

海洋巨大芽孢杆菌在培养基和花生中对黄曲霉产毒的抑制

李琦玉, 孔青*, 李倩婷, 管斌

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要:目的 研究海洋巨大芽孢杆菌在 PDA、MM 培养基和花生中对黄曲霉产毒的抑制。方法 采用酶联免疫吸附法和高压液相色谱荧光检测法测定培养基和花生中黄曲霉毒素 B1 含量。结果 PDA、MM 培养基培养的黄曲霉通过酶联免疫吸附法检测后, 实验组黄曲霉毒素 B1 含量分别在 5.5~158.1 pg/mL 和 2.2~10.3 pg/mL, 对照组毒素 B1 含量分别在 2407.2~2986.3 pg/mL 和 4.4~2755.6 pg/mL。通过高压液相色谱检测 28 °C 和 37 °C 培养的被黄曲霉侵染的花生, 实验组黄曲霉毒素 B1 含量均未检出, 对照组 28 °C 下, 黄曲霉毒素 B1 含量为 (8.588±0.322) μg/kg, 37 °C 下黄曲霉毒素未检出。结论 不同培养基中, 海洋巨大芽孢杆菌对黄曲霉产黄曲霉毒素均有抑制作用。黄曲霉在 28 °C 比 37 °C 更容易在花生上产毒, 海洋巨大芽孢杆菌对花生上黄曲霉产毒素有显著抑制作用。

关键词: 海洋巨大芽孢杆菌; 黄曲霉毒素; 酶联免疫吸附法; 高压液相色谱法

Inhibition of aflatoxin biosynthesis in media and peanuts by marine *Bacillus megaterium*

LI Qi-Yu, KONG Qing*, LI Qian-Ting, GUAN Bin

(School of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To study the effect of marine *Bacillus megaterium* on the aflatoxin biosynthesis in PDA, MM media and peanuts. **Methods** The aflatoxin B1 concentrations in media and peanuts were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay and high pressure liquid chromatography. **Results** With the method of enzyme-linked immunosorbent assay, the experimental groups' aflatoxin B1 levels in PDA and MM media were 5.5~158.1 pg/mL and 2.2~10.3 pg/mL, respectively; and the control groups' aflatoxin B1 concentrations were 2407.2~2986.3 pg/mL and 4.4~2755.6 pg/mL, respectively. Meanwhile, the experimental groups' aflatoxin B1 levels at 28 °C and 37 °C in peanuts could not be detected; and the control groups' aflatoxin B1 level at 28 °C was (8.588±0.322) μg/kg, by the method of high pressure liquid chromatography. **Conclusion** The marine *Bacillus megaterium* could inhibit aflatoxin production in different media. *Aspergillus flavus* could biosynthesize more aflatoxin B1 at 28 °C than at 37 °C. This strain of *Bacillus megaterium* could inhibit aflatoxin biosynthesis in peanuts significantly.

KEY WORDS: marine *Bacillus megaterium*; aflatoxins; enzyme-linked immunosorbent assay; high pressure liquid chromatography

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000823); 长江学者和创新团队发展计划

*通讯作者: 孔青, 男, 博士, 讲师, 主要从事食品安全方面的研究。E-mail: kongqing@ouc.edu.cn

1 引言

黄曲霉毒素(AF)是由真菌黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*A. parasiticus*)产生的一类具有强荧光性和高免疫吸附性的毒性次生代谢产物, 具有致癌、致畸作用^[1]。目前世界范围内已确定的黄曲霉毒素种类有 18 种之多, 其中黄曲霉毒素 B1 的毒性最高、危害最严重^[2]。黄曲霉毒素对哺乳动物尤其是人类威胁最大, 并且黄曲霉毒素性质稳定, 一旦污染, 很难消除, 所以世界各国及国际贸易组织对进出口食品、食用性材料作出了严格的限量规定。欧盟规定在花生、坚果、干果及谷类中的黄曲霉毒素 B1 含量不得高于 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3, 4]; 美国规定食品中黄曲霉毒素总量不超过 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。我国花生产量和出口量世界第一, 而黄曲霉毒素的含量经常高于欧盟的规定, 是我国花生出口的一大难题。对黄曲霉毒素快速检测及寻找效果显著、安全无毒的黄曲霉毒素去除方法, 是食品安全领域的热点研究^[6, 7]。黄曲霉毒素的检测主要有薄层层析法、高压液相色谱法、微柱法、超光谱法、化学免疫法等^[4]; 食品中黄曲霉毒素的去除常用物理法、化学法和生物法^[8]。物理法和化学法抑制曲霉生长和毒素合成虽然很有效, 但是这些方法的使用不可避免地带来食品营养的损失和较高的成本, 尤其是化学残留问题引起人们的极大关注, 所以生物去除法, 特别是利用拮抗微生物来抑制黄曲霉毒素的合成是近些年的研究热点, 是一种非常有前途的方法。

