养基。

甲醇、乙腈、正己烷等色谱级有机溶剂,上海

阿拉丁生化科技股份有限公司;香豆素、Bradford 蛋白定量试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;AFB₁,广州康安生物技术有限公司;DNA 提取试剂盒 HiPure Bacterial DNA Kit,广州美基生物科技有限公司。高效液相色谱仪, Waters 公司;光化学反应器,青岛普瑞邦生物工程有限公司。

1.3 AFB₁ 高效降解菌株的分离筛选

1.3.1 富集培养

取大亚湾红树林污泥,按 10 g/kg 加入香豆素,自然条件下富集培养 30 d。取富集后的红树林污泥 1 g 加入 9 mL 生理盐水,摇匀后,进行 10 倍比梯度稀释,取 100 μL 均匀涂在富集培养基平板上,放入恒温培养箱内 37 °C 培养,观察菌落形态特征。根据菌落形态挑取单菌落,并于富集培养基平板上划线培养 3 次,再挑单菌落于 LB 培养基中,37 °C、170 r/min 培养过夜,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 去上清后,加入无菌脱脂牛乳于-20 °C 保藏菌种。

1.3.2 复筛

将 1.3.1 初筛得到的菌株接种到 LB 培养基中,37 °C、170 r/min 培养 24 h。取无菌 20 mL 玻璃瓶,加入 980 μL 菌液和 20 μL 浓度为 5 μg/mL 的 AFB₁ 标准品,37 °C 下避光静置反应 72 h 后,使用 HPLC 检测 AFB₁ 降解率。以 LB 培养基为对照。

1.3.3 AFB₁ 检测

采用 HPLC-PHR-FLD 方法进行 AFB₁ 的检测。取 5 mL 乙腈和水的混合液(乙腈:水=84:16,体积比)至 AFB₁ 反应液中,再加入 1 mL 正己烷,充分振荡混匀,静置 45 min,使用 0.22 μm 聚偏氟乙烯滤膜过滤至进样瓶中,HPLC-PHR-FLD 检测 AFB₁ 含量。色谱条件:色谱柱为 XBridgeTM C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm),进样量为 20 μL,流动相为甲醇:水:乙腈=35:55:10 (体积比),流速 1 mL/min,柱温 30 °C,荧光激发光波长 360 nm,发射光波长 440 nm^[21]。

1.3.4 酶活力测定

AFB₁ 降解酶的活性测定结果采用比酶

活(U/mg)的形式表示, 即每分钟转化 1 pmol AFB₁ 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[22]。

1.4 菌株鉴定

使用 DNA 提取试剂盒 HiPure Bacterial DNA Kit 提取 HAI2 的基因组 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因序列进行分子鉴定, 上游引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGCCTCAG-3'; 下游引物为 1492R: 5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times Buffer 缓冲液(含 20 mmol/L Mg²⁺) 5 μ L, dNTPs (20 μ mol/L) 4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.8 μ L, DNA 模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, 灭菌 ddH₂O 35.2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增完成之后用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 然后通过凝胶成像系统检测观察结果, 将大小正确的条带回收后送至广州擎科生物技术有限公司测序分析。

测序结果采用序列拼接软件 CExpress 进行拼接, 将拼接后的序列在 NCBI 上通过 BLAST 比对分析, 搜索同源序列, 将目标序列与搜索到的同源序列用 MEGA 7.0 软件分析, 并通过邻接法(Neighbor-Joining Method, NJ)构建系统进化树。序列比对和系统进化树的构建使用 MEGA 7.0 软件进行, 将两端截齐的 16S rRNA 基因序列比对后, 选择 Bootstrap 设置为 1 000, 其他参数使用默认设置。

1.5 AFB₁ 降解酶学性质

1.5.1 AFB₁ 降解活性存在部位

分别测定 AFB₁ 降解菌株的细胞外成分(Extracellular Component, EC)、完整细胞(Whole Cell, WC)、细胞内成分(Intracellular Component, IC)和细胞碎片(Cell Fragments, CF)对 AFB₁ 的降解作用^[23]。将单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 24 h。取 10 mL 菌液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液与菌体。上清液过 0.22 μ m 水系滤膜得到 EC, 离心后的菌体用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)洗涤, 再离心, 取菌体加入 10 mL PBS 重悬得到 WC。

另取 10 mL 菌液离心后的菌体加入 10 mL PBS, 在冰浴中超声 15 min (400 W, 超声 5 s, 间隔 5 s)破碎细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液过 0.22 μ m 水系滤膜得到 IC, 沉淀用 10 mL 的 PBS 重悬得到 CF。向上述 4 种不同组分中添加 5 μ g/mL 的 AFB₁ 标准液至终浓度为 320.5 pmol/mL (100 ng/mL)。上述样品于 37 $^{\circ}$ C 避光静置反应 24 h 后, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算酶活力。EC 采用 LB 培养基为对照, WC、IC 和 CF 以 PBS 为对照。

