

## 淡豆豉中产 $\gamma$ -氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌的拮抗作用和毒素合成关键基因 mRNA 表达的影响

戴家齐<sup>1</sup>, 贺 婧<sup>2#</sup>, 朱晓蓝<sup>1</sup>, 王立元<sup>1</sup>, 龙 凯<sup>1</sup>, 周立分<sup>1</sup>, 杨安金<sup>3</sup>, 翁美芝<sup>1\*</sup>, 谢小梅<sup>1\*</sup>

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 南昌大学转化医学研究院, 江西 南昌 330031

3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006

**摘要:** 目的 考察从淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* (SSP) 炮制过程中分离的 15 株产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌的拮抗能力并筛选出具有抑制产毒黄曲霉菌生长和降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 的高效拮抗菌, 探究高效拮抗菌发酵产物对黄曲霉毒素 (aflatoxins) 合成关键基因 mRNA 表达量的影响。方法 运用平板对峙法与十字交叉法检测 15 株产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物及其发酵产物对产毒黄曲霉标准株 (简称: 产毒标准株) 生长的影响, 超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 检测 15 株菌对 AFB<sub>1</sub> 的降解效果, 考察其对产毒黄曲霉菌的拮抗能力并筛选出高效拮抗菌; 针对高效拮抗菌发酵产物分别运用菌丝干重法检测其对产毒标准株菌丝生长的影响, 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测其对黄曲霉毒素合成关键基因 (*aflR*、*aflD*、*aflM*、*aflP*) mRNA 表达的影响。结果 15 株菌及其发酵产物对产毒标准株的生长抑制率分别在 15.88%~56.05% 和 25.74%~52.12%, 对 AFB<sub>1</sub> 降解率在 2.74%~57.87%, 表明它们对产毒黄曲霉菌均有一定的拮抗作用, 并筛选出具有高效拮抗作用的黑曲霉菌 *Aspergillus niger* (JC2) 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Xd1)。当高效拮抗菌发酵产物加入量为 2 000  $\mu$ L 时, JC2 和 Xd1 对产毒标准株菌丝生长的抑制率分别为 73.82% 和 63.34%, 且能明显抑制黄曲霉毒素合成关键基因 *aflR*、*aflD*、*aflM*、*aflP* 的 mRNA 表达。结论 淡豆豉炮制中存在既能产  $\gamma$ -氨基丁酸又能明显抑制产毒标准株生长和产毒的拮抗菌, 其拮抗作用可能通过抑制产毒标准株菌丝生长和毒素合成关键基因的 mRNA 表达。

**关键词:** 淡豆豉;  $\gamma$ -氨基丁酸; 产毒黄曲霉菌; 黄曲霉毒素; 拮抗作用; 高效拮抗菌; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1510-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.010

## Antagonistic effects of $\gamma$ -amino butyri acid-producing microorganisms existing in the fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* on toxigenic *Aspergillus flavus* and effects on the mRNA expression of key genes for toxin synthesis

DAI Jiaqi<sup>1</sup>, HE Jing<sup>2</sup>, ZHU Xiaolan<sup>1</sup>, WANG Liyuan<sup>1</sup>, LONG Kai<sup>1</sup>, ZHOU Lifen<sup>1</sup>, YANG Anjin<sup>3</sup>, WENG Meizhi<sup>1</sup>, XIE Xiaomei<sup>1</sup>

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, China

3. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To investigate the antagonistic ability of 15 strains of  $\gamma$ -amino butyri acid-producing microorganisms isolated from the fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP) against toxigenic *Aspergillus flavus*, screened out the efficient antagonistic microorganisms with the ability to inhibit the growth of toxigenic *A. flavus* and degrade aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), and explore

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060709); 国家自然科学基金项目 (82360772); 国家自然科学基金项目 (82060699); 南昌大学香樟育才计划; 江西省自然科学基金面上项目 (20232BAB206161)