一株海洋巨大芽孢杆菌被证明可以显著抑制黄曲霉的生长^[9]。本论文采用酶联免疫吸附法^[10-12]和高压液相色谱法^[13-15]测定培养基和花生中黄曲霉毒素 B1 含量, 通过实验找出海洋巨大芽孢杆菌抑制黄曲霉产毒的最佳条件, 并为出口和产品保存提供可行性参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料及仪器

黄曲霉毒素 B1 标准品溶液, 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma); 黄曲霉(山东省花生研究所单世华研究员赠送); 海洋巨大芽孢杆菌(实验室保存菌株); PDA 培养基(Potato dextrose agar medium); 基本培养基(Minimal medium, MM); 1100LC 型高压液相自动色谱仪(Agilent); 黄曲霉毒素检测试剂盒(Beacon);

酶标仪(Gene Company Limited Power Wave XS2); 多功能净化柱(Pribolab); 恒温振荡箱(上海福玛实验设备有限公司); 超净工作台(苏净集团安泰公司); 3-18R 型高速冷冻离心机(美国 TOMOS 公司); 恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); 高温蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

2.2 酶联免疫法测定 PDA、MM 培养基中的黄曲霉毒素含量

2.2.1 培养基、黄曲霉孢子及海洋巨大芽孢杆菌制备

配置 PDA、MM 液体培养基各 12 瓶(250 mL 三角瓶), 各装 100 mL 培养基。其中一半为实验组, 一半为对照组, 见表 1。

在 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 下培养海洋巨大芽孢杆菌(用牛肉膏蛋白胨培养基)24 h, 采用 12000 r/min 离心 2 min, 梯度稀释后平板计数; 将所得巨大芽孢杆菌菌体分别放入 PDA、MM 培养基的实验组中, 手动振荡摇匀。后取适量黄曲霉孢子平板, 用无菌水、涂布棒进行刮取, 采用血球计数板计算 1 mL 孢子液中所含黄曲霉孢子个数, 直至配置成 10^9 个/mL 黄曲霉孢子悬浮液。于 PDA、MM 培养基实验组、对照组各加入 0.1 mL 10^9 个/mL 黄曲霉孢子悬浮液。将 PDA、MM 培养基分为 1~5 组, 各培养 1~5 d, 每天测定黄曲霉毒素含量。此实验重复三次。

2.2.2 黄曲霉毒素含量的测定

测定方法参考黄曲霉毒素检测试剂盒(Beacon)说明书, 略有改动。

将培养到预定天数的培养基取出后, 在无菌操作下各加入 20 mL 氯仿后高速搅拌 1 min, 静置 3 min。取 1.5 mL 离心管数只, 用移液器吸取 1 mL 底部氯仿于离心管中, 风干。待风干后, 各加入 1 mL 甲醇, 充分振荡摇匀。

取适当孔条于微孔板架上, 先加入 50 μL Aflatoxin-HRP 于微孔中, 之后加入 50 μL 黄曲霉毒素标准品及样品于相应微孔中, 后向微孔中加入 50 μL Rabbit Anti-Aflatoxin 溶液, 轻微振荡微孔板, 室温下孵育 10 min。后倾倒入微孔中溶液, 再将微孔中注满蒸馏水, 再倒掉, 重复 4 次, 最后一次清洗完后, 倒掉孔中溶液, 翻转微孔板在吸水纸上拍干。再向每孔中加入 100 mL Substrate 溶液, 室温下孵育 10 min, 后加入 100 mL Stop Solution, 用酶标仪 450 nm 检测吸光值, 每组三个平行。取黄曲霉毒素 B1 标准品质