1.5.2 不同变性处理对 *P. putida* HAI2 降解 AFB₁ 比酶活的影响

参照 Alberts 等^[24]的方法研究蛋白酶和变性剂对酶活的影响, 各个处理的步骤参照表 1。处理完毕后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取 980 μ L 上清与 20 μ L (5 μ g/mL) AFB₁ 混合, 37 $^{\circ}$ C 避光静置反应 24 h, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算比酶活, 以未处理的上清为对照。

1.5.3 温度对 AFB₁ 降解酶活性的影响

将 1 mL 的 AFB₁ 降解反应体系加入 20 mL 无菌玻璃瓶中, 包含 980 μ L EC 和 20 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的 AFB₁ 标准液, 分别置于不同温度(4、20、30、37、50 和 60 $^{\circ}$ C)下避光静置反应 24 h 后, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算酶的比酶活。以 LB 培养基为对照。

表 1 不同变性处理对 *P. putida* HAI2 降解 AFB₁ 比酶活的影响

Table 1 Effect of different denaturation treatments on specific enzyme activity of AFB₁ degraded by *P. putida* HAI

处理方式	处理参数
Treatments	Parameters
热处理	100 $^{\circ}$ C 水浴 30 min
Heated	Water bath for 30 min at 100 $^{\circ}$ C
蛋白酶 K	1 mg/mL 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 处理 6 h
Proteinase K	Treated with 1 mg/mL proteinase K at 37 $^{\circ}$ C for 6 h
变性剂	1% SDS, 37 $^{\circ}$ C 处理 6 h
Denaturant	Treated with 1% SDS at 37 $^{\circ}$ C for 6 h
蛋白酶 K+SDS	1 mg/mL 蛋白酶 K 和 1% SDS, 37 $^{\circ}$ C 处理 6 h
Proteinase K plus with SDS	Treated with 1 mg/mL proteinase K and 1% SDS for 6 h

1.5.4 pH 对 AFB₁ 降解酶活性的影响

将 1 mL 的 AFB₁ 降解反应体系加入 20 mL 无菌玻璃瓶中, 包含 780 μ L EC、20 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的 AFB₁ 标准液和 200 μ L 缓冲液, 缓冲液的 pH 值梯度设为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 (pH 4.0 和 5.0 为柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0 和 7.0 为 PBS 缓冲液, pH 8.0 和 9.0 为 Tris-HCl 缓冲液), 于最适反应温度下避光静置反应 24 h 后, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算酶的比酶活。以 LB 培养基为对照。

1.5.5 金属离子对 AFB₁ 降解酶活性的影响

将 1 mL 的 AFB₁ 降解反应体系加入 20 mL 无菌玻璃瓶中, 包含 680 μ L EC、20 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的 AFB₁ 标准液、200 μ L 最适 pH 的缓冲液和 100 μ L 浓度为 100 mmol/L 的金属离子(Ca²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺和 Mn²⁺)溶液(CaCl₂、FeSO₄、MgCl₂、ZnCl₂、CuSO₄、MnCl₂)。为了避免金属离子产生沉淀, 使用 pH 6.0 的 PBS 缓冲液配制金属离子母液。在最适反应温度和最适 pH 下避光静置反应 24 h 后, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算酶的比酶活。以未处理的上清为对照。

1.5.6 AFB₁ 浓度对降解酶活性的影响

将 1 mL 的 AFB₁ 降解反应体系加入 20 mL 无菌玻璃瓶中, 包含 780 μ L EC、20 μ L 不同浓度的 AFB₁ 标准液(500、250、100、50、和 25 ng/mL)和 200 μ L 最适 pH 的缓冲液。不同浓度的反应液分别于最适反应温度和最适 pH 下避光静置反应 0、12、24、48 和 72 h 后, 用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 计算酶的比酶活。以 LB 培养基为对照。

1.6 胞外蛋白定量

HAI2 菌在 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 培养 24 h, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清过 0.22 μ m 水系滤膜。以未接入 HAI2 菌的空白 LB 培养基作为对照。使用 Bradford 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 在 595 nm 处测量吸收值, 通过与牛血清蛋白 BSA 标准曲线比较获得胞外蛋白的浓度。

1.7 *P. putida* HAI2 对黄曲霉菌的抑制效果

将 AFB₁ 产生菌株 *A. flavus* CGMCC 3.4409 接种到 PDM 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、170 r/min 培养 48 h 备用。向 250 mL 三角瓶中加入 10 g 干燥玉米粉和 8 mL 无菌水充分混匀, 接入 1 mL 的 HAI2 菌液和 1 mL 的 PDM 培养基作为对照组; HAI2 保护组中接入 1 mL 的 HAI2 菌液和 1 mL 的黄曲霉 *A. flavus* CGMCC 3.4409 菌液; 感染组接入 1 mL 的 LB 培养基和 1 mL 的黄曲霉菌液。所有处理组样品于 30 $^{\circ}$ C 避光静置反应 48 h 后, 加入 25 mL 甲醇和 15 mL 无菌水, 振荡摇匀 20 min, 静置 20 min, 取上清液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 过 0.45 μ m 有机滤膜后用 HPLC 检测 AFB₁ 含量, 比较 HAI2 对黄曲霉菌的抑制效果。