作者简介: 戴家齐 (1997—), 男, 湖北天门人, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。Tel: 15579159651 E-mail: 2461746820@qq.com

#共同第一作者: 贺 婧 (1990—), 女, 江西南昌人, 讲师, 博士, 从事微生物学研究。Tel: 15972204520 E-mail: whuncuhejing@qq.com

\*通信作者: 谢小梅 (1964—), 女, 江西永新人, 教授, 博士, 研究生导师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

翁美芝 (1982—), 女, 江西宜春人, 副教授, 博士, 主要从事中药溶栓研究。Tel: (0791)87118921 E-mail: meizhiweng@whu.edu.cn

the effect of efficient antagonistic microorganisms fermentation products on the mRNA expression of key genes for aflatoxin synthesis.

**Methods** The effect of 15 strains of  $\gamma$ -amino butyric acid-producing microorganisms and their fermentation products on the growth of toxigenic *A. flavus* standard strain (abbreviation: toxigenic standard strain) were tested through the plate confrontation culture and cross over method, respectively; Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to investigate the degradation effect of 15 strains on AFB<sub>1</sub>. The antagonistic ability of 15 strains against toxigenic *A. flavus* was also examined and the efficient antagonistic microorganisms were screened out. For the efficient antagonistic microorganisms fermentation products, the mycelium dry weight method was used to detect its effect on the mycelium growth of the toxigenic standard strain, and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect its effect on the mRNA expression of key genes (*aflR*, *aflD*, *aflM*, *aflP*) for aflatoxin synthesis. **Results** The growth of the toxigenic standard strain was inhibited by the 15 strains and their fermentation products, with inhibition rates between 15.88%—56.05% and 25.74%—52.12%, respectively. The degradation rate of AFB<sub>1</sub> was between 2.74%—57.87%. It was shown that they all have certain antagonistic effects on toxigenic *A. flavus*. In addition, *Aspergillus niger* (JC2) and *Bacillus subtilis* (Xd1) with efficient antagonistic effects were screened out. When the addition amount of highly efficient antagonistic microorganism fermentation product was 2 000  $\mu$ L, the inhibition rates of JC2 and Xd1 on the mycelium growth of toxigenic standard strain were 73.82% and 63.34%, respectively, and the mRNA expression of aflatoxin synthesis key genes *aflR*, *aflD*, *aflM* and *aflP* could be significantly inhibited. **Conclusion** There are antagonistic microorganism in the fermentation process of SSP that can not only produce  $\gamma$ -amino butyric acid, but also significantly inhibit the growth and toxin production of toxigenic standard strain. Its antagonistic effect may be achieved by inhibiting the mycelium growth of toxigenic standard strain and the mRNA expression of key genes for toxin synthesis.

**Key words:** *Sojae Semen Praeparatum*;  $\gamma$ -aminobutyric acid; toxigenic *Aspergillus flavus*; aflatoxin; antagonistic effect; efficient antagonistic microorganisms; real-time PCR

淡豆豉为豆科植物大豆的成熟种子与桑叶、青蒿等辅料经发酵加工而成，是我国特有的药食两用中药。黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 广泛存在于环境中，侵染农作物、中药材等<sup>[1]</sup>。本实验室前期研究表明，在淡豆豉炮制中的“黄衣上遍”和“再闷”前期均分离出黄曲霉菌，可能因炮制的特殊环境及微生物抑制等多重因素，至“再闷”后期产毒黄曲霉菌和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 含量逐渐减少直至消失<sup>[2]</sup>。

