

拟粉红锁掷孢酵母降解展青霉素的机制

孙艺文¹, 赵利娜¹, 郑香峰¹, 林 珍¹, 李侨飞¹, 程洋洋², 张红印^{*1}

(1. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学 生命科学研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要:展青霉素(PAT)是一类主要由曲霉属和青霉属等真菌产生的有毒次级代谢产物, 主要污染水果及其制品, 严重威胁着人类的健康。为了寻找一种安全高效的PAT脱毒方法, 近年来采用生物法清除PAT已成为主要的研究方向。作者研究了拟粉红锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)对PAT降解的影响及其降解机制。结果显示, *S. pararoseus*可以显著降低苹果伤口处PAT的积累量, 体外实验发现*S. pararoseus*与PAT (5 $\mu\text{g/mL}$) 共同培养18 h, PAT可以被*S. pararoseus*完全降解。*S. pararoseus*对PAT的降解作用既不是酵母细胞壁的吸附作用, 也不是细胞的吸收作用, 而是细胞正常代谢下产生的胞内酶对PAT具有降解作用。本研究有助于了解*S. pararoseus*降解PAT的作用机制, 为真菌毒素的生物降解提供了新的理论依据。

关键词:展青霉素; 拟粉红锁掷孢酵母; 生物降解; 机制

中图分类号: TS 20 文章编号: 1673-1689(2020)02-0016-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.003

The Possible Mechanisms Involved in Degradation of Patulin by *Sporidiobolus pararoseus*

SUN Yiwen¹, ZHAO Lina¹, ZHENG Xiangfeng¹, LIN Zhen¹, LI Qiaofei¹, CHENG Yangyang², ZHANG Hongyin^{*1}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Patulin (PAT) is a mycotoxin mainly produced by *Aspergillus* and *Penicillium*. PAT contamination worldwide is considered to be a serious health concern. New strategies to prevent or reduce patulin contamination in fruits and derived products are meaningful. Recently, biological approach for PAT detoxification is being explored. In this study, the efficacy of patulin degradation by *Sporidiobolus pararoseus* and the degradation mechanisms involved were investigated. The findings revealed that *S. pararoseus* can significantly reduce the accumulation of PAT in apple wounds. PAT (5 $\mu\text{g/mL}$) was completely degraded at 18 h post incubation with *S. pararoseus* *in vitro*. Further research found that PAT degradation is independent of the absorption of yeast cells and cell walls. The intracellular enzymes obtained from the *S. pararoseus* cells showed they are more

收稿日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571899); 国家重点研发计划项目(2016YFD0400902-04); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(15)1048)

* 通信作者: 张红印(1972—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail: zhanghongyin126@126.com

efficient to degrade PAT than the yeast cells. Our findings contribute to the understanding of the mechanisms of patulin degradation by *S. pararoseus*, which provided a foundation for the detoxification of patulin in fruits and derived products.

Keywords: patulin, *Sporidiobolus pararoseus*, biodegradation, mechanism

联合国粮农组织(FAO)指出,全世界 25%的农业作物受真菌毒素的污染,如曲霉属、青霉属、镰刀菌属等产生的真菌毒素^[1-2]。真菌毒素由低相对分子质量的真菌代谢物组成,对人体健康有害^[3]。展青霉素(PAT)又称为棒曲霉素,是苹果及其衍生制品中最常见的真菌毒素,是由曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、拟青霉(*Paecilomyces*)等真菌代谢产生的一种有毒的代谢产物^[4-5]。近年来,许多国家均报道了展青霉素的污染问题,如意大利、德国、美国、葡萄牙等^[6-7]。通过食用受 PAT 污染的食物和饮料严重威胁着人类的健康^[8],PAT 可以氧化损伤人类细胞引起致突变性^[9]、免疫毒性^[10]、细胞毒性^[11]、致畸性^[12]以及遗传毒性^[13]等。

控制苹果青霉病的发生及苹果中 PAT 的污染传统的方法是使用化学合成杀菌剂。然而,随着化学杀菌剂的持续和大量使用,病原体逐渐产生了抗药性,不仅防治效力降低,而且化学残留物也会对食物造成污染。因此,人们急需寻求可替代化学杀菌剂的新方法。近年来,生物防治因其安全、绿色、高效等优点成为一种有发展前景的防治方法。大量研究表明,部分酵母菌可以直接抑制 PAT 的产生,有的甚至可以降解展青霉素。例如:卡利毕克毕赤酵母(*Pichia caribbica*)^[14]、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)^[15]、红冬孢酵母(*Rhodospiridium kratochvilovae*)^[16]、氧化葡萄糖酸菌(*Gluconobacter oxydans*)^[17]等拮抗菌均能不同程度地控制和降解 PAT。Zhu 等^[18]的研究表明,海洋红酵母(*Rhodospiridium paludigenum*)可以降低苹果体内展青霉素的含量。体外实验也表明,粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)可以降解展青霉素,使其含量与对照组相比减少 82%。