表1 实验组和对照组培养基
Table 1 The media of experimental and control groups

培养基	实验组	对照组
PDA	海洋巨大芽孢杆菌(10^8 CFU/mL)+黄曲霉孢子(10^6 个/mL)	黄曲霉孢子(10^6 个/mL)
MM	海洋巨大芽孢杆菌(10^8 CFU/mL)+黄曲霉孢子(10^6 个/mL)	黄曲霉孢子(10^6 个/mL)

量浓度分别为 0, 2.0, 7.5, 25, 100 ng/mL 绘制以黄曲霉毒素质量浓度的对数为纵坐标(Y)、样品吸光值为横坐标(X)线性回归方程。

2.3 高压液相色谱法测定花生中黄曲霉毒素 B1 含量

2.3.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX型 SB-C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent); 流动相:水-甲醇-乙腈(50:40:10); 流速:1 mL/min; 进样量:25 μL; 柱温:30 °C; 检测器:荧光检测器, 激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm。

2.3.2 样品的制备与处理

将大小、质量均一的花生, 用 0.1%次氯酸钠浸泡 1 min 后, 用流水洗净、自然风干, 除去破皮、干瘪花生。用灭菌消毒后的打孔器在花生子叶上打孔, 孔径为 6 mm × 3 mm。准备实验组、对照组各两组, 每组花生 10 个, 且重量大致相同。向实验组中每个花生加入 20 μL 10^9 CFU/mL 海洋巨大芽孢杆菌菌液, 对照组中每个花生加入 20 μL 无菌水。1 h 后将实验、对照组中每个花生均加入 10 μL 10^6 个/mL 黄曲霉孢子悬浮液。实验、对照两组分别放入 28 °C 及 37 °C 培养箱中培养 168 h。

将培养 168 h 后的花生研磨成粉末状, 准确称取 4 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 16 mL 乙腈-水(21:4), 在电动振荡器振荡 10 min, 定性滤纸过滤, 收集滤液。移取 8 mL 滤液经多功能净化柱净化后, 移取 2 mL 净化液于具塞小瓶中, 用 60 °C 氮气吹干, 加入 200 μL 正己烷和 100 μL 三氟乙酸, 密闭混匀 30 s, 40 °C 衍生 15 min, 室温氮气吹干。用 200 μL 水-乙腈(17:3)溶解, 混匀 30 s 至液相色谱样品瓶中测定。

3 结果与分析

3.1 PDA、MM 培养基中的黄曲霉毒素浓度

酶联免疫检测法回归方程为: $Y = -0.25X + 0.3511$, $R^2 = 0.9859$, 线性范围为 0~100 ng/mL。并通过线性回归方程, 计算出 1 mL 培养基中所含黄曲霉毒素 ng 数。PDA 培养基属于半合成培养基, 含有丰富的营养,

是分离、培养真菌(包括曲霉)的常用培养基之一; 而 MM 培养基是基本培养基, 仅提供给曲霉最低必须的营养^[16]。结果表明, 此株海洋巨大芽孢杆菌在 PDA 和 MM 培养基中均可显著抑制黄曲霉毒素的生物合成($P < 0.01$)(图 1 和图 2), 说明抑制黄曲霉产毒素是此株巨大芽孢杆菌的生理特性, 与培养基成分相关性不明显。