黄曲霉毒素 (aflatoxins, AFT) 是黄曲霉菌和寄生曲霉菌 *A. parasiticus* 等真菌产生的次级代谢物，在已知多种 AFT 中，AFB<sub>1</sub> 的毒性最强，分布广泛、具强致癌性、且难以清除，被世界卫生组织列为 I 类致癌物<sup>[3]</sup>。李汶等<sup>[4]</sup>报道淡豆豉中 AFB<sub>1</sub> 含量高达 21.52 ng/g，Qiu 等<sup>[5]</sup>报道多批次淡豆豉样品存在 AFT 污染其阳性率为 81.8%，淡豆豉因发酵不充分被产毒株污染的风险提升，安全性难以保证<sup>[6]</sup>。

$\gamma$ -氨基丁酸是一种天然存在的非蛋白质氨基酸，是人体重要的抑制性神经递质，能从根本上起到抗焦虑、促进睡眠等作用，与淡豆豉主治“虚烦不眠”相吻合。本实验室首次报道淡豆豉中富含  $\gamma$ -氨基丁酸，并筛选出多株产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物<sup>[7-8]</sup>。基于此，本实验考察从淡豆豉炮制中分离的 15 株产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌的拮抗能力，

并筛选出具有抑制产毒黄曲霉菌生长和降解 AFB<sub>1</sub> 的高效拮抗菌，进一步探究其对黄曲霉毒素合成关键基因 mRNA 表达的影响。研究结果将为淡豆豉的 AFT 污染防控、提高“虚烦不眠”之疗效、揭示其炮制机制提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验菌株

产毒黄曲霉标准株 *A. flavus*，购于中国普通微生物菌种保藏中心，编号 CGMCC3.4408；产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物 15 株（真菌 8 株，细菌 7 株）均为本实验室从淡豆豉炮制中分离、鉴定并保存<sup>[8]</sup>，由江西中医药大学谢小梅教授和王立元副教授鉴定和命名，具体 NCBI 对比结果见表 1。

### 1.2 试剂及仪器

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、脑心浸液肉汤培养基，批号 20230216、20201017，青岛海博生物技术有限公司；马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB)，批号 505E031，北京索莱宝科技有限公司；种子培养基、细菌发酵培养基、真菌发酵培养基配方参见实验室前期研究<sup>[9]</sup>；AFB<sub>1</sub> 对照品，质量分数  $\geq 98.0\%$ ，A832707-1mg，麦克林公司；M5 Plant RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒，批号 22HB0613，北京聚合美生物技术有限公司；Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H

表 1 淡豆豉中产  $\gamma$ -氨基丁酸真菌和细菌的 NCBI 对比结果  
Table 1 NCBI comparison results of  $\gamma$ -amino butyri acid-producing fungi and bacteria in *Sojae Semen Praeparatum* (SSP)

| 菌株<br>编号 | 序列<br>长度/kb | 菌株拉丁名                        | 相似度/<br>% | 登录号       |
|----------|-------------|------------------------------|-----------|-----------|
| JD2      | 529         | <i>Aspergillus niger</i>     | 100       | MG659691  |
| MD1      | 512         | <i>Aspergillus tamaril</i>   | 100       | MG662407  |
| MD2      | 466         | <i>Cladosporium</i>          | 100       | AB763554  |
| JC2      | 537         | <i>Aspergillus niger</i>     | 100       | NG659691  |
| MG1      | 564         | <i>Phanerochaete sordida</i> | 100       | KU323878  |
| MA3      | 622         | <i>Aspergillus tamaril</i>   | 100       | MG662407  |
| ME3      | 446         | <i>Penicillium citrinum</i>  | 100       | LC317721  |
| ME4      | 474         | <i>Cladosporium</i>          | 100       | AB763554  |
| 9R2      | 1 368       | <i>Enterococcus avium</i>    | 99        | NR_113899 |
| Z3R3     | 1 340       | <i>Enterococcus avium</i>    | 99        | NR_113899 |
| Xd3      | 1 378       | <i>Bacillus subtilis</i>     | 100       | NR_113265 |
| Xd1      | 1 378       | <i>Bacillus subtilis</i>     | 100       | NR_113265 |
| 15r3     | 1 368       | <i>Enterococcus avium</i>    | 99        | NR_113899 |
| 9R3      | 1 378       | <i>Enterococcus avium</i>    | 99        | NR_113899 |
| 15r1     | 1 332       | <i>Enterococcus faecium</i>  | 99        | NR_114742 |

