

酿酒酵母抗氧化相关基因突变体对黄曲霉毒素 B₁ 的清除作用

史 锋¹, 黄宇啸¹, 李永富^{*2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 黄曲霉毒素(AF)是粮食作物和饲料原料中容易污染的一种强毒性和强致癌性物质,酿酒酵母具有毒素清除功能。利用 HPLC 分析了酿酒酵母野生菌 BY4742 及三株关键的抗氧化相关基因缺失菌 *zwf1*Δ、*sod2*Δ、*glr1*Δ 对黄曲霉毒素 B₁ 的清除能力。结果表明,在 PBS 缓冲液中存活和死亡的细胞对 AFB₁ 的清除率分别为 74%~76%和 71%~73%,说明酵母细胞对 AFB₁ 的清除以生物吸附作用为主。在培养基中,3 种突变菌活细胞对 AFB₁ 的清除率发生不同程度的降低,其中 *glr1*Δ 的 AFB₁ 清除能力下降最明显,其次是 *sod2*Δ,而 *zwf1*Δ 下降最少,说明这些关键的抗氧化基因的缺失会影响细胞在生长状态下对 AFB₁ 的清除作用。

关键词: 黄曲霉毒素; 酿酒酵母; 抗氧化基因; 生物脱毒

中图分类号: TS 26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0468-05

Detoxification of Aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* Mutants of Anti-Oxidative Relating Genes

SHI Feng¹, HUANG Yu-xiao¹, LI Yong-fu^{*2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Aflatoxins are a group of mycotoxins with strong mutagenic and carcinogenic properties. Various commodities including crop and feed materials are easy to be contaminated with aflatoxin. *Saccharomyces cerevisiae* have been reported to bind or degrade aflatoxin. Here, detoxification of aflatoxin B₁ (AFB₁) by wild-type strain of *S. cerevisiae* (BY4742) and three mutants of anti-oxidative relating genes (*zwf1*Δ, *sod2*Δ and *glr1*Δ) were determined by HPLC. In PBS buffer, AFB₁ binding abilities of viable and dead cells were 74%—76% and 71%—73%, respectively, indicating AFB₁ was removed by yeast cells mainly through cell adsorption. In YPD medium, clearance of AFB₁ by three mutant viable cells reduced, while that by wild-type BY4742 remaining high. AFB₁ binding ability of *glr1*Δ decreased most seriously, then was that of *sod2*Δ and *zwf1*Δ. Thus, the deletion of critical anti-oxidative relating genes would decrease the AFB₁ binding ability of *S. cerevisiae* growing cells.

Key words: aflatoxin, *Saccharomyces cerevisiae*, anti-oxidative gene, detoxification

收稿日期: 2011-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870056)。

作者简介: 史锋(1970—),女,江苏丹阳人,工学博士,副教授,主要从事微生物化与分子生物学研究。E-mail: shifeng@jiangnan.edu.cn

*通信作者: 李永富(1969—),男,江苏盱眙人,工学硕士,副教授,主要从事粮食资源的综合利用研究。

E-mail: liyf@jiangnan.edu.cn

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF)是黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉菌(*A. parasiticus*)等在适宜的温度、湿度及氧气条件下产生的次级代谢产物^[1],广泛存在于污染的粮食作物和饲料原料中,尤以霉变的花生、玉米及谷类含量最多。AF 的污染是全球性的,在发展中国家尤为严重^[2]。1993 年 AF 被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物,是目前认为的毒性和致癌性最强的天然毒素之一,在食品中的最高限量被规定为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。AF 具有致癌、致突变、致畸和免疫抑制作用,并兼具急性毒性和慢性毒性,尤会引发肝癌,因此对全民的健康危害很大。更为严重的是,AF 的耐热性很强,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 h 也不被全部破坏,280 $^{\circ}\text{C}$ 高温下才会裂解,通常的烹调条件不能对其产生破坏。AF 有多种结构形式,包括 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 等,其中 AFB₁ 是毒性最强、也是食品中污染最多的 AF。

由于 AF 的污染情况越来越令人担忧,因此迫切需要寻找有效的方法来控制和去除 AF。这可以通过提高谷物的质量和储存状况来达到,也可以用各种吸附剂改变毒素在人体中的可得性^[3],即通过防霉变、去毒素两方面来完成对 AF 的控制和清除。防霉变主要包括选育抗霉菌的优良品种生产农作物,控制霉菌生长所需的湿度、温度及氧气等条件,以及利用霉菌吸附剂或化学防霉剂防止霉菌污染等。去毒素主要包括利用化学或生物方法对 AF 进行体外体内吸附或转化,如多孔性真菌毒素吸附剂、益生菌或其结构成分、腐殖酸、叶绿酸等;或通过干预人体内的毒素代谢酶来调节毒素在体内的代谢活化与解毒过程。