1.8 数据统计

AFB₁ 降解率=

$$\frac{\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量} - \text{实验组 AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量}} \times 100\%。$$

实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析处理, 以上所有实验均设 3 个重复。

2 结果与讨论

2.1 AFB₁ 高效降解菌株的分离筛选

以香豆素为唯一碳源的无机盐培养基, 从红树林污泥中初步筛选出 20 株生长良好的活性菌株。之后以降解率作为指标, 通过 HPLC 进行复筛, 最终筛选出一株 AFB₁ 高效降解菌株 HAI2。

HAI2 菌落形态如图 1A 所示, 其菌落为圆形、乳白色、边缘整齐、表层光滑、不透亮, 并且有腥臭味。HAI2 菌株经革兰氏染色后呈红色杆状, 为革兰氏阴性菌(图 1B)。

HPLC 复筛结果见图 2, 随着反应时间的进行, AFB₁ 的峰面积明显减少, 降解 72 h 后的 AFB₁ 峰面积明显小于对照组, 经计算得 72 h 的 AFB₁ 降解率可达 80%, 说明 HAI2 菌液对 AFB₁ 降解效果较好。

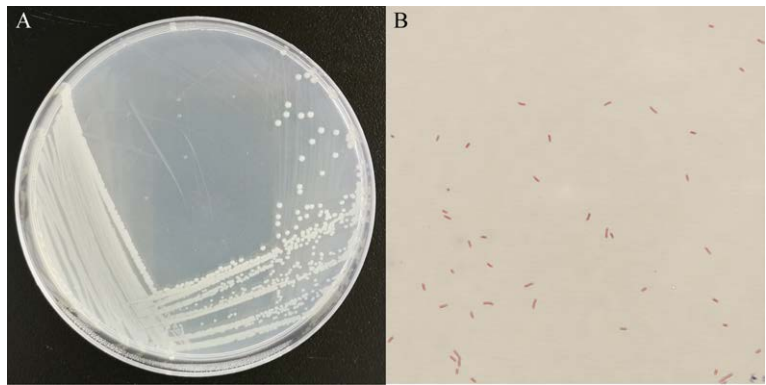


图 1 HAI2 形态学特征

Figure 1 Morphological properties of HAI2

注: A: HAI2 菌株菌落; B: HAI2 显微镜镜检结果(1 000×)

Note: A: Plate colony of HAI2 strain; B: HAI2 microscope inspection result (1 000×)

2.2 16S rRNA 基因鉴定

经 PCR 扩增得到的 16S rRNA 基因片段送至广州擎科生物有限公司测序。根据测序结果使用 MEGA 7.0 处理分析, 并构建系统发育树(图 3)。由图 3 可见, 菌株 HAI2 与 *P. putida* (NR 113651.1) 属于同一分支, 核酸序列相似性高达 99.85%, 结合形态学特征, 初步判断 HAI2 为 *P. putida*, 将其命名为 *P. putida* HAI2。

2.3 AFB₁ 降解酶学性质

2.3.1 AFB₁ 降解活性存在部位

比较 HAI2 的 EC、IC、WC 和 CF 对 AFB₁ 的降解活性, 结果如图 4 所示。EC 对 AFB₁ 的降解能力最强, 比酶活达到了 2.53 U/mg, 远远高于 IC 的 0.33 U/mg、WC 的 0.49 U/mg 和 CF 的 0.16 U/mg。因此, *P. putida* HAI2 降解 AFB₁ 的主要活性物质存在于上清中。

