

“粮油真菌毒素控制与营养品质调控” 特约专栏文章之一

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.05.001

铜绿假单胞菌 M19 降解黄曲霉毒素 B₁ 的产物研究

王佳兴, 谢岩黎✉, 宋娟娟, 马卫宾, 孙淑敏, 李倩

(河南工业大学粮油食品学院, 河南省粮油食品安全检测与控制重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要: 以实验室筛选保藏的黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 降解菌 M19 产生的降解酶 PADE 为对象, 对其 AFB₁ 降解液进行薄层色谱及荧光光谱分析 (LC-MS), 分析降解产物可能的结构变化, 并利用液相质谱检测 AFB₁ 降解产物。薄层色谱检测结果: 有机相和水相降解液均未检测到新的荧光吸收物质, 表明降解产物没有荧光吸收; 荧光光谱检测结果: AFB₁ 降解产物的荧光明显减弱; 液相质谱检测结果: 发现质荷比为 227.18 的物质 P。结果推断: AFB₁ 降解过程中内酯键断裂, 产生一个分子量为 226 的降解产物 P, 利用 Xcalibur 软件分析其分子式为 C₁₄H₁₀O₃, 并根据 AFB₁ 降解后的 LC-MS 图谱分析以及 AFB₁ 降解产物的相关文献对降解途径进行假设。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 降解酶; 降解产物; Xcalibur 软件; 荧光吸收物质

中图分类号: TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)05-0001-05

网络首发时间: 2020-08-20 14:55:29

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20200820.1009.004.html>

Analysis of the Degradation Products of Aflatoxin B₁ by *Pseudomonas aeruginosa* M19

WANG Jia-xing, XIE Yan-li✉, SONG Juan-juan, MA Wei-bin, SUN Shu-min, LI Qian

(College of Food Science and Technology, Henan Key Laboratory of Cereal and Oil Food Safety Inspection and Control, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: A degrading enzyme PADE produced during the degradation of aflatoxin B₁ (AFB₁) by the laboratory screening bacteria M19 was selected as the subject in this study. Thin layer chromatography and fluorescence spectrum analysis were performed to analyze possible structural changes of products in the AFB₁ degradation solution. Mass spectrometric were further used to detect the AFB₁ degradation products. The results of thin layer chromatography showed that no new fluorescent absorbent substance was detected in the organic phase degradation solution, and no absorbent substance was detected in the aqueous phase degradation solution, indicating that the degradation product did not have fluorescence absorption. The fluorescence spectrum detection results showed that the fluorescence of the AFB₁ degradation product was decreased obviously. The mass spectrometry results showed that a substance P with a mass-to-charge ratio of 227.18 was found. Based on all the results, it can be concluded that the lactone bond was broken during the degradation of AFB₁, and a degradation product P with a molecular weight of 226 was generated. The

收稿日期: 2020-06-10

基金项目: 河南省高校科技创新团队计划资助 (20IRTSTHN023); 河南省重点研发与推广专项 (192102310254)

作者简介: 王佳兴, 女, 1996 年出生, 硕士研究生, 研究方向为食品安全控制与检测分析。Email: wjxk1k@126.com.

通讯作者: 谢岩黎, 女, 1971 年出生, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为食品加工过程中安全及品质控制。Email: ylxie@haut.edu.cn.

molecular formula was $C_{14}H_{10}O_3$ as analyzed by Xcalibur software. The degradation pathway was hypothesized.