目前,利用生物方法降解真菌毒素的机制主要有:细胞的吸收作用^[19]、细胞壁的吸附作用、胞外代谢物的降解作用^[20]、胞内酶的降解作用等。然而对于生物降解 PAT 的机制研究较少,对于降解途径的研

究尚且不够深入,因此,研究拮抗酵母降解 PAT 的机制,有助于推动生物技术降解 PAT 的实际应用,研究意义十分重大。作者所在课题组首次发现拟粉红锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)可以有效控制苹果中 PAT 的积累。因此,作者对 *S. pararoseus* 降解展青霉素的机制进行初步探索,可以为进一步研究其降解 PAT 的机理和途径奠定基础,为真菌毒素的生物降解提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 酵母菌 酵母菌 *S. pararoseus* 系作者所在实验室分离鉴定并保存的菌种,于 NYDA 培养基(酵母浸膏 5 g,牛肉膏 8 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,无菌水定容至 1 L)4 ℃低温保存,经 NYDB 培养基(酵母浸膏 5 g,牛肉膏 8 g,葡萄糖 10 g,无菌水定容至 1 L)活化(28 ℃,180 r/min 摇床培养 20 h)后,将上述培养混合物在 7 500 r/min 下离心 10 min,无菌生理盐水洗涤两次,并用无菌生理盐水重新悬浮酵母细胞,血球计数法计数并用无菌生理盐水调至所需浓度。

1.1.2 病原菌 扩展青霉(*Penicillium expansum*)系作者所在实验室保存的菌种。先接种在 PDA 培养基(200 g 土豆沸水煮 20 min 后,用纱布过滤,加入 20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,用蒸馏水定容至 1 L),25 ℃培养一周,将分生孢子挑取于无菌水中,用血球计数法计算孢子数量,根据试验要求配制相应浓度。

1.1.3 水果 正常商业成熟度的苹果果实:品种为红富士,选择外观匀称,表面完好无机械损伤的果实,用 0.1%的 NaClO 溶液进行浸泡消毒 1 min,自来水冲洗若干次,室温下自然风干。

1.1.4 试剂与仪器 PAT 标准品:购于生工生物工程(上海)股份有限公司;环己酰亚胺(Cycloheximide):购于美国 Amresco 公司;酵母浸膏、葡萄糖、冰醋酸、牛肉膏、琼脂:购自国药集团化学试剂有限公司;乙

腈、甲醇:色谱纯,购自TEIDA;微孔滤膜(0.22 μm)、注射器等:购于华东器化玻公司。

Agilent 1260 液相色谱仪:购自美国安捷伦公司;恒温摇床:太仓市强乐试验设备厂产品;电子显微镜:江南光学仪器厂产品;高速冷冻离心机:湘仪离心机仪器有限公司产品;血球计数板:购自丹阳市健陵医疗器械公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC-DAD 检测 PAT 的条件 参考Cao等^[14]的方法,略有改动。PAT检测条件:紫外波长 276 nm;色谱柱:反相 C18 柱,250 mm $\times$ 4.6 mm;流动相为乙腈:水=10:90;流量:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

1.2.2 *S. pararoseus* 对苹果伤口处 PAT 的控制作用 苹果经 1.1.3 预处理后,在每个苹果果实表面赤道部位用灭菌的打孔器打 3 个分布均匀且大小、深度一致的伤口(5 mm $\times$ 3 mm),用移液器向伤口处分别注入 30 μL 溶液。1) *S. pararoseus* 酵母菌悬液(浓度为 $1\times 10^6\sim 10^9$ cells/mL 共 4 个梯度);2) 无菌蒸馏水(对照)。放置 2 h 后,再在每个伤口处注入 30 μL *P. expansum* 孢子悬浮液(5×10^4 spores/mL)。室温下放置 1 h 左右,将苹果置于塑料筐中,用保鲜膜密封起来。将其置于恒温恒湿培养箱(20 $^{\circ}\text{C}$, 95% RH)中贮藏 12 d,用无菌刀沿苹果腐烂伤口外缘 1 cm 处将腐烂及周围组织取出,提取净化后测定苹果伤口处的 PAT 质量浓度,参考曹婧^[21]的方法。每个处理做 3 个平行,每个平行 12 个苹果,整个试验重复 2 次。