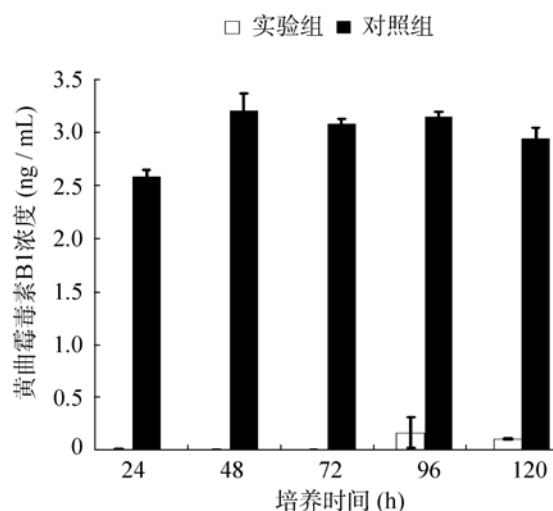


图1 PDA 培养基中黄曲霉毒素 B1 浓度

Fig. 1 The concentration of aflatoxin B1 in PDA medium

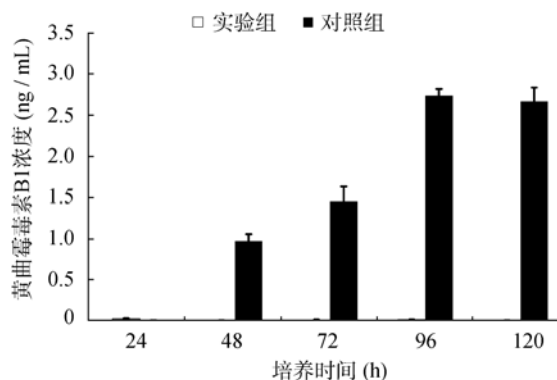


图2 MM 培养基中黄曲霉毒素 B1 浓度

Fig. 2 The concentration of aflatoxin B1 in MM medium

3.2 花生中黄曲霉毒素 B1 浓度

以 0, 5, 25, 50, 75 ng/mL 的黄曲霉毒素 B1 标准品绘制以黄曲霉毒素质量浓度为横坐标(X)、荧光吸

收峰面积为纵坐标(Y)的黄曲霉毒素线性回归方程: $Y=0.4099X-0.3319$, $R^2=0.9563$, 线性范围为 0~75 ng/mL。将处理好的样品依次经过高压液相色谱荧光器平行检测 3 次, 将所得数据处理并计算出每 kg 花生中所含黄曲霉毒素 μg 数(表 2)。结果表明, 37 °C 不适合黄曲霉产黄曲霉毒素, 所以实验组和对照组中的花生均未检出黄曲霉毒素 B1; 28 °C 是最适合黄曲霉产毒素的温度^[17], 对照组花生中黄曲霉毒素 B1 的含量达 8.588 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而在实验组花生中未检出黄曲霉毒素 B1。这说明此株海洋巨大芽孢杆菌在花生上也可显著抑制黄曲霉毒素的生物。

黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒利用抗体与抗原快速结合的原理, 能快速检测出食品或药品中是否有

毒素存在, 且易于操作^[18]。实验中, 采用黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒对液体培养基、固体花生中的黄曲霉毒素 B1 含量进行检测。结果发现, 该试剂盒(Beacon)只能检测出液体培养基中的黄曲霉毒素 B1 含量, 而在检测花生中黄曲霉毒素 B1 含量时误差较大。推断固体花生中可能含有某种物质能作为抗原与试剂盒中抗体结合, 致使最终不能准确、稳定检测出黄曲霉毒素 B1 含量。同时, 可能存在实验阶段花生用量少, 而试剂盒适用于工厂大规模处理花生时检测使用。所以在实验室检测花生中黄曲霉毒素 B1 含量存在较大误差, 故不能准确检测出毒素含量。所以黄曲霉毒素试剂盒在本实验中仅用于快速检测液体培养基中黄曲霉毒素 B1 含量。

表 2 花生中黄曲霉毒素浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)(mean \pm SD)
Table 2 The concentration of aflatoxin in peanuts ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (mean \pm SD)

温度(°C)	组别	黄曲霉毒素 B1 浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28	实验组	未检出
	对照组	8.588 \pm 0.322
37	实验组	未检出
	对照组	未检出

高压液相色谱法检测样品前, 样品经过衍生, 液相洗脱后, 所带的强荧光信号能很快被荧光检测器检测并在显示器上出现明显的物质峰, 提高检测含量准确性。高压液相检测法结果准确、稳定, 但检测步骤较繁琐、不易操作。

从样品检测结果可知, 黄曲霉在 37 °C 下不宜产毒, 但同时不适宜花生的保存, 而在 28 °C 产毒明显高于 37 °C。海洋巨大芽孢杆菌在 28 °C 下对产毒有显著的抑制作用。同时, 在 PDA 和 MM 液体培养基中, 海洋巨大芽孢杆菌显著抑制黄曲霉产毒素($P<0.01$)。