Key words: aflatoxin B₁; degrading enzyme; degradation products; Xcalibur software; Fluorescent absorber

黄曲霉毒素污染是粮食安全面对的巨大挑战之一,其广泛存在于花生、玉米和高粱等农作物中。其中 AFB₁ 具有极强的毒性,致癌性和致突变性,对人类健康造成严重威胁^[1]。微生物降解 AFB₁ 以其反应条件温和、成本低等优点已被广泛研究,对于降解产物研究的缺乏成为了限制其走向应用的主要障碍。目前,已经发现的降解产物有十几种,其中,有命名的分别是黄曲霉毒醇、AFB_{2a}、AFD₁、AFD₂、AFD₃、邻苯二甲酸酐、8,9 不饱和碳的 AFB₁、AFB₁-8,9-二氢二醇。AFB_{2a} 作为微生物降解 AFB₁ 的降解产物早在 1972 年就被发现。有学者针对 AFB₁ 的降解途径以及降解产物进行了研究, Samuel 等^[2]的研究表明,孵育 24 h 后恶臭假单胞菌将 AFB₁ 降解至不可检测水平。利用气相色谱质谱(GC-MS)和傅立叶变换红外光谱(FT-IR)分析发现, AFB₁ 降解并转化为 AFD₁, AFD₂ 和 AFD₃ (推测是通过内酯和呋喃环的羰基部分的损失)。在另外一项研究中, WU^[3]利用红外光谱(IR)表征了导致黄曲霉毒素(AF)完全降解的是一种酶,其负责打开 AFB₁ 的呋喃环,导致随后的水解。Taylor 等^[4]鉴定并表征了耻垢分枝杆菌的 F420H2 依赖性还原酶,该酶催化 AF 降解。这些酶不同于早先报道降解 AF 的酶,其通过还原 α, β -不饱和酯,导致内酯环不稳定,从而达到解毒的作用。Wang 等^[5]从 *Phanerochaetesordida* YK-624 中纯化的锰过氧化物酶(MnP)在 48 h 后能够降解 86%的 AFB₁。随后的分析表明, AFB₁ 首先被 MnP 氧化为 AFB₁-8,9-环氧化物,然后水解为 AFB₁-8,9-二氢二醇,在随后的水解步骤中打开呋喃环,且检测结果显示降解产物诱变活性降低。Wang 等^[6]的研究发现,经过诱导的地衣芽孢杆菌(BL010)的粗酶液可以有效降解 AFB₁ (降解率达到 97.3%),利用四极杆飞行时间液相色谱-质谱(LC-Q-TOF/MS)检测到分子式为 $C_{12}H_{14}O_4$ 的降解产物。Eshell 等^[7]通过液相色谱-质谱(LC-MS)和 FT-IR 对红曲霉菌株(ATTC 4277)降解 AFB₁ 的反应途径进行了全面分析。假设 AFB₁ 通过一系列反应被降解以

形成具有分子式 $C_{13}H_{16}O_4$ 和质量为 236.104 9 的芳族化合物,并对降解过程进行了有力推断。

在最新的 Li^[8-9]的两篇报道中,总共发现了八种降解产物, m/z 207.0 ($C_{11}H_{10}O_4$) 比 AFB₁ 分子少了 $C_6H_2O_2$, 是由于 AFB₁ 的酯键破坏,加氢形成乙醚键; AFB₁ 的内酯环断裂,失去甲基和两个一氧化碳,产生代谢物 m/z 243.06 ($C_{14}H_{10}O_4$), 再由羟基损失和双键断裂继而形成 m/z 229.09 ($C_{14}H_{12}O_3$), 随后打开苯环失去一氧化碳,醚键断裂形成 m/z 201.09 ($C_{13}H_{12}O_2$); $C_{14}H_{12}O_3$ 经过醚键断裂脱氧,以及苯环加成反应形成产物 m/z 221.15($C_{14}H_{20}O_2$); m/z 361.09 ($C_{18}H_{16}O_8$) 比 AFB₁ 分子多 CH_4O_2 , 由呋喃环左侧的羟基和甲氧基的加成反应形成,继而酯键断裂及羟基和甲氧基的断裂,苯环上的加成反应形成 m/z 277.14 ($C_{16}H_{20}O_4$), m/z 221.15 ($C_{14}H_{20}O_2$) 比 $C_{16}H_{20}O_4$ 少一个 C_2O_2 分子,是由于酮基和甲氧基的断裂。