1.2.3 *S. pararoseus* 在体外对 PAT 的降解作用 经 1.1.1 活化后的酵母细胞,用生理盐水调整其浓度为 1×10^8 cells/mL,在含有 20 mL NYDB 培养基的 150 mL 锥形瓶中加入 1 mL *S. pararoseus* 酵母菌悬液,再加入一定量的 PAT 储备液,使其终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 24 h,每 6 小时取一次样,7 500 r/min 离心 10 min,取上清液用微孔滤膜(0.22 μm)过滤后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,使用 HPLC 测定 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

1.2.4 *S. pararoseus* 降解 PAT 的机制

1) *S. pararoseus* 细胞壁对 PAT 的吸附作用:经 1.1.1 活化后的酵母细胞,用生理盐水调整其浓度为 1×10^8 cells/mL,取 5 mL 酵母悬浮液在 100 $^{\circ}\text{C}$ 的沸水中灭活 15 min,在含有 20 mL NYDB 培养基的

150 mL 锥形瓶中分别加入 1 mL 活的酵母细胞、热杀死细胞、以及生理盐水(对照),3 个处理均加入等量的 PAT 储备液,使其终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 18 h,每 3 小时取一次样,每个样品分为离心(7 500 r/min)和非离心 2 种处理方法,将培养液经微孔滤膜(0.22 μm)过滤后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,待 HPLC 测定 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

2) *S. pararoseus* 对 PAT 的吸收作用:经 1.1.1 活化后的酵母细胞,用生理盐水调整其浓度为 1×10^8 cells/mL,在含有 20 mL NYDB 培养基的 150 mL 锥形瓶中分别加入 1 mL *S. pararoseus* 酵母菌悬液和生理盐水(对照),两个处理均加入等量的 PAT 储备液,使其终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 18 h,7 500 r/min 离心后用无菌生理盐水洗两次,确保除去培养基中残留的 PAT。使用两种方法测定 *S. pararoseus* 对 PAT 的吸收作用。1) 参照曹婧^[21]的方法,将酵母细胞使用超声波破碎仪 1 000 Hz 处理 20 min,于分液漏斗中使用乙酸乙酯提取 PAT。2) 将离心得到的酵母细胞使用液氮低温研磨,加入相同体积的无菌水和乙酸乙酯,于分液漏斗中分层提取,将油层于 40 $^{\circ}\text{C}$ 高温旋转蒸发近干,用 1 mL 乙酸乙酯复溶。经微孔滤膜(0.22 μm)过滤后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,待 HPLC 测定 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

3) *S. pararoseus* 无细胞滤液对 PAT 的降解作用:经 1.1.1 活化后的酵母细胞,7 500 r/min 离心 10 min 后,上清液继续离心 2 次,将 3 次离心后的上清液用微孔滤膜(0.22 μm)过滤,除去全部酵母细胞,得到含细胞外代谢物的无细胞滤液。在锥形瓶中加入 20 mL 无细胞滤液作为处理组,等量的 NYDB 培养基作为对照,两个处理均加入等量的 PAT 储备液,使其终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 18 h,每 3 小时取一次样,7 500 r/min 离心后将上清液经微孔滤膜(0.22 μm)过滤,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,待 HPLC 测定 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

4) PAT 刺激下 *S. pararoseus* 产生的外代谢物对 PAT 的降解作用:经 1.1.1 活化后的酵母细胞,用生理盐水调整其浓度为 1×10^8 cells/mL,在含有 20 mL NYDB 培养基的 150 mL 锥形瓶中加入 1 mL *S. pararoseus* 酵母菌悬液,再加入一定量的 PAT 储

备液,使其终质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$,于 28°C 、 180 r/min 摇床培养 6 h ,取出一组经灭菌的微孔滤膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 过滤,除去酵母细胞得到含酵母细胞外代谢物的无细胞滤液,对照组不处理,继续在 28°C 、 180 r/min 摇床培养 18 h 。每 3 h 取样, 7500 r/min 离心 10 min ,取上清液用微孔滤膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 过滤后置于 -20°C 冰箱保存,待 HPLC 测定其中 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

5) 环己酰亚胺对 *S. pararoseus* 降解 PAT 的影响: 经 1.1.1 活化后的酵母细胞,用生理盐水调整其浓度为 $1 \times 10^8 \text{ cells/mL}$,在含有 20 mL NYDB 培养基的 150 mL 锥形瓶中加入 1 mL *S. pararoseus* 酵母菌悬液,分 3 组处理: 1) 在 0 h 加入 $25 \mu\text{L}$ 质量浓度为 1 mg/mL 的环己酰亚胺; 2) 培养 6 h 后,加入 $25 \mu\text{L}$ 质量浓度为 1 mg/mL 的环己酰亚胺; 3) 不添加环己酰亚胺 (对照)。3 个处理均加入等量的 PAT 储备液,使其终质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$,于 28°C 、 180 r/min 摇床培养 18 h ,每 3 h 取一次样, 7500 r/min 离心后,将上清液经微孔滤膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 过滤后置于 -20°C 冰箱保存,待 HPLC 测定 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