在这些方法中,采用益生菌如乳酸菌、双歧杆菌、酿酒酵母等对 AF 进行生物吸附或转化具有独特的优势。益生菌不仅可以在体外清除 AF,还可能在动物细胞内或动物体内清除 AF^[4-5]。益生菌结合 AFB₁ 后对肠粘液的结合力下降,从而可携带 AFB₁ 从肠道解离,并最终排出体外。酿酒酵母是重要的工业发酵微生物,在工业酿造产品如葡萄酒中,它能去除微量的生物毒素,如赭曲霉毒素 A 的污染^[6]。酿酒酵母还能减少 AFB₁ 对小鼠的毒性,并显示出对污染玉米中 AFB₁ 的强效吸附能力^[7]。有研究表明,酿酒酵母的压力感应基因被破坏后,对真菌毒素变得敏感^[8]。由于氧化压力是酿酒酵

母面临的主要压力之一,酿酒酵母拥有一套由多种还原剂和多种酶、蛋白质组成的氧化压力反应系统,为了了解这个系统在毒素清除中的作用,分析了酿酒酵母野生菌 BY4742 与 3 株关键的抗氧化基因缺失菌在不同存活状态下对 AFB₁ 的清除能力。

1 材料与方法

1.1 培养基

YPD 培养基:质量浓度为 1 g/dL 的酵母抽提物,2 g/dL 胰蛋白胨,2 g/dL 葡萄糖,pH 值 5.0,需要时添加 0.2 mg/mL G418。固体培养基中加入 2 g/dL 琼脂。

1.2 酿酒酵母菌株

研究所用酿酒酵母菌株均来自于 EU-ROSCARF。突变菌 *zwf1 Δ* 、*sod2 Δ* 、*glr1 Δ* 是在野生菌 BY4742 的基础上,分别以 *kanMX4* 置换 *ZWF1*、*SOD2* 或 *GLR1* 基因而构建出的基因缺失体。

1.3 酵母细胞对 AFB₁ 的结合能力测试

2 mg/mL AFB₁ 储液:将 1 mg AFB₁ (Sigma) 分散于 0.5 mL 苯-乙腈(97:3)中;2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB₁-PBS 溶液:将 2 mg/mL AFB₁ 储液用 pH 7.3,0.1 mol/L PBS 缓冲液稀释 1 000 倍;2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB₁-YPD 培养基:将 2 mg/mL AFB₁ 储液用 YPD 培养基稀释 1 000 倍。

各种酵母细胞在 YPD 培养基中培养至对数期中末期,收集 1×10^8 个细胞,用无菌水洗后,分散于 1.0 mL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB₁-PBS 溶液或 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB₁-YPD 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置保温一定时间,收集上清,用于测定未被活细胞结合的 AFB₁ 含量。细胞沉淀分散于 PBS 中,振荡保温,收集上清,用于测定活细胞结合的 AFB₁ 含量。

另外,在收集了 1×10^8 个细胞并洗后, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min,将细胞分散于 1.0 mL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB₁-PBS 溶液中,30 $^{\circ}\text{C}$ 静置保温一定时间,测定未被死细胞结合和死细胞结合的 AFB₁ 含量。

1.4 AFB₁ 的 HPLC 分析

将收集的样品冷冻干燥 24 h,然后各加入 200 μL 正己烷和 200 μL 三氟乙酸,立即旋紧盖子,涡旋 30 s。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中衍生 15 min,之后用氮气吹干混合物,加入 400 μL 水-乙腈(体积比 85:15)溶解残余物并涡旋 30 s,离心取上清,进行 HPLC(安捷

伦 1100) 分析^[9]。

HPLC 色谱柱: Benetnachs ODS (4.6 mm×250 mm×12 nm, 5 μm); **流动相:** 乙腈-水 [乙腈体积分数 15%~40% 10 min, 40% 保持 10 min]; **体积流量:** 0.7 mL/min; **进样量:** 20 μL; **柱温:** 25 °C; **检测器:** 荧光检测器; **检测波长:** Ex 360 nm, Em 440 nm。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母活细胞和死细胞对 AFB₁ 的清除能力