Plus), 批号 AM81776A、AM61256A, TaKaRa 生物技术公司; Nexera X2 型超快速液相色谱仪, 日本岛津公司; AB Sciex QTRAP 4500 型三重四极杆线性离子阱串联质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; 7500 Real Time PCR System (ABI75000), Applied Biosystems 公司。

2 方法与结果

2.1 平板对峙法与交叉交叉法检测各待测菌及其发酵产物对产毒标准株生长的影响

2.1.1 各待测菌对产毒标准株生长的影响 参考本课题组前期研究<sup>[9]</sup>, 活化后培养各待测菌及产毒标准株, 吸取  $1 \times 10^5$  CFU/mL 的产毒标准株孢子液  $10 \mu\text{L}$  接种于培养基中央, 用交叉交叉法接种  $20 \mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  CFU/mL 各待测菌孢子液 (真菌) 或种子液

(细菌) 于等距的四端, 以仅接种  $1 \times 10^5$  CFU/mL 的产毒标准株孢子液于培养基中央作为对照组,  $28^\circ\text{C}$  培养 5 d, 记录产毒标准株菌落直径, 每组 3 个平行, 计算生长抑制率, 结果见表 2 和图 1。2 株黑曲霉菌 JD2、JC2 对产毒标准株的生长抑制效果为真菌中最佳, 抑制率分别为 56.05%、55.58%; 2 株枯草芽孢杆菌 Xd3、Xd1 对产毒标准株的生长抑制效果为细菌中最佳, 抑制率分别为 39.10%、29.64%。

抑制率 = (对照组菌落直径 - 实验组菌落直径) / 对照组菌落直径

2.1.2 各待测菌发酵产物对产毒标准株生长的影响 取  $1 \text{ mL } 1 \times 10^7$  CFU/mL 各待测菌孢子液或种子液于  $25 \text{ mL}$  相应的发酵培养基中, 细菌于  $37^\circ\text{C}$  发酵 3 d,

表 2 15 株菌及其发酵产物对产毒标准株的生长抑制率和 AFB<sub>1</sub> 降解率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Growth inhibition of *A. flavus* and degradation of AFB<sub>1</sub> by 15 strains ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 菌株<br>编号 | 生长抑制率/%          |                  | AFB <sub>1</sub> 降<br>解率/% |
|----------|------------------|------------------|----------------------------|
|          | 平板对峙             | 发酵产物             |                            |
| JD2      | 56.05 $\pm$ 1.16 | 48.78 $\pm$ 1.18 | 41.52 $\pm$ 0.48           |
| MD1      | 45.34 $\pm$ 2.13 | 34.62 $\pm$ 0.48 | 11.17 $\pm$ 1.29           |
| MD2      | 15.88 $\pm$ 0.39 | 29.73 $\pm$ 0.83 | 24.56 $\pm$ 0.93           |
| JC2      | 55.58 $\pm$ 1.02 | 52.12 $\pm$ 0.32 | 57.87 $\pm$ 0.86           |
| MG1      | 16.19 $\pm$ 1.56 | 25.74 $\pm$ 0.96 | 11.11 $\pm$ 0.84           |
| MA3      | 46.91 $\pm$ 0.45 | 35.01 $\pm$ 0.79 | 17.04 $\pm$ 1.53           |
| ME3      | 21.08 $\pm$ 0.39 | 28.57 $\pm$ 1.37 | 8.21 $\pm$ 0.12            |
| ME4      | 21.24 $\pm$ 0.80 | 31.27 $\pm$ 1.44 | 19.80 $\pm$ 0.86           |
| 9R2      | 25.06 $\pm$ 1.14 | 29.47 $\pm$ 0.96 | 26.12 $\pm$ 0.53           |
| Z3R3     | 27.05 $\pm$ 1.42 | 38.87 $\pm$ 1.11 | 12.59 $\pm$ 1.12           |
| Xd3      | 39.10 $\pm$ 2.27 | 43.76 $\pm$ 1.7  | 29.54 $\pm$ 0.51           |
| Xd1      | 29.64 $\pm$ 2.13 | 38.48 $\pm$ 0.18 | 43.93 $\pm$ 0.93           |
| 15R3     | 22.01 $\pm$ 0.57 | 32.95 $\pm$ 1.19 | 13.44 $\pm$ 0.97           |
| 9R3      | 16.36 $\pm$ 1.84 | 34.75 $\pm$ 0.95 | 43.76 $\pm$ 0.90           |
| 15r1     | 26.59 $\pm$ 1.31 | 28.31 $\pm$ 1.31 | 2.74 $\pm$ 0.39            |