6) *S. pararoseus* 胞内酶对 PAT 的降解作用: 参照 Zheng 等^[20]的方法,略有改动。活化后的酵母细胞 7500 r/min 离心 10 min 后用 Tri-HCl (50 mmol/L , $\text{pH } 7.0$) 清洗两次,取湿质量 5 g 的酵母细胞经液氮快速研磨,溶于 10 mL Tri-HCl 中,冰上放置 30 min ,促进胞内酶的溶解, 4°C 、 10000 r/min 离心 10 min ,收集上清液。未加酵母细胞的提取液作为对照,加入终质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 的 PAT。于 28°C 、 180 r/min 摇床培养 3 h ,取样后用微孔滤膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 过滤后置于 -20°C 冰箱保存,待 HPLC 测定其中 PAT 的质量浓度。每个处理做 3 个平行,整个试验重复 2 次。

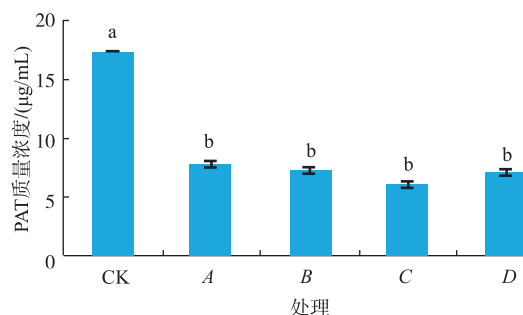
1.2.5 数据分析 试验结果用 SPSS16.0/PC 统计软件进行统计分析。当需要比较的试验组总数超过 3 个时,采用 ANOVA 程序对结果进行 Duncan's 多重比较差异分析 ($P < 0.05$),当需要分析的组数为 2 时,采用独立样本实行平均数分析。

2 结果与分析

2.1 *S. pararoseus* 对苹果伤口处 PAT 的控制作用

由图 1 可以看出,使用 *S. pararoseus* 能显著降低苹果伤口处 PAT 的积累量。当酵母浓度为 1×10^8

cells/mL 时, PAT 的积累量最低仅为 $6.08 \mu\text{g/mL}$,而空白对照高达 $17.34 \mu\text{g/mL}$ 。经过酵母处理后果实伤口处 PAT 积累量与对照相比至少降低了 1.2 倍。

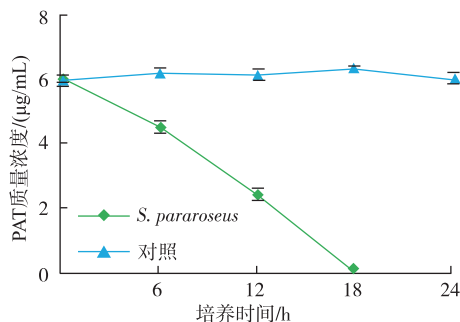


CK 为对照; A、B、C、D 分别代表不同的 *S. pararoseus* 菌悬液浓度 (cells/mL), A: 1×10^6 , B: 1×10^7 , C: 1×10^8 , D: 1×10^9 , 不同的小写字母代表差异显著性 ($P < 0.05$)。

图 1 *S. pararoseus* 对苹果伤口处展青霉素积累的影响
Fig. 1 Efficacy of *S. pararoseus* on controlling of patulin in wounds of apple fruits

2.2 *S. pararoseus* 在体外对 PAT 的降解作用

如图 2 所示, PAT 可以被 *S. pararoseus* 降解,并且随着时间的延长, PAT 的质量浓度不断降低,培养 18 h 后 PAT 的质量浓度已无法检测到,然而对照组 PAT 的质量浓度在整个实验中几乎保持不变。



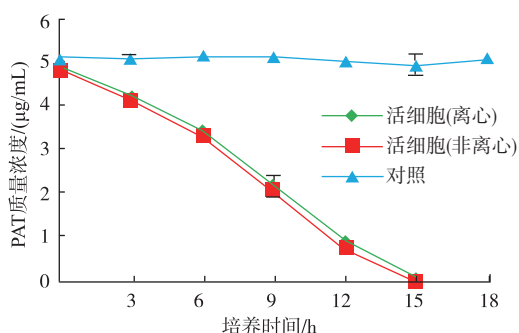
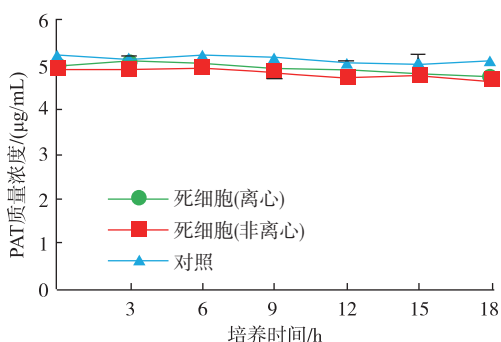
S. pararoseus: 添加 PAT 及拟粉红锁掷孢酵母活细胞; 对照: PAT 在未添加 *S. pararoseus* 的 NYDB 培养基中的降解情况。