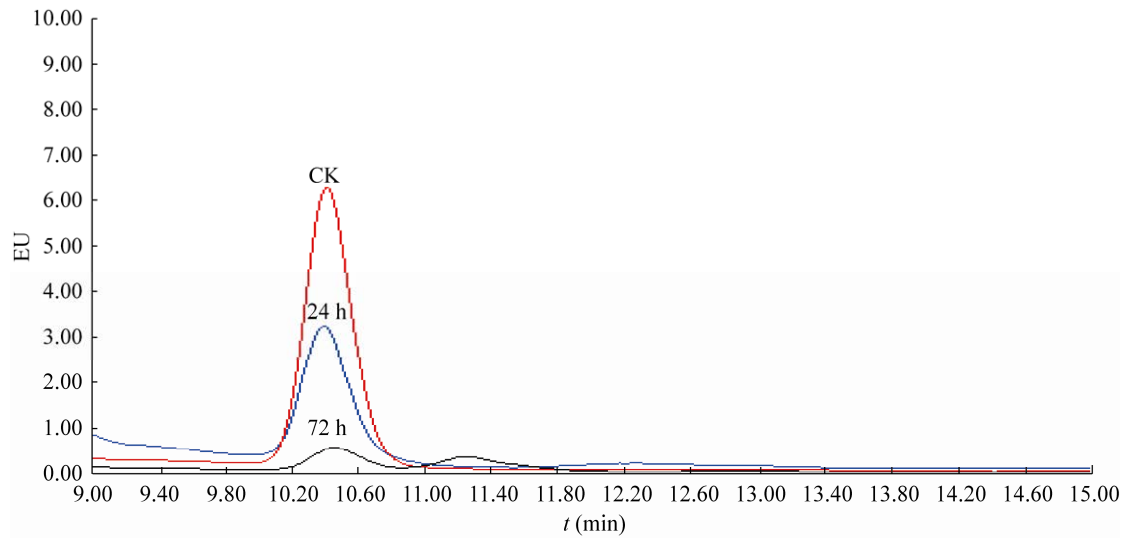


图 2 HAI2 菌液及对照处理 AFB₁ 的 HPLC 结果

Figure 2 HPLC results of HAI2 bacterial solution and control-treated AFB₁

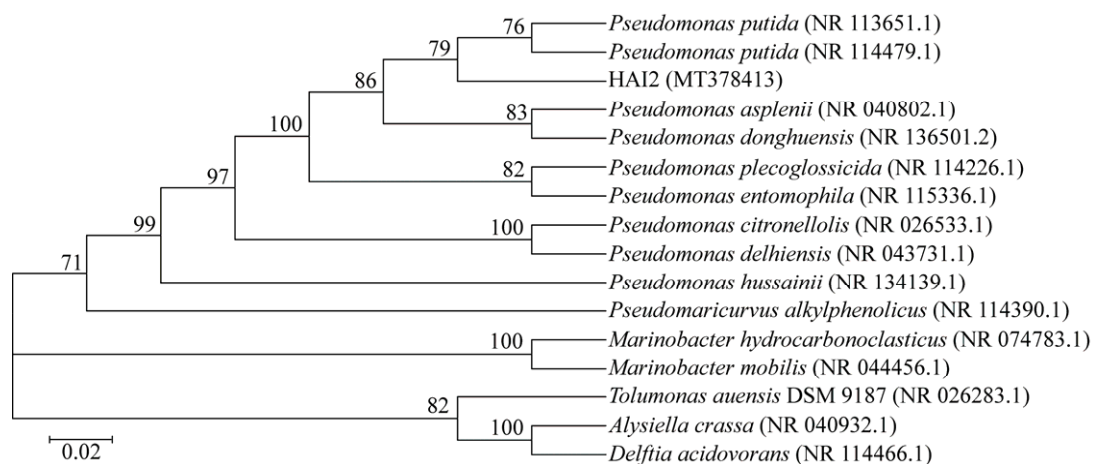


图3 菌株 HAI2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of HAI2 based on 16S rRNA gene sequence

注：括号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号；分支点上的数字表示置信度；标尺代表遗传变异系数

Note: The serial number in parentheses indicates GenBank accession number; The number at the branch represents the confidence interval; The scale represents the coefficient of genetic variation

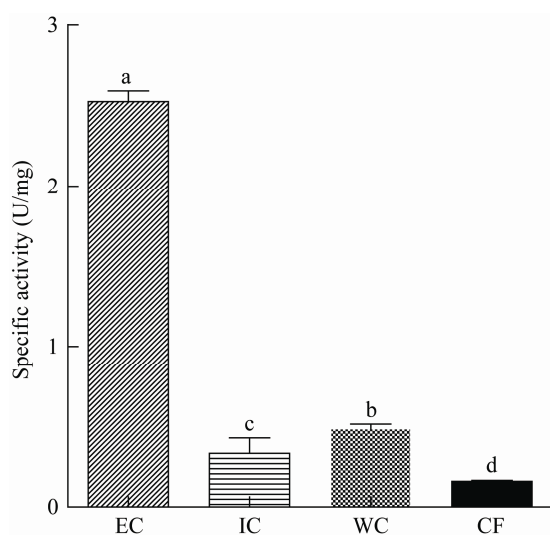


图4 HAI2 菌不同组分对 AFB₁ 的降解作用

Figure 4 Degradation of AFB₁ by different components of HAI2

注：不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below

2.3.2 蛋白酶 K 和变性处理对酶活的影响

为了确认 HAI2 胞外蛋白对 AFB₁ 的作用，实验比较通过不同变性处理后 EC 对 AFB₁ 的降解效果。如图 5 所示，物理变性(加热)和变性剂(SDS)处理均会降低 EC 降解 AFB₁ 的比酶活，二者的比

酶活值分别为 0.27 U/mg 和 0.61 U/mg，明显低于对照的 2.53 U/mg，而且变性过程中有白色絮状沉淀产生；此外，蛋白酶 K 处理也会抑制 EC 的 AFB₁ 降解活性，蛋白酶 K 处理组和 SDS+蛋白酶 K 处理组的比酶活分别为 0.89 U/mg 和 0.31 U/mg。