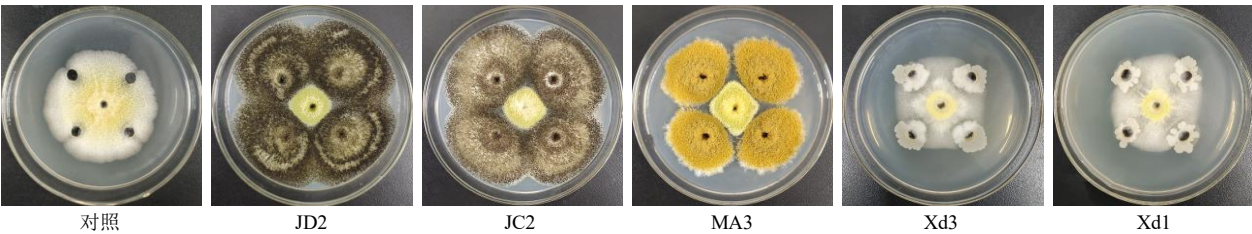


图 1 对峙法检测各待测菌对产毒标准株生长的影响

Fig. 1 Growth effect against toxigenic *A. flavus* of different strains each microorganisms detected by plate confrontation culture

真菌于 28 ℃、120 r/min 发酵 7 d, 11 269.44×g 离心 5 min 后取上清液, 0.22 μL 滤膜除菌得发酵产物。取 8 mL 与 20 mL PDA 在培养皿中混匀凝固后, 于培养皿中央接种 20 μL 1×10<sup>5</sup> CFU/mL 的产毒标准株孢子液, 以中央仅接种 1×10<sup>5</sup> CFU/mL 产毒菌标准株孢子液作对照。28 ℃培养 5 d, 记录菌落直径, 计算抑菌率, 每组 3 个平行。结果显示, 黑曲

霉菌 JD2(48.78%)和 JC2(52.12%)、溜曲霉菌 MA3(35.01%)和 MD1(34.62%)等真菌及枯草芽孢杆菌 Xd1(38.48%)和 Xd3(43.76%)鸟肠球菌 Z3R3(38.87%)和 9R3(34.75%)等细菌的抑制率较高, 结果见表 2 和图 2。