通过质谱检测,未检测到任何降解产物的报道也有很多(Alberts 等^[10-11], Farzaneh 等^[12], Sangare 等^[13], RakshaRao 等^[14])。同样, Xia 等^[15]分离得到具有 AFB₁ 降解能力的枯草芽孢杆菌, AFB₁ 降解后利用质谱未检测到任何降解产物,他们推测降解反应可能是多种酶在共同发挥作用,将 AFB₁ 降解为不同于本身性质的物质。基于实验室筛选保藏的 AFB₁ 降解菌 M19 产生的 AFB₁ 降解酶 PADE,本课题组已对降解产物的致突变性和细胞毒性进行了研究,结果显示, AFB₁ 降解后致突变性和细胞毒性均明显降低。本研究进一步对 AFB₁ 降解液进行薄层色谱及荧光光谱分析,分析降解产物可能的结构变化,通过液质检测 AFB₁ 降解产物。对于降解产物的研究为细菌 M19 和降解酶 PADE 降解 AFB₁ 在食品工业及饲料产业中的应用提供理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

WD-9403C 薄层色谱扫描仪:北京六一仪器厂; F-7100 荧光分光光度计:日本株式会社日立

高新技术科学那珂事业所；实验所用氯仿、丙酮（分析纯）等试剂：洛阳昊华化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 薄层色谱 (TLC) 检测降解产物

测试样品：AFB₁ 标准溶液 (2.5 μg/mL)；降解反应进行后，通过萃取分层分别获得有机相及水相，有机相通过氮气吹干重新溶解在展开剂里，水相通过超滤去除酶蛋白，即可点样进行薄层色谱分离，同时以甲醇代替 AFB₁ 经同样处理作为对照。

按照实验样品大小将硅胶板裁成合适尺寸，设置好点样的位置，取样品 10 μL 点在硅胶板相应的位置上，将点好样品的溶剂吹干，硅胶板斜放于展开剂（氯仿：丙酮=85：55）^[16]中，展开剂浸没薄层板 7~8 mm，待展开剂前沿上升到硅胶板的另一边缘将板小心取出。将晾干的薄层板置于 365 nm 紫外灯下观察，记录荧光斑点的位置。

1.2.2 降解产物的荧光光谱分析

将 25 μL 的 AFB₁ 与 975 μL 的 PADE 溶液混合进行降解反应，用二氯甲烷萃取有机相在氮气下吹干，重新溶解在甲醇水溶液中（甲醇：水=1：1），在荧光分光计下，设置激发波长 365 nm，扫描发射光谱^[17-18]，AFB₁ 与磷酸盐缓冲液混合作为对照组。

1.2.3 液质检测降解产物

将 25 μL 的 AFB₁ 与 975 μL 的 PADE 溶液混合进行降解反应，分别在降解 0、1、3 d 时终止反应，萃取有机相，用液质联用仪检测。液质采用 Thermo Q Exactive Plus LCMS 系统，ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1×100 mm, 1.8 μm)。

1.3 数据处理

利用 Origin 2018 专业软件绘图，对产物荧光特性的减弱进行表征，方差分析的显著性水平是 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱检测分析

TLC 薄层色谱扫描图显示 (图 1)，经过降解后，AFB₁ 的荧光特性减弱 (仍有部分毒素残留)，RakshaRao 等^[14]也发表了相似的结论，有机相降解液未检测到新的荧光吸收物质，水相降解液也