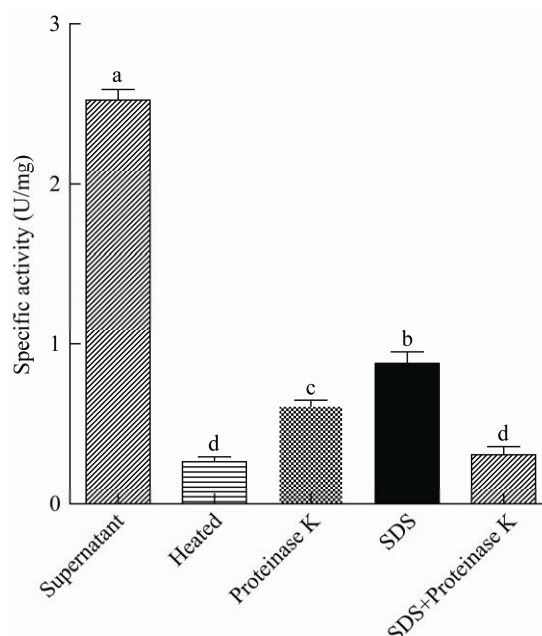


图5 不同变性处理对酶活性的影响

Figure 5 Effect of different denaturation treatments on enzyme activity

因此, HAI2 降解 AFB₁ 的反应可能为酶促反应, 主要起降解作用的物质为胞外蛋白质。使用 Bradford 试剂定量分析, HAI2 上清中的胞外蛋白含量为 62.5 μg/mL。

2.3.3 温度对 AFB₁ 降解酶活性的影响

不同温度条件下, EC 对 AFB₁ 的降解效果如图 6 所示。从 4 °C 到 60 °C, 随着温度的升高, EC 降解 AFB₁ 的比酶活呈现先升高再降低的变化趋势; 从 4 °C 到 37 °C, 温度越高酶的比酶活越高; 但从 37 °C 到 60 °C, 温度越高酶的比酶活越低。因此, EC 降解 AFB₁ 的最适反应温度为 37 °C。

2.3.4 pH 对 AFB₁ 降解酶活性的影响

不同 pH 条件下, EC 对 AFB₁ 的降解效果如图 7 所示。可以看出, 在 pH 4.0–9.0 范围内, 随着 pH 值的升高, EC 的比酶活也是呈现先升高再降低的趋势; 在 pH 4.0–7.0 范围内, pH 值越高, 酶的比酶活就越高; 在 pH 7.0–9.0 范围内, pH 值越高, 酶的比酶活就越低。因此, EC 降解 AFB₁ 的最适 pH 为 7.0。

2.3.5 金属离子对 AFB₁ 降解酶活性的影响

不同金属离子对 EC 降解 AFB₁ 的活性影响见图 8。可以看出, Fe²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺和 Mn²⁺处理后, 酶的比酶活表现出不同的变化趋