抑菌率=(对照组菌落直径-实验组菌落直径)/对照组菌落直径

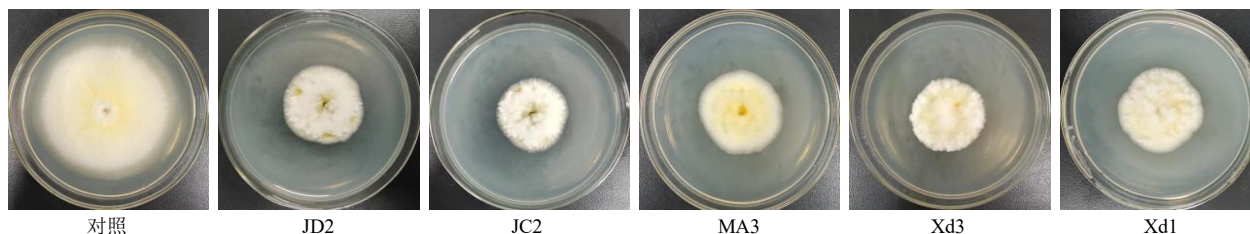


图 2 各待测菌发酵产物对产毒标准株生长的影响

Fig. 2 Effect of fermentation product of different strains on growth of toxigenic *A. flavus*

## 2.2 UPLC-MS/MS 法检测各待测菌对 AFB<sub>1</sub> 的降解率

本课题组前期已建立了 UPLC-MS/MS 法测定 AFB<sub>1</sub>, 具体色谱及质谱条件参考前期报道<sup>[9]</sup>。

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精确量取 0.1 mg AFB<sub>1</sub> 对照品于 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得 2 μg/mL 的 AFB<sub>1</sub> 对照品储存液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 吸取 1 mL 1×10<sup>7</sup> CFU/mL 待测菌孢子液或种子液, 于 25 mL 相应的发酵培养基中, 细菌 37 ℃培养 2 d、真菌 28 ℃培养 3 d 后, 避光吸取 980 μL 各菌发酵液, 加入 20 μL 100 μg/mL 的 AFB<sub>1</sub> 对照品, 对照组不接种待测菌发酵液, 37 ℃避光孵育 72 h。取孵育后液体各 1 mL, 氮气吹至近干, 加 1 mL 甲醇复溶, 10 000×g 离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜滤过, UPLC-MS/MS 上机检测。

**2.2.3 线性关系考察** 将 AFB<sub>1</sub> 对照品储存液配置成各个质量浓度的 AFB<sub>1</sub> 对照品溶液(10、50、100、150、200、250、300 ng/mL), 混匀, 上机测定。得 AFB<sub>1</sub> 回归方程为  $Y=2\,154.4X+397.36$ ,  $r=0.999\,2$ , 结果表明, AFB<sub>1</sub> 在 10~200 ng/mL 呈现良好的线性关系。

**2.2.4 精密度考察** 配制 AFB<sub>1</sub> 质量浓度为 100 ng/mL 的对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 按峰面积计算, RSD 为 1.87%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.2.5 稳定性考察** 取无菌发酵液 6 份, 精密加 AFB<sub>1</sub> 对照品溶液, 使终质量浓度为 100 ng/mL。按

“2.2.2”项下方法制备, 分别测定制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 时的 AFB<sub>1</sub> 含量, 以峰面积计算, RSD 为 0.51%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