未检测到吸收物质，表明降解产物没有荧光吸收。

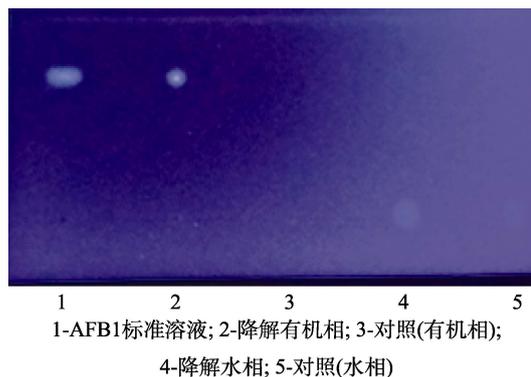


图 1 降解 AFB₁ 的 TLC 分析
Fig.1 TLC analysis of degradation of AFB₁

2.2 降解产物的荧光光谱分析

AFB₁ 经 PADE 降解后 (图 2)，产物的荧光特性减弱 (仍有部分 AFB₁ 未降解)。AF 的荧光特性与其结构中的内酯环有关，内酯环断裂会导致荧光消失^[19]，则可推测此降解反应是 AFB₁ 的内酯环裂解。而筛选铜绿假单胞菌 M19 是采用香豆素为碳源的培养基筛选而来，内酯环是香豆素结构的一部分，进一步证实了 PADE 对 AFB₁ 的作用位点是内酯环。相同的结论有 Samuel 等^[2]，Motomura 等^[20]，Guan 等^[21]，徐丹^[17]，蔡国林等^[18]的研究。图中实验组的荧光光谱较对照组向右 (低能量方向) 移动，可能是用激发波长激发发射光谱，发射光谱的最高峰有能量损失，或物质结构改变分子重排消耗了能量，发射光谱的峰向长波长方向移动。

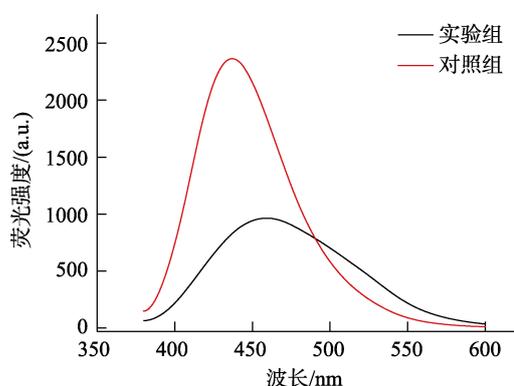


图 2 PADE 对 AFB₁ 荧光特性的影响
Fig.2 Effect of PADE on the fluorescence characteristics of AFB₁

2.3 液质联用检测 AFB₁ 降解产物

根据 AFB₁ 降解后的 LC-MS 图谱分析以及

AFB₁ 降解产物的相关文献, 发现在降解的过程中, 在保留时间 7.85 min 附近, 出现一质荷比为 227.18 的物质 P, 其峰面积逐渐增大 (表 1), 可视为降解产物; AFB₁ 的保留时间为 10.01, 随着降解时间的增加, 其峰面积逐渐降低, 含量逐渐减少 (表 1)。根据物质 P 的一级质谱图 (图 3), 利用 Xcalibur 软件分析其分子式为 C₁₄H₁₀O₃。与 Li^[8]报道的降解产物 C₁₄H₁₂O₃ 相比少了两个氢原子, 我们推测, 可能在反应过程中只发生了羟基损失但双键并未断裂。AFB₁ 经过降解酶 PADE 作用后, 其内酯环断裂, 失去甲基和两个一氧化碳, 并发生羟基损失 (图 4)。这符合我们之前的判断, 此降解反应是 AFB₁ 的内酯环裂解, 但此结果需

要进一步验证。本研究中并未得到任何中间产物, 分析原因, 可能由于时间点选取的单一性, 导致我们并未观察到降解过程中的其他中间产物。在进一步的实验中, 我们期望通过观察多个不同降解时间点的产物组成, 并通过质谱来探索具体且详尽的 AFB₁ 降解机制。

表 1 降解过程中峰面积的变化
Table 1 Change of peak area during degradation

降解	AFB ₁		降解产物 P	
	保留时间/min	峰面积 (A)	保留时间/min	峰面积 (A)
0	9.98	1.79×10 ⁸	7.85	1.57×10 ⁹
1	10.02	0.97×10 ⁸	7.83	2.85×10 ⁹
3	10.01	0.20×10 ⁸	7.89	3.34×10 ⁹