为了了解酿酒酵母对 AFB₁ 的清除性能是否受细胞存活状态的影响, 我们首先测定了酵母活细胞和死细胞在 PBS 缓冲液中对 AFB₁ 的结合能力。

4 种酿酒酵母活细胞对 AFB₁ 的清除率为 74%~76% (图 1(a)); 经高压灭菌后, 4 种酵母细胞对 AFB₁ 的清除率维持在 71%~73% 之间 (图 1(b)), 略低于活细胞对 AFB₁ 的清除率; 且在 12 h 和 24 h 时, 各菌株对 AFB₁ 的清除率也基本保持不变。说明酿酒酵母对 AFB₁ 的清除以吸附作用为主, 而生物转化作用很弱, 这与文献报道的酵母细胞壁就具有真菌毒素脱毒功能相一致^[10]。

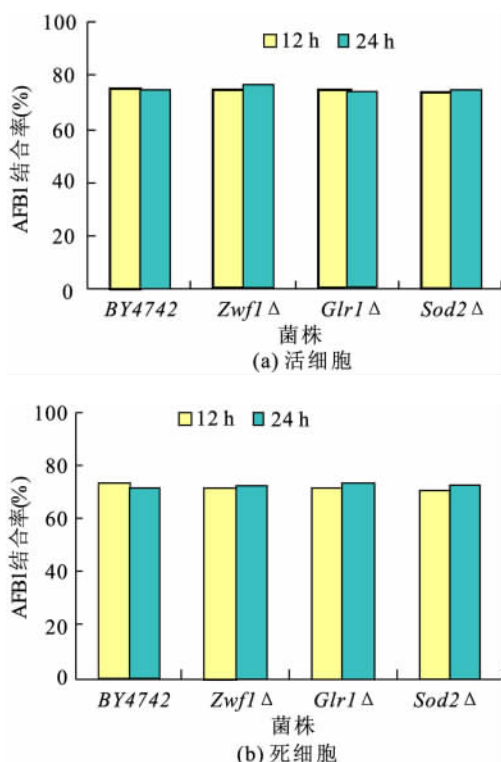


图 1 酿酒酵母对 PBS 缓冲液中 AFB₁ 的结合能力

Fig. 1 Binding of AFB₁ in PBS buffer by *Saccharomyces cerevisiae*

2.2 酿酒酵母活细胞在培养基中对 AFB₁ 的清除能力

考虑到在缓冲液中处于静息状态的活细胞和在培养基中处于生长状态的活细胞可能会具有不同的 AFB₁ 清除能力, 于是我们又测定了在 YPD 培养基中, 野生菌 BY4742 和 3 种与抗氧化有关的基因缺失菌 *zwf1Δ*、*sod2Δ*、*glr1Δ* 对溶液内 AFB₁ 的结合能力, 结果见图 2。

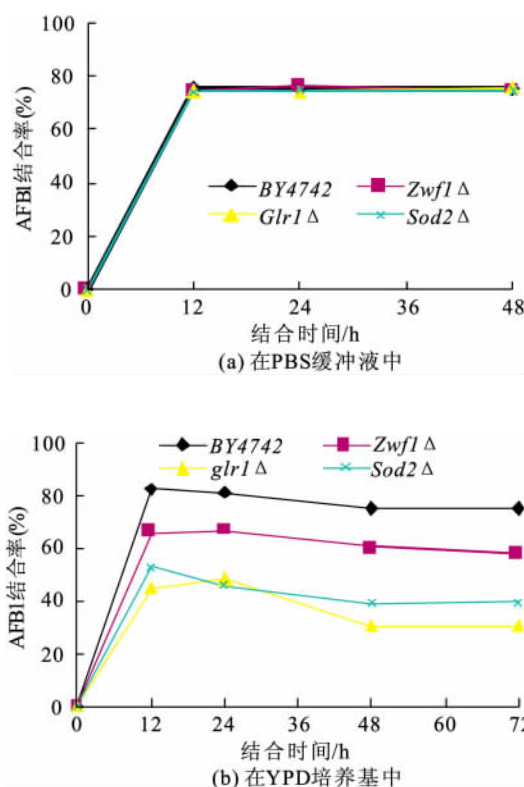


图 2 酿酒酵母活细胞对溶液中 AFB₁ 的结合能力

Fig. 2 Binding of AFB₁ in different solution by viable cells of *Saccharomyces cerevisiae*