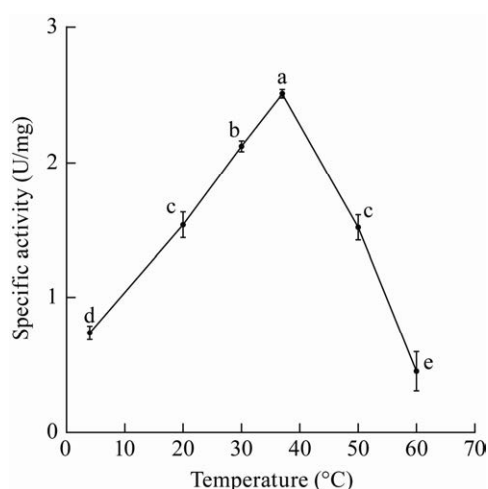


图 6 不同温度对酶活性的影响

Figure 6 Effect of different temperature on enzyme activity

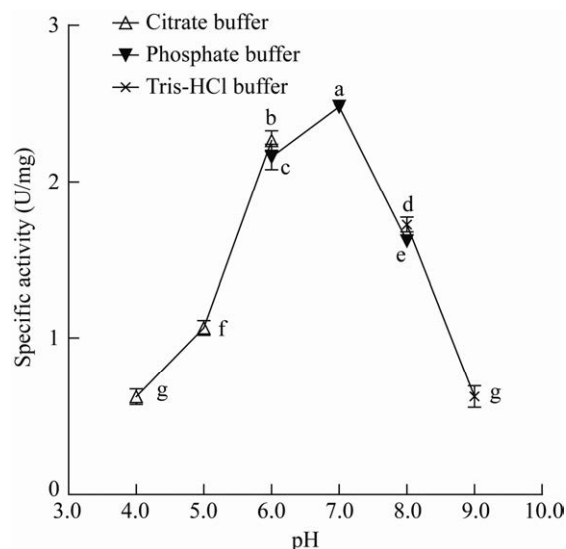


图 7 不同 pH 条件对酶活性的影响

Figure 7 Effect of different pH conditions on enzyme activity

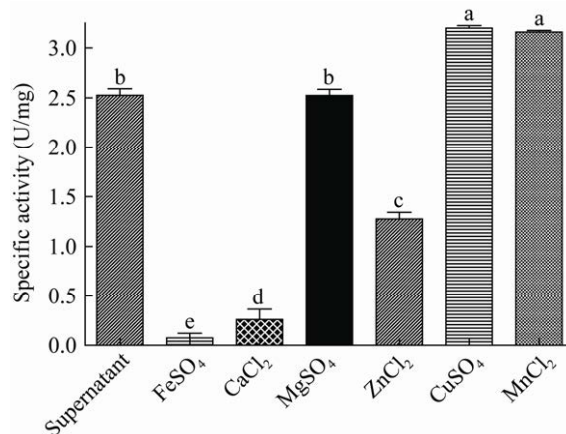


图 8 不同金属离子对酶活性的影响

Figure 8 Effect of different metal ions on enzyme activity

势。Fe²⁺、Ca²⁺和 Zn²⁺都会抑制酶的活力, 尤其是 Fe²⁺和 Ca²⁺, 它们的抑制作用非常明显, 酶的比酶活分别为 0.07 U/mg 和 0.26 U/mg; Mg²⁺几乎不影响酶的比酶活, 但 Cu²⁺和 Mn²⁺都可以提高 AFB₁ 降解酶的比酶活, 可能是 Cu²⁺和 Mn²⁺影响了 EC 中 AFB₁降解酶活性中心的构型, 从而提高了酶活。这种现象和 Guan 等^[25]分离的嗜麦芽寡养单胞菌降解 AFB₁ 的特性类似。同样, Raksha 等^[26]在研究

地衣芽孢杆菌降解 AFB₁ 时也发现 Cu²⁺ 可以增强酶的活性, 而 Zn²⁺ 会抑制酶的活性。不过, 金属离子对不同 AFB₁ 降解酶的抑制和激活作用差异较大。杨文华等^[7]和 Zhao 等^[27]研究发现 Cu²⁺ 会抑制 AFB₁ 降解酶的活性, 这可能和酶的种类、来源等有关系, 后续的研究需对此进一步研究。

2.3.6 AFB₁ 浓度对降解酶活性的影响

EC 对不同浓度 AFB₁ 的降解效果见图 9。从图 9 可以看出, 随着反应时间的增加, AFB₁ 降解酶的活力开始逐渐提高, 0–24 h 酶的比酶活提高很快, 24 h 以后增加速度变缓, 48–72 h 酶活力增加幅度基本不变。不同底物浓度对酶的比酶活影响较大(图 9A)。以 48 h 为例, 25、50、100、250 和 500 ng/mL 降解酶的比酶活分别为 0.40、1.36、2.74、6.62 和 12.56 U/mg, 它们之间差异显著($P < 0.05$)。

从降解率来看, 作用 48 h 后, 酶对 25、50、100 和 250 ng/mL AFB₁ 的降解效率之间无显著性差异(图 9B), 分别为 79.1%、77.1%、76.7% 和 74.5%。但是当 AFB₁ 浓度提高至 500 ng/mL 时, AFB₁ 降解率明显下降($P < 0.05$), 为 70.7%。

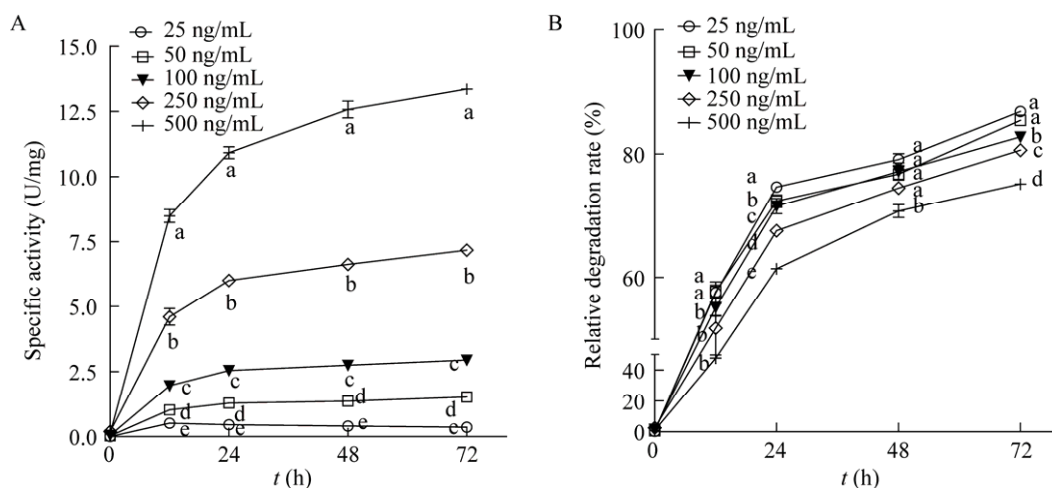


图 9 AFB₁ 浓度对降解酶活性的影响

Figure 9 Effect of AFB₁ concentration on degrading enzyme activity

注: A: 比酶活; B: 降解率

Note: A: Specific activity; B: Degradation rate

可见, HAI 对 AFB₁ 降解效果良好, 与其他研究结果比较也有一定优势。例如 Sangare 等^[28]从土壤中分离的铜绿假单胞菌对 100 ng/mL 的 AFB₁ 降解 72 h 的降解率为 72.5%; Xu 等^[29]从玉米中分离的沙氏芽孢杆菌对 100 ng/mL 的 AFB₁ 降解 72 h 后降解率为 77.9%。然而在相同的时间内, HAI2 上清液的 AFB₁ 降解率高达 82.75%。