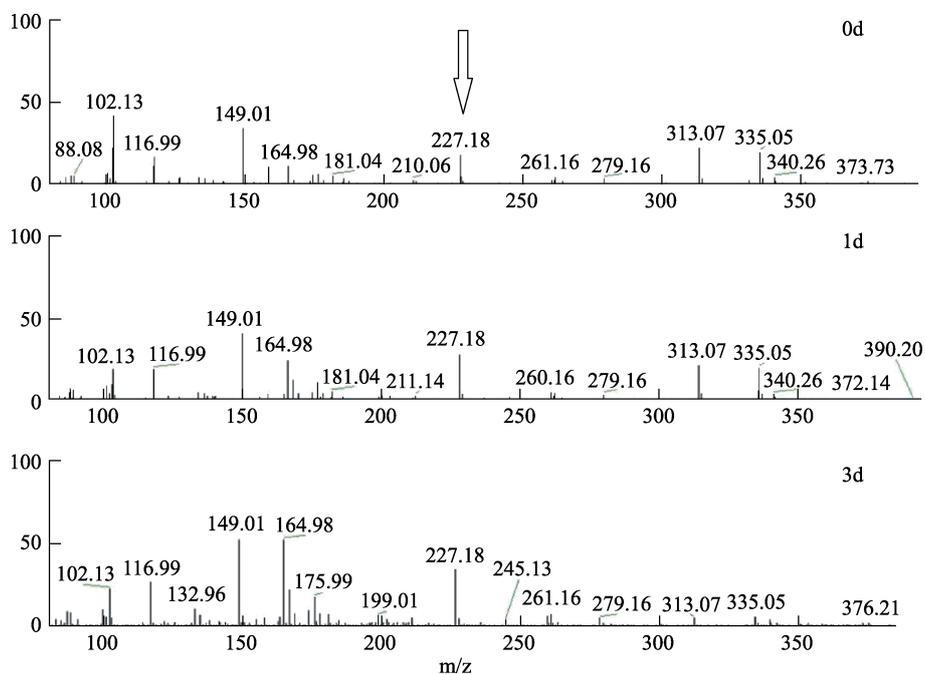


图 3 物质 P 的质谱图

Fig.3 Mass spectrum of substance P

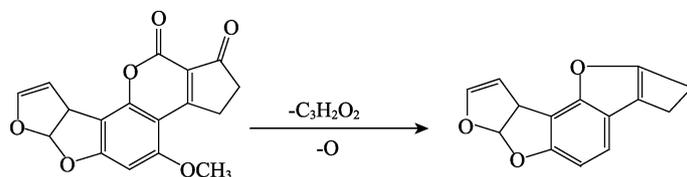


图 4 推断的 AFB₁ 可能降解途径

Fig.4 Proposed scheme of AFB₁ degradation

3 结论

通过对 AFB₁ 降解液进行薄层色谱和荧光光谱分析, 发现降解后荧光减弱, 表明了 AFB₁ 降解过程中内酯键的断裂; 结合薄层色谱和荧光光

谱分析, 液质检测发现一分子量为 226 的降解产物, 利用 Xcalibur 软件分析其分子式为 C₁₄H₁₀O₃, 并对其降解途径进行推测, AFB₁ 经过降解酶 PADE 作用后, 其内酯环断裂, 失去甲基和两个一氧化碳, 并发生羟基损失。

在前期的工作中,本课题组已对于降解产物的致突变性和细胞毒性进行了研究,结果显示,AFB₁降解后致突变性和细胞毒性均明显降低。本研究已对 AFB₁降解产物和降解途径进行了初步的阐释。这为 AFB₁降解菌 M19 和降解酶 PADE 降解 AFB₁在食品工业及饲料产业中的应用提供理论依据和实践基础。在进一步的实验中,我们期望通过观察多个不同降解时间点的产物组成,并通过质谱来探索具体且详尽的 AFB₁降解机制。

参考文献:

- [1] 宁梦鸽,谢岩黎,孙淑敏,等.降解黄曲霉素 B₁土曲霉发酵工艺优化的研究[J].粮油食品科技,2020,28(5):1-7. <https://doi.org/10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.05.004>. (网络首发)
- [2] SAMUEL M S, SIVARAMAKRISHNA A, MEHTA A. Degradation and detoxification of aflatoxin B₁ by *Pseudomonas putida*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 86: 202-209.
- [3] WU Q, JEZKOVA A, YUAN Z, et al. Biological degradation of aflatoxins[J]. Drug Metabolism Reviews, 2009, 41(1): 1-7.
- [4] TAYLOR M C, JACKSON C J, TATTERSALL D B, et al. Identification and characterization of two families of F420H₂-dependent reductases from Mycobacteria that catalyze aflatoxin degradation[J]. Molecular Microbiology, 2010, 78(3): 561-575.
- [5] WANG J, OGATA M, HIRAI H, et al. Detoxification of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624[J]. Fems Microbiology Letters, 2011, 314(2): 164-169.
- [6] WANG Y, ZHANG H, YAN H, et al. Effective biodegradation of aflatoxin B₁ using the bacillus licheniformis (BL010) strain[J]. Toxins, 2018, 10(12): 1-16.
- [7] ESHELLI M, HARVEY L, EDRADA-EBEL R, et al. Metabolomics of the bio-degradation process of aflatoxin B₁ by actinomycetes at an initial pH of 6.0[J]. Toxins, 2015, 7(2): 439-456.
- [8] LI J, HUANG J, JIN Y, et al. Aflatoxin B₁ degradation by salt tolerant *Tetragenococcus halophilus* CGMCC 3792[J]. Food And Chemical Toxicology, 2018, 12: 430-436.
- [9] LI J, HUANG J, JIN Y, et al. Mechanism and kinetics of degrading aflatoxin B₁ by salt tolerant *Candida versatilis* CGMCC 3790[J]. Journal Of Hazardous Materials, 2018, 359: 382-387.
- [10] ALBERTS J F, GELDERBLOM W C A, BOTHA A, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes[J]. International Journal Of Food Microbiology, 2009, 135(1): 47-52.
- [11] ALBERTS J F, ENGELBRECHT Y, STEYN P S, et al. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures[J]. International journal of food microbiology, 2006, 109(1-2): 121-126.
- [12] FARZANEH M, SHI Z-Q, GHASSEMPOUR A, et al. Aflatoxin B₁ degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran[J]. Food Control, 2012, 23(1): 100-106.
- [13] SANGARE L, ZHAO Y, FOLLY Y M E, et al. Aflatoxin B₁ degradation by a pseudomonas strain[J]. Toxins, 2014, 6(10): 3028-3040.
- [14] RAO K R, VIPIN A V, HARIPRASAD P, et al. Biological detoxification of Aflatoxin B₁ by *Bacillus licheniformis* CFR1 [J]. Food Control, 2017, 71(2): 34-41.
- [15] XIA X, ZHANG Y, LI M, et al. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B₁ biodegradation capability[J]. Food Control, 2017, 75(9): 2-8.
- [16] 邵帅,戴军,杜馨.降解黄曲霉毒素 B₁菌株的发酵条件优化及降解机制[J].食品科学,2016,37(5):138-143.
- [17] 徐丹.酿造酱油中黄曲霉毒素 B₁的产生及其控制研究[D].江南大学,2012.
- [18] 蔡国林,徐铭乾,李秋.解淀粉芽孢杆菌黄曲霉毒素 B₁裂解酶的分离纯化及鉴定[J].食品与发酵工业,2015,41(12): 26-30.
- [19] LEE L S, DUNN J J, DELUCCA A J, et al. Role of lactone ring of aflatoxin B₁ in toxicity and mutagenicity[J]. Experientia, 1981, 37(1): 16-17.
- [20] MOTOMURA M, TOYOMASU T, MIZUNO K, et al. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*[J]. Microbiological research, 2003, 158(3): 237-242.
- [21] GUAN S, ZHAO L, MA Q, et al. In vitro efficacy of *myxococcus fulvus* ANSM068 to biotransform Aflatoxin B₁[J]. International Journal Of Molecular Sciences, 2010, 11(10): 4063-4079

备注:本文的彩色图表可从本刊官网(<http://lyspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。

(审核:伍松陵)