在 PBS 缓冲液中, 各酿酒酵母活细胞对 AFB₁ 的结合率都在 12 h 达到最大, 12~48 h 内基本保持稳定, 维持在 74%~76% 之间 (图 2(a))。而在 YPD 培养基中, BY4742、*zwf1Δ*、*sod2Δ* 3 种菌株对 AFB₁ 的结合率也在 12 h 达到最大, 但 *glr1Δ* 对 AFB₁ 的结合较慢, 24 h 才达到最高; 这四种菌株在 24 h 之后, 对 AFB₁ 的结合率都有所下降, 从 82%~48% 降低至 75%~31% (图 2(b))。在 YPD 培养基中, 3 种突变菌对 AFB₁ 的结合率明显低于在 PBS 缓冲液中, 说明突变菌在 YPD 培养基中生长时, 细胞所面临的氧化压力影响了它们对 AFB₁ 的吸附和清除; 或是培养基中的某些成分干扰了突

变细胞对 AFB₁ 的吸附作用,降低了对 AFB₁ 的清除效果。但野生菌 BY4742 在 YPD 培养基中依然保持着较高甚至更高的 AFB₁ 清除能力,说明培养基中的成分并没有影响到野生菌对 AFB₁ 的吸附和清除作用。

2.3 酿酒酵母抗氧化相关基因缺失后对 AFB₁ 清除能力的变化

对于酿酒酵母野生菌 BY4742 和 3 个关键的抗氧化相关基因突变菌 *zwf1*Δ、*sod2*Δ、*glr1*Δ,不管是存活细胞还是死亡细胞,在与 PBS 缓冲液中的 AFB₁ 作用 12 h 后,它们对 AFB₁ 的清除率都几乎相同,野生菌仅略高于突变菌 0.9%~2.5%(图 3)。说明在 PBS 缓冲液中,这几种关键的抗氧化相关基因缺失后,并不会显著影响酵母细胞对 AFB₁ 的结合和清除能力。

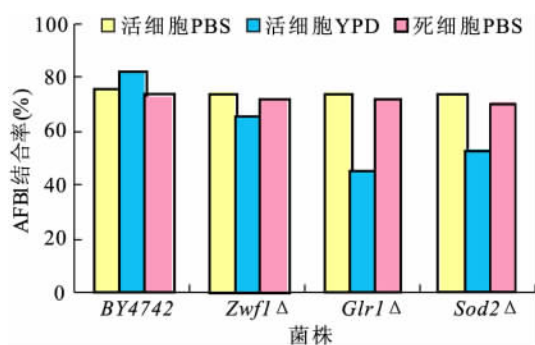


图 3 酿酒酵母野生菌和基因缺失菌对 AFB₁ 的结合能力
Fig. 3 Binding of AFB₁ by the wild-type and mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*

但是,当酵母活细胞在 YPD 培养基中与 AFB₁ 作用 12 h 后,BY4742 对 AFB₁ 的清除率(82.4%)明显高于 *zwf1*Δ、*glr1*Δ 和 *sod2*Δ,其中 *glr1*Δ 对 AFB₁ 的清除率大幅下降,为 44.8%,其次是 *sod2*Δ (52.7%),而 *zwf1*Δ 下降较少,为 65.6%(图 3)。

酿酒酵母的氧化压力主要来自于有氧代谢中所产生的活性氧。为了抵抗这些活性氧的攻击,细

胞建立了一套完善的酶促抗氧化防御体系和非酶抗氧化防御体系。前者主要包括:清除超氧阴离子的超氧化物歧化酶(SOD),以及清除过氧化物或过氧化氢的过氧化物酶、过氧化氢酶等,而过氧化物酶需要还原型谷胱甘肽(GSH)或硫氧还蛋白作为其辅因子^[11]。后者主要包括还原态 GSH、硫氧还蛋白等分子^[12]。而 GSH 还原态的维持由 GSH 还原酶催化完成,并需要由 NADPH 提供还原力。本研究中所涉及的 ZWF1 基因编码 HMP 途径的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,是细胞内 NADPH 的主要来源之一^[13];GLR1 基因编码 GSH 还原酶,负责 GSH 还原态的维持;SOD2 基因编码线粒体超氧化物歧化酶,负责清除超氧阴离子。当这 3 个与抗氧化有关的关键基因缺失后,酵母细胞在生长状态下对 AFB₁ 的吸附和清除能力显著下降,尤以 GSH 还原酶基因 *GLR1* 的缺失影响最为严重,其次是线粒体超氧化物歧化酶基因 *SOD2* 及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因 *ZWF1*。*GLR1* 基因的缺失导致非酶防御体系中还原型 GSH 的不足,并会减弱酶促防御体系中负责清除过氧化物的 GSH 过氧化物酶的活性,而 *SOD2* 基因的缺失会导致超氧阴离子的过度累积,*ZWF1* 基因的缺失会降低 NADPH 的供应水平,说明虽然这些基因的缺失与涉及毒素吸附的酵母细胞壁的合成无关,但细胞抗氧化功能出现不同程度的缺陷,影响到对 AFB₁ 的清除作用。