2.4 HAI2 对黄曲霉菌的抑制效果

在以纯玉米为基质的培养物中, HAI2 对黄曲霉菌的生长产生了强烈的抑制作用(图 10)。黄曲霉菌 *A. flavus* CGMCC 3.4409 的感染组中长满了黄绿色的菌丝, HAI2 的保护组中黄曲霉菌数量明显少于感染组。通过 HPLC 检测, 对照组中未检测到 AFB₁ 的存在, 感染组中 AFB₁ 的含量为 1 028.52 ng/g, HAI2 保护组中 AFB₁ 的含量为 375.84 ng/g。保护组中 AFB₁ 的产生量比感染组减少了 63.46%。可见, HAI2 不仅能抑制黄曲霉菌 *A. flavus* CGMCC 3.4409 的生长, 还可以减少感染黄曲霉菌样品中的 AFB₁ 含量。这些现象可能与 HAI2 中的 AFB₁ 降解酶以及一些抑制黄曲霉菌生长的代谢产物有关, 但具体机制还需进一步研究。

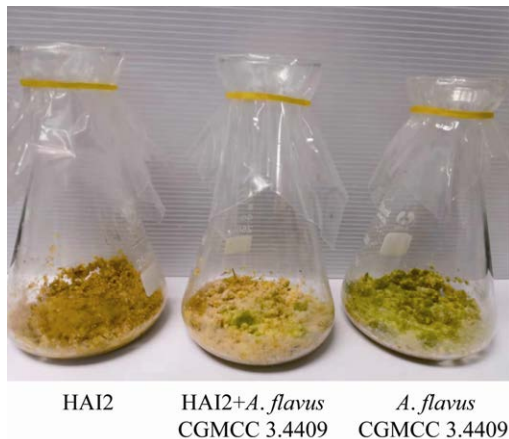


图 10 HAI2 对黄曲霉菌的抑制效果

Figure 10 Inhibition effect of HAI2 on *A. flavus* CGMCC 3.4409

3 结论

本研究通过富集培养, 从采自大亚湾水域的红树林污泥中分离得到了一株 AFB₁ 高效降解菌。通过形态学观察和 16S rRNA 基因序列鉴定为 *P. putida* HAI2。对其酶学性质进行分析后发现, *P. putida* HAI2 降解 AFB₁ 的活性物质主要存在于胞外上清中, 起作用的反应物质可能是分泌到胞外的蛋白质。AFB₁ 降解酶的最佳 pH 为 7.0, 最适温度为 37 °C, Cu²⁺ 和 Mn²⁺ 可以提高 AFB₁ 的降解率, Fe²⁺、Ca²⁺ 和 Zn²⁺ 会抑制 AFB₁ 的降解率, 24 h 对 100 ng/mL 的 AFB₁ 降解率为 71.52%。此外, *P. putida* HAI2 能够明显抑制黄曲霉的生长。因此, *P. putida* HAI2 不仅可以分泌降解 AFB₁ 的胞外蛋白, 而且可以合成抑制黄曲霉菌生长的物质, 具有较高的应用价值。

REFERENCES

- [1] Garcia MV, Parussolo G, Moro CB, Bernardi AO, Copetti MV. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated[J]. Food Microbiology, 2018, 73: 93-98
- [2] Leontopoulos D, Siafaka A, Markaki P. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B₁ production[J]. Food Microbiology, 2003, 20(1): 119-126
- [3] Yu LN, Wang MQ, Zhang CS, Xu NJ, Zhao YH, Bi J, Sun J, Gong KJ, Liu KC, Yang QL. Screening and identification of aflatoxin B₁ degradation strains[J]. Food Research and Development, 2018, 39(21): 167-171 (in Chinese)
- [4] Daniels JM, Massey TE. Modulation of aflatoxin B₁ biotransformation in rabbit pulmonary and hepatic microsomes[J]. Toxicology, 1992, 74(1): 19-32
- [5] Ono EYS, Ono MA, Funo FY, Medina AE, Oliveira IV TCRM, Kawamura O, Ueno Y, Hirooka EY. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA[J]. Food Additives & Contaminants, 2001, 18(8): 719-729
- [6] Verheecke C, Liboz T, Mathieu F. Microbial degradation of aflatoxin B₁: current status and future advances[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 1-9
- [7] Yang WH, Liu XH, Li WM, Li HX, Cao YS. Optimization of fermentation conditions for AFB₁-degrading enzyme production by *Pseudomonas stutzeri* F4[J]. Food Science, 2013, 34(9): 256-261 (in Chinese)
- [8] Guo YT, Zhang SB, Li N, Zhai HC, Lyu YY, Cai JP, Hu YS, Wang JS. Isolation and characterization of *pseudomonas aeruginosa* with aflatoxin B₁ degradation capacity and its detoxification application[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 40(3): 33-38,49 (in Chinese)
- [9] Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(1): 120-131
- [10] Wang Y, Chen XW. Study on aflatoxin B₁ in biodegradable peanut meal[J]. Feed Research, 2012(1): 80-81 (in Chinese)
- [11] Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, van Zyl WH. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(1): 47-52
- [12] Liu D. Study on interact of *Bacillus atrophaeus* to *Aspergillus flavus*[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013: 1-2 (in Chinese)