图 2 *S. pararoseus* 对 PAT 的降解作用

Fig. 2 Efficacy of *S. pararoseus* on the biodegradation of PAT

2.3 *S. pararoseus* 降解 PAT 的机制

2.3.1 *S. pararoseus* 细胞壁对 PAT 的吸附作用 图 3 显示,无论是活细胞还是热杀死细胞,取离心后上清液和直接取培养液进行测定,两者之间 PAT 的质量浓度相差不大,这就表明 *S. pararoseus* Y16 细胞壁没有吸附 PAT 的作用。由此可知, *S. pararoseus* Y16 降解 PAT 的过程需要活的酵母细胞,并不是由于细胞壁对 PAT 的吸附作用。

(a) *S. pararoseus* 活细胞对 PAT 的作用(b) *S. pararoseus* 热杀死细胞对 PAT 的作用

活细胞: *S. pararoseus* 活细胞; 热杀死细胞: 经 100 °C 灭活处理 30 min 的酵母细胞; 对照: PAT 在未添加 *S. pararoseus* 的 NYDB 培养基中的降解情况。

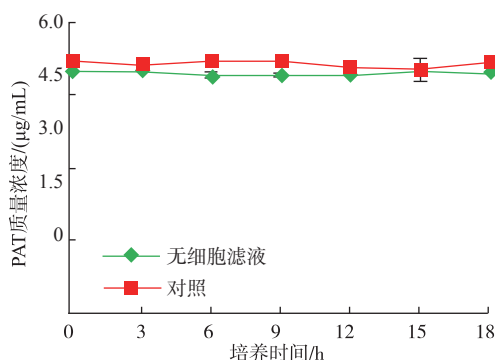
图 3 *S. pararoseus* 活细胞和热杀死细胞对 PAT 的降解作用Fig. 3 Efficacy of viable cells and heat-killed cells of *S. pararoseus* on the biodegradation of PAT

2.3.2 *S. pararoseus* 对 PAT 的吸收作用

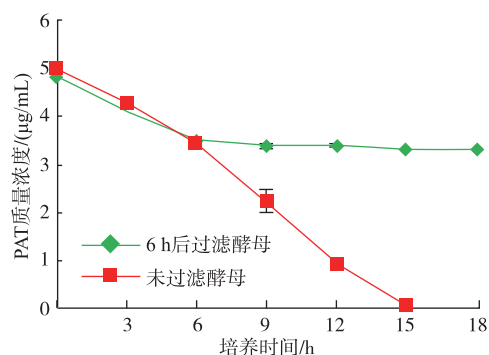
S. pararoseus 与 PAT 共同培养 18 h 后, 使用无菌水洗去除残留的 PAT 和培养介质, 无论是使用超声波破碎仪还是液氮研磨破碎细胞, 使用 HPLC 检测其中的 PAT 质量浓度。结果显示, 破碎的细胞中均不含有 PAT。因此, *S. pararoseus* 对 PAT 的降解并不是由于细胞对 PAT 的吸收作用。

2.3.3 *S. pararoseus* 细胞外代谢物对 PAT 的降解作用 如图 4 所示, 在培养的 18 h 内, 体系中 PAT 的变化趋势与对照组几乎一致, 含有 *S. pararoseus* 细胞外代谢物的无细胞滤液并没有降低 PAT 的质量浓度, 由此可知, *S. pararoseus* 在正常生长代谢过程中产生的细胞外代谢物不能够降解 PAT。

2.3.4 PAT 刺激下 *S. pararoseus* 产生的外代谢物对 PAT 的降解作用 如图 5 所示, 当 PAT 与 *S. pararoseus* 共同培养 6 h 后滤除酵母细胞, 无细胞滤液中 PAT 的质量浓度几乎没有变化, 而未过滤酵母细胞的处理, 共同培养 15 h 后就几乎检测不到 PAT 的存在。