3 结 语

所测试的几株酿酒酵母不管是在存活状态还是在死亡状态下,都表现出对缓冲液中 AFB₁ 的优良的清除能力,清除率达 70%以上。但是在培养基中,几种抗氧化相关基因缺失菌对 AFB₁ 的清除率表现出不同程度的下降,说明细胞抗氧化功能的缺陷会影响细胞在生长状态下对毒素的吸附和清除作用。野生菌对 AFB₁ 的最高清除率可以达到 82.4%,提示其在毒素清除方面的应用潜力。

参考文献(References):

- [1] Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, et al. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. *J Dairy Sci*, 2001, 84(10): 2152—2156.
- [2] Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, et al. Policy forum: public health. Reducing liver cancer-global control of aflatoxin[J]. *Science*, 1999, 286(5449): 2453—2454.

- [3] Egner PA, Wang JB, Zhu YR, et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25): 14601–14606.
- [4] Fazeli MR, Hajimohammadali M, Moshkani A, et al. Aflatoxin B₁ binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria[J]. *J Food Prot*, 2009, 72(1): 189–192.
- [5] Shetty PH, Hald B, Jespersen L. Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods[J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 113(1): 41–46.
- [6] Nunez YP, Pueyo E, Carrascosa AV, et al. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system[J]. *J Food Prot*, 2008, 71(7): 1496–1499.
- [7] Madrigal-Santillan E, Madrigal-Bujaidar E, Marquez-Marquez R, et al. Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B-1 contaminated corn[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12): 2058–2063.
- [8] Suzuki T, Sirisattha S, Mori K, et al. Mycotoxin toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* differs depending on gene mutations[J]. *Food Sci Technol Res*, 2009, 15(4): 453–458.
- [9] 陈玉波, 陈长毅, 刘洋, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂[J]. *食品科技*, 2009, 34(9): 265–267.
- CHEN Yu-bo, CHEN Chang-yi, LIU Yang, et al. Simultaneous detection of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in foods by HPLC[J]. *Food Science and Technology*, 2009, 34(9): 265–267. (In Chinese)
- [10] Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(4): 1147–1155.
- [11] Hohmann S, Mager WH. *Yeast Stress Responses*[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003, 241–256.
- [12] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1998, 14(16): 1511–1527.
- [13] 李志君, 史锋, 廖祥儒. 酿酒酵母线粒体 NADH 激酶功能相关表型研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(1): 128–133.
- LI Zhi-jun, SHI Feng, LIAO Xiang-ru. Function and phenotype of mitochondrial NADH kinase in *Sachharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 128–133. (In Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 第四届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十三届全国杀虫微生物

所属学科: 动植物微生物学, 细胞生物学, 生物技术与生物工程, 农林基础, 农林植物保护学

开始日期: 2012-07-01

所在城市: 贵州省 贵阳市

主办单位: 中国微生物学会农业微生物学专业委员会

联系人: 刘作易 E-MAIL: liuzuoyi@yahoo.com.cn

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/>

会议背景介绍: 由中国微生物学会农业微生物学专业委员会主办的第四届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十三届全国杀虫微生物学术研讨会将于 2012 年 7 月在贵州贵阳召开。

会议名称(中文): 第 17 届欧洲碳水化合物研讨会

会议名称(英文): 17th European Carbohydrate Symposium

所属学科: 有机化学, 分析化学, 生物物理学、生物化学及分子生物学, 农林基础, 化学工程基础

开始日期: 2012-07-07

结束日期: 2012-07-11

所在国家: 以色列

所在城市: 以色列

具体地点: Tel Aviv, Israel

主办单位: International Carbohydrate Organization

联系人: Yukishige Ito (Japan)

联系电话: +81 48 467 9430

传真: 81 48 462 4680

E-MAIL: yukito@riken.jp

通讯地址: Synthetic Cellular Chemistry Laboratory RIKEN Wako Saitama 351-0198 Japan

会议网站: <http://www.internationalcarbohydrateorganisation.org/content/17th-european-carbohydrate-symposium-2013>