- [13] Guan X, He JB, Dong S, Zang J, Long M. Isolation, identification and preliminary degradation of aflatoxin B₁ degrading bacterial strain[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(2): 90-96 (in Chinese)
关心, 何剑斌, 董双, 臧健, 龙森. 黄曲霉毒素 B₁ 高效降解菌株的筛选鉴定及其降解[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 90-96
- [14] Zuo ZY, Liu DL, Hu YD, Hu R, Yao DS. Studies on constitutive and secretive expression of codon-optimized recombinant aflatoxin-detoxifying enzyme (rADTZ) in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2007, 9(5): 87-94 (in Chinese)
左振宇, 刘大岭, 胡亚冬, 胡熔, 姚冬生. 密码子优化的重组黄曲霉毒素解毒酶(rADTZ)在毕氏酵母中组成型分泌表达的研究[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(5): 87-94
- [15] Li B, Dong ZY, Chang WS. Degradation and application of aflatoxin B₁ by *Aspergillus niger*[J]. Feed Review, 2012(11): 6-10 (in Chinese)
李冰, 董征英, 常维山. 黑曲霉对黄曲霉毒素 B₁ 的降解与应用研究[J]. 饲料博览, 2012(11): 6-10
- [16] Eshelli M, Harvey L, Edrada-Ebel R, McNeil B. Metabolomics of the bio-degradation process of aflatoxin B₁ by actinomycetes at an initial pH of 6.0[J]. Toxins (Basel), 2015, 7(2): 439-456
- [17] Wang JW, Song GD, Yang RX, Han L, Zhao ZH. Isolation and analysis of aflatoxin degrading bacterial strain from compost soil[J]. China Feed, 2018(23): 18-23 (in Chinese)
王佳伟, 宋根娣, 杨瑞先, 韩露, 赵振华. 堆肥土壤中黄曲霉毒素降解菌株的筛选及活性分析[J]. 中国饲料, 2018(23): 18-23
- [18] Min Y, Xu L, Liu XY, Gao TY, Wang KM, Yang ZW. Rapid screening and identification of aflatoxin B₁ biodegradation strains[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(20): 5249-5251 (in Chinese)
闵勇, 徐琳, 刘晓艳, 高天雨, 王开梅, 杨自文. 黄曲霉毒素 B₁ 生物降解菌的快速筛选及鉴定[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5249-5251
- [19] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(23): 8746-8749
- [20] Sholberg PL, Ogawa JM, Inouye TS. Nitrogen source corrects a potato-dextrose agar medium deficient in supporting mycelial growth of *Monilinia* spp.[J]. Plant Disease, 1981, 65(8): 649-651
- [21] Gao ZJ. Determination of four aflatoxin in food by HPLC at the same time[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(10): 1803-1804 (in Chinese)
高志杰. HPLC 法同时测定食品中的 4 种黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1803-1804
- [22] Wen SX, Guan M, Zhou T, Cao H, Xie CF, Liu DL, Yao DS. Cloning, expression, purification and characterization of an aflatoxin-converting enzyme from *Armillaria tabescens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(9): 1212-1221
温思霞, 管敏, 周涛, 曹红, 谢春芳, 刘大玲, 姚冬生. 假蜜环菌黄曲霉毒素氧化酶的基因克隆、表达、纯化及酶学性质分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1212-1221 (in English)
- [23] Li JL, Huang J, Jin Y, Wu CD, Shen DZ, Zhang SY, Zhou RQ. Aflatoxin B₁ degradation by salt tolerant *Tetragenococcus halophilus* CGMCC 3792[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 121: 430-436
- [24] Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, van Zyl WH. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(1/2): 121-126
- [25] Guan S, Ji C, Zhou T, Li JX, Ma QG, Niu TG. Aflatoxin B₁ degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(8): 1489-1503
- [26] Raksha Rao K, Vipin AV, Hariprasad P, Anu KA, Venkateswaran G. Biological detoxification of aflatoxin B₁ by *Bacillus licheniformis* CFR1[J]. Food Control, 2017, 71: 234-241
- [27] Zhao LH, Guan S, Gao X, Ma QG, Lei YP, Bai XM, Ji C. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 147-155
- [28] Sangare L, Zhao YJ, Folly YME, Chang JH, Li JH, Selvaraj JN, Xing FG, Zhou L, Wang Y, Liu Y. Aflatoxin B₁ degradation by a *Pseudomonas* strain[J]. Toxins (Basel), 2014, 6(10): 3028-3040
- [29] Xu L, Eisa Ahmed MF, Sangare L, Zhao YJ, Selvaraj JN, Xing FG, Wang Y, Yang HP, Liu Y. Novel aflatoxin-degrading enzyme from *Bacillus shackletonii* L7[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(1): 36