无细胞滤液: 滤除酵母细胞后的无细胞滤液; 对照: PAT 在未添加 *S. pararoseus* 的 NYDB 培养基中的降解情况。

图 4 *S. pararoseus* 细胞外代谢物对 PAT 的作用Fig. 4 Efficacy of cell-free culture filtrates of *S. pararoseus* on the biodegradation of PAT

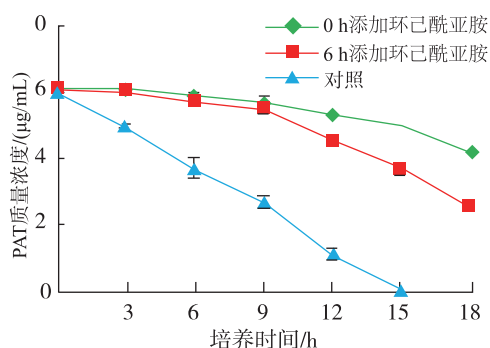
6 h 后过滤酵母: 添加 PAT 6 h 后过滤掉酵母细胞; 未过滤酵母: PAT 与酵母共培养。

图 5 PAT 刺激下 *S. pararoseus* 外代谢物对 PAT 的降解作用Fig. 5 Efficacy of *S. pararoseus* was filtered after 6 h on the biodegradation of PAT

实验结果表明, PAT 刺激下 *S. pararoseus* 并没有产生降解 PAT 的细胞外代谢物。

2.3.5 环己酰亚胺对 PAT 降解的影响 未加入环己酰亚胺 (*S. pararoseus* 单独处理) 的处理组, 在培养 15 h 后显著降低了 PAT 的质量浓度, 然而 0 h 添加 PAT 的同时添加环己酰亚胺的处理组, 培养 18 h 后 PAT 的质量浓度由 6.1 μg/mL 降为 4.2 μg/mL, 说明添加环己酰亚胺确实影响了酵母细胞对 PAT 的降解作用。当添加 PAT 共培养 6 h 后再添加环己酰亚胺时, PAT 的质量浓度随着时间增长而降低, 和不添加环己酰亚胺相比, *S. pararoseus* 对 PAT 的整体降解速率显著低于未添加环己酰亚胺组, 但是环己酰亚胺并没有完全阻止酵母细胞对 PAT 的降解作用, 培养 18 h 后未添加环己酰亚胺组已完全检测不到 PAT, 而添加 PAT 共培养 6 h 后再加入环己

酰亚胺处理组中仍含有 PAT 2.6 $\mu\text{g/mL}$ 。



对照:只添加 PAT;0 h 添加环己酰亚胺:添加 PAT 的同时添加环己酰亚胺;6 h 添加环己酰亚胺:添加 PAT 6 h 后添加环己酰亚胺。

图 6 不同时间添加环己酰亚胺对 *S. pararoseus* 降解 PAT 的影响

Fig. 6 Efficacy of *S. pararoseus* added cycloheximide on different time on the biodegradation of PAT

2.3.6 *S. pararoseus* 胞内酶对 PAT 的降解作用 经液氮研磨提取的胞内酶与 PAT 共同培养 3 h 后,经 HPLC 测定 PAT 的质量浓度发现,胞内酶已将 PAT 完全降解,而对照组的 PAT 质量浓度并无变化。结果表明,高浓度的 *S. pararoseus* 胞内酶可以迅速降解 PAT。

3 讨论

微生物具有物种的多样性,因而生物降解 PAT 的机理也是具有多样性的。为了探究 *S. pararoseus* 降解 PAT 的作用机制,作者验证了其降解机制。结果证实,无论是 *S. pararoseus* Y16 活细胞还是热杀死细胞,离心前后 PAT 的质量浓度几乎相同,说明 PAT 并没有被酵母细胞的细胞壁吸附。由于灭活的细胞是没有任何代谢能力的,只能利用细胞壁将毒素吸附,而细胞吸附的毒素往往可以通过反复清洗细胞的方法使部分毒素从细胞表面脱离。由此可知,*S. pararoseus* Y16 对于 PAT 的降解作用并不是因为细胞壁的吸附作用,而是必须有活细胞的参与。这与 Dong 等^[22]的研究结果一致,研究表明 PAT 的降解需要活的 *Kodameae ohmeri* 酵母细胞。而 Yue 等^[23]则发现灭活的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可以降解苹果汁中 75% 的 PAT。然而 Zhu 等^[18]的研究则发现,灭活的 *R. paludigenum* 细胞可以吸附 51% 的 PAT。