Tejada-Castañeda 等发现, 一株诺卡氏菌(*Nocardia corynebacteroides*)可以将黄曲霉毒素 B1 转化为其他低毒性代谢物, 从而可对被黄曲霉毒素污染的饲料减毒^[19]。Taylor 等^[20]和 Lapalikar 等^[21]则发现, 耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)和红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)通过产生一种依赖于 $F_{420}H_2$ 的还原酶来对黄曲霉毒素降解。通过分析可知, 除去外界条件, 海洋巨大芽孢杆菌可能通过抑制黄曲霉的生长来降低黄曲霉产生的毒素量, 或者产生某种代谢产物抑制黄曲霉产毒素基因的表达, 或者该代谢产物对黄曲霉毒素具有降解作用, 从而降低

或消除其毒性; 到底此株海洋巨大芽孢杆菌通过什么方式降低黄曲霉毒素的合成, 其机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*[J]. Annual Rev Phytopathol, 2011, 49: 107-133.
- [2] Yu JJ, Chang PK, Ehrlich KC, et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(3): 1253-1262.
- [3] Commission Regulation (EU) No 165/2010. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins[J]. Official J Eur Union, 2010, 53: 8-12.
- [4] 杨小丽, 韦日伟, 申红红, 等. 免疫亲和柱净化光化学衍生高压液相色谱-荧光检测法测定动物类药材中黄曲霉毒素[J]. 中国药业, 2011, 20(15): 4-5.
- [5] Williams WP, Windham GL, Buckley PM, et al. Southwestern corn borer damage and aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids[J]. Field Crops Res, 2005, 91: 329-336.
- [6] Ruston IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods[J]. Food Chem, 1997, 59(1):

- 57-67.
- [7] Chang PK, Horn BW, Dorner JW. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates[J]. Fungal Genet Biol, 2005, 42(11): 914-923.
- [8] 孔青, 翟翠萍, 林洪, 等. 粮油食品中黄曲霉毒素去除方法研究进展[J]. 粮食加工, 2011, 36(4): 47-50.
- [9] 孔青, 刘奇正, 于方塘, 等. 1株海洋芽孢杆菌抑制黄曲霉生长和毒素合成的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2010, 36(4): 387-392.
- [10] 刘艳丽, 程安春, 汪铭书. 黄曲霉毒素及其检测方法的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, 6: 15-17.
- [11] 张俊亭, 陈国光, 李治祥, 等. 玉米和花生中黄曲霉毒素 B1 酶联免疫快速分析方法[J]. 农业环境保护, 1998, 17(4): 170-173.
- [12] 王彩云, 王政纲, 云战友. 酶联免疫法测定食品和饲料中的黄曲霉毒素[J]. 食品工程, 2007, 4: 58-60.
- [13] 张英, 蔡志斌, 郑志伟. 超高压液相色谱法同时测定油炸食品中4种黄曲霉毒素[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1556-1558.
- [14] 王江蓉, 林华, 刘纯友. 高压液相色谱法检测粮油中黄曲霉毒素方法验证[J]. 粮食与油脂, 2011, 11: 36-38.
- [15] 吴燕, 朱怡平, 汪国权. 多功能柱净化-光化学柱后衍生高压液相色谱测定食品中黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1865-1866.
- [16] Käfer E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations[J]. Adv Genet, 1977, 19: 33-131.
- [17] Yu JJ, Fedorova ND, Montalbano BG, et al. Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 322: 145-149.
- [18] 宋娟, 王玉珍, 邓安平. 测定食品中呋喃它酮代谢物 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮的酶联免疫吸附法[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(2): 77-81.
- [19] Tejada-Castañeda ZI, Avila-Gonzalez E, Casaubon-Huguenin MT, et al. Biotransformation of aflatoxin-contaminated chick feed[J]. Poult Sci, 2008, 87: 1569-1576.
- [20] Taylor MC, Jackson CJ, Tattersall DB, et al. Identification and characterization of two families of F420 H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation[J]. Mol Microbiol, 2010, 78: 561-575.
- [21] Lapalikar GV, Taylor MC, Warden AC, et al. F420H₂-dependent degradation of aflatoxin and other furanocoumarins is widespread throughout the Actinomycetales[J]. PLoS One, 2012, 7, e30114. doi:10.1371/journal.pone.0030114.

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



李琦玉, 男, 本科, 研究方向: 黄曲霉毒素的检测。

E-mail: lqyaizz@gmail.com



孔青, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品中黄曲霉毒素的检测和去除。

E-mail: kongqing@ouc.edu.cn