当 *S. pararoseus* 与 PAT 共同培养 20 h 后,无论

是经超声波破碎仪还是液氮研磨破碎细胞,经 HPLC 测定后均未发现 PAT,说明 *S. pararoseus* 降解 PAT 也不是通过细胞的吸收作用。PAT 既没有被细胞壁吸附,也没有被细胞吸收进细胞内,而又检测不到 PAT 的存在,由此可以推测 PAT 被酵母的代谢产物降解了。Coelho 等^[24]的研究也证实了 PAT 的降解机理之一是酶作用的过程。

作者研究了 *S. pararoseus* 细胞外代谢物对 PAT 的降解作用。由图 4、图 5 可知,*S. pararoseus* 正常代谢过程中产生的细胞外代谢物和 PAT 刺激 *S. pararoseus* 代谢产生的细胞外代谢物均不能降解 PAT。而 Zheng 等^[20]的研究结果表明,*P. caribbica* 在 PAT 的刺激下可以产生大量的胞内和胞外代谢物,可以显著降低 PAT 的质量浓度。

环己酰亚胺是一种蛋白酶抑制剂,可以阻断蛋白质的合成,影响多种酶的作用途径。因此,作者也研究了环己酰亚胺对酵母菌降解 PAT 的影响。结果表明,在 0 h 添加 PAT 同时添加环己酰亚胺严重影响了酵母菌对 PAT 的降解作用。而添加 PAT 6 h 后再添加环己酰亚胺,*S. pararoseus* 仍然可以降解 PAT,但其降解速度显著低于未添加环己酰亚胺的处理组。可以推断,*S. pararoseus* 可以产生降解 PAT 的酶,而环己酰亚胺切断了相关酶的产生,因此添加环己酰亚胺后,*S. pararoseus* 降解 PAT 的效率显著降低。当添加 PAT 6 h 后再添加环己酰亚胺,因为此时 *S. pararoseus* 已经产生了降解 PAT 的酶,此时添加环己酰亚胺,并不能完全抑制 *S. pararoseus* 对 PAT 的降解作用。由此可知,*S. pararoseus* 对 PAT 的降解作用确实是酶作用的过程。Dong 等^[25]的研究也得出了相似的结论,环己酰亚胺可以抑制 *S. cerevisiae* 对真菌毒素玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)的降解作用。而 *S. pararoseus* 胞内酶对 PAT 的降解作用的结果表明,胞内酶可以快速降解 PAT,共同培养 3 h 后,HPLC 已检测不到其中的 PAT。说明 *S. pararoseus* 降解 PAT 的作用机制不是由于细胞壁对 PAT 的吸附作用,也不是由于酵母细胞的吸收作用,而是活的酵母细胞在正常代谢过程中产生的胞内酶对 PAT 的降解作用。

4 结语

展青霉素是一种世界范围内的真菌毒素污染物,在许多水果及其制品中均有发现^[26]。近年来由于

生物降解安全、高效、无污染等优点,真菌毒素的生物降解已经成为研究热点。对于 *S. pararoseus* 降解 PAT 作用机制的研究,可以为拮抗菌降解真菌毒素的研究提供一定的理论基础。然而若想完全了解拮抗菌降解真菌毒素的机制,还需要进行更多的研

究,如确定具有降解作用的胞内酶并对其进行分离纯化及鉴定;利用蛋白质组学或转录组学等技术,对降解过程中发挥重要作用的蛋白质或基因进行筛选和鉴定,从而为真菌毒素的生物降解提供全新的视角和途径。

参考文献:

- [1] PITT J I, BASÍLICO J C, ABARCA M L, et al. Mycotoxins and toxigenic fungi[J]. **Medical Mycology**, 2000, 38(1): 41-46.
- [2] SATAQUE O E Y, BIAZON L, SILVA M D, et al. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium sp.* count, damaged kernels, protein and lipid content[J]. **Brazilian Archives of Biology & Technology**, 2006, 49(1): 1967-1976.
- [3] MARROQUÍ Ncardona A G, JOHNSON N M, PHILLIPS T D, et al. Mycotoxins in a changing global environment-a review[J]. **Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, 2014, 69(8): 220-230.
- [4] YANG Qiya, ZHANG Hongyin, PANG Shuixiu, et al. Research progress of patulin in fruits and fruit products with antagonistic yeast [J]. **Food Science**, 2012, 33(7): 350-353. (in Chinese)
- [5] VARGA J, KOCSUBÉ S, SURI K, et al. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2010, 143(3): 143-149.
- [6] HARRIS K L, BOBE G, BOURQUIN L D. Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in Michigan[J]. **Journal of Food Protection**, 2009, 72(6): 1255-1261.
- [7] BARREIRA M J, ALVITO P C, ALMEIDA C M M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal[J]. **Food Chemistry**, 2010, 121(3): 653-658.
- [8] MARIN S, RAMOS A J, CANO-SANCHO G, et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. **Food & Chemical Toxicology**, 2013, 60(10): 218-237.
- [9] SCHUMACHER D M, METZLER M, LEHMANN L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione[J]. **Archives of Toxicology**, 2005, 79(2): 110-121.
- [10] WICHMANN G, HERBARTH O, LEHMANN I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells[J]. **Environmental Toxicology**, 2002, 17(3): 211-218.
- [11] WU T, LIAO Y, YU F, et al. Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60)[J]. **Toxicology Letters**, 2008, 183(3): 105-111.
- [12] DONMEZ-ALTUNTAS H, GOKALP-YILDIZ P, BITGEN N, et al. Evaluation of genotoxicity, cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay[J]. **Mycotoxin Research**, 2013, 29(2): 63-70.
- [13] 周思敏. 棒曲霉毒素对 HepG2 细胞的遗传毒性及氧化应激机制的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
- [14] CAO J, ZHANG H, YANG Q, et al. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2013, 162(2): 167-173.
- [15] 杨其亚. 植酸增强胶红酵母对草莓、苹果及桃果采后病害的控制效应[D]. 镇江: 江苏大学, 2011.
- [16] CASTORIA R, MANNINA L, DURÁN-PATRÓN R, et al. Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11 [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2011, 59(21): 11571-11578.
- [17] BEVARDI M, FRECE J, MESAREK D, et al. Antifungal and antipatulin activity of *Gluconobacter oxydans* isolated from apple surface[J]. **Archives of Industrial Hygiene & Toxicology**, 2013, 64(2): 93-98.
- [18] ZHU R, YU T, GUO S, et al. Effect of the yeast *Rhodosporidium paludigenum* on postharvest decay and patulin accumulation in apples and pears[J]. **Journal of Food Protection**, 2015, 78(1): 157-163.
- [19] ZHU R, FEUSSNER K, WU T, et al. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodosporidium paludigenum* [J]. **Food**

- Chemistry**, 2015(179):1-5.
- [20] ZHENG X, YANG Q, ZHANG H, et al. The possible mechanisms involved in degradation of patulin by *Pichia caribbica* [J]. **Toxins**, 2016, 8(10):289-305.
- [21] 曹婧. 卡利比克毕赤酵母控制苹果展青霉素及其机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.
- [22] DONG X, JIANG W, LI C, et al. Patulin biodegradation by marine yeast *Kodameae ohmeri* [J]. **Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 2015, 32(3):352-360.
- [23] YUE T, DONG Q, GUO C, et al. Reducing patulin contamination in apple juice by using inactive yeast [J]. **Journal of Food Protection**, 2011, 74(1):149-153.
- [24] COELHO A R, CELLI M G, SATAQUE O E Y, et al. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro [J]. **Brazilian Archives of Biology & Technology**, 2007, 50(4):725-733.
- [25] ZHANG H, DONG M, YANG Q, et al. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast [J]. **Journal of Proteomics**, 2016, 143(SI):416-423.
- [26] DENG Shuizhou, XU Yang. Preparation of artificial antigen and polyclonal antibody of mycotoxin patulin [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(6):13-17. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称: 第二十届全国化学热力学和热分析学术会议

会议时间: 2020年4月24-26日

会议地点: 山西省太原市

主办方: 中国化学会

承办方: 1. 中国化学会化学热力学与热分析专业委员会; 2. 太原理工大学; 3. 山西中医药大学

会议主题: 多学科交叉创新的化学热力学和热分析

大会主席: 王键吉

预计规模: 600人

会议网站: <http://www.chemsoc.org.cn/meeting/CTTA/>

联系人: 崔子祥

电子邮箱: ctt2020@163.com

电话: 15903430585

地址: 山西省太原市迎泽西大街79# 030024

会议内容: 前瞻性综述; 学科现状、前沿及展望; 系统性研究成果; 原创性研究工作。

1. 溶液化学; 2. 热化学; 3. 热分析及其应用; 4. 材料热力学; 5. 生物热力学; 6. 界面和胶体热力学; 7. 相平衡和分离技术; 8. 统计热力学和计算机模拟; 9. 化工热力学与热力学教育; 10. 仪器和方法; 11. 相关交叉领域。会议交流形式包括大会报告、分会邀请报告、口头报告、青年论坛、墙报展讲。会议设青年论坛奖、优秀墙报奖。会议期间, 将邀请从事化学热力学、热分析及其相关交叉研究的著名专家、学者作大会报告, 并邀请交叉学科专家、企业家、仪器研发机构技术人员参会, 共同研讨学科发展。同时, 还将展示国内外与化学热力学和热分析相关的最新仪器设备。欢迎广大科技工作者、青年学生踊跃投稿, 积极参加。