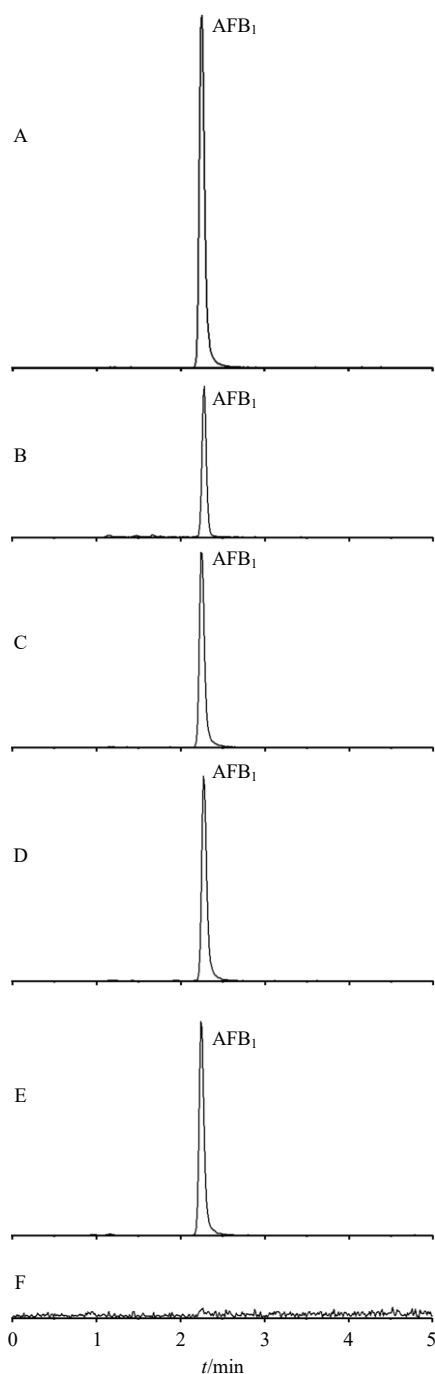
**2.2.6 重复性考察** 取无菌发酵液 6 份, 精密加 AFB<sub>1</sub> 对照品溶液, 使终质量浓度为 100 ng/mL。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 2 μL 测定, 以 AFB<sub>1</sub> 质量浓度来计算, RSD 为 1.50%, 结果表明该方法重复性良好。

**2.2.7 加样回收率考察** 取无菌发酵液 9 份, 精密加入 50、150、300 ng/mL 的对照品溶液(各 3 份), 得到高、中、低不同加标质量浓度的样品, 依“2.2.2”项方法进行样品处理, 进样检测含量。

再用甲醇制备相应质量浓度的对照品溶液, 进样分析, 检测含量。以发酵液为基质, 测得低、中、高 3 个质量浓度水平时 AFB<sub>1</sub> 的平均加样回收率分别为 98.51%、96.70%、96.76%, RSD 分别为 0.47%、2.13%、1.19%。

**2.2.8 AFB<sub>1</sub> 降解率分析** AFB<sub>1</sub> 降解实验中部分待测菌的 UPLC-MS/MS 色谱图见图 3, 结果显示, 各待测菌发酵产物对 AFB<sub>1</sub> 均有一定降解作用, 其降解率大小依次为 JC2>Xd1>9R3>JD2; 15 株待测菌发酵产物对 AFB<sub>1</sub> 降解率在 2.74%~57.87%, JC2 为真菌中最强, Xd1 为细菌中最强。结果见表 2。

综上, 15 株产 γ-氨基丁酸微生物对产毒黄曲霉菌均有一定的拮抗能力, 根据它们对产毒标准株生长的抑制效果以及对 AFB<sub>1</sub> 降解率, 综合筛选出具有高效拮抗作用的真菌和细菌各 1 株(JC2 和 Xd1)。



A-无菌发酵液加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  对照品样本; B-JC2 发酵液加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  对照品样本; C-Xd1 发酵液加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  对照品样本; D-9R3 发酵液加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  对照品样本; E-JD2 发酵液加入  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  对照品样本; F-空白发酵液。

A-sterile fermentation broth added with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  standard sample; B-JC2 fermentation broth added with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  standard sample; C-Xd1 broth added with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  standard sample; D-9R3 broth added with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  standard sample; E-JD2 broth added with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{AFB}_1$  standard sample; F-blank fermentation broth.

图 3  $\text{AFB}_1$  降解作用液质色谱图

Fig. 3 UPLC/MS/MS chromatogram of  $\text{AFB}_1$  degradation

### 2.3 高效拮抗菌对产毒标准株的菌丝生长以及 AFT 合成关键基因 mRNA 表达的影响

筛选出高效拮抗菌 (JC2、Xd1) 之后, 用菌丝干重法检测其发酵产物对产毒标准株菌丝干重的抑制情况; 利用 RT-qPCR 法检测其对 AFT 合成关键基因 mRNA 表达的影响。

**2.3.1 菌丝干重法** 于 20 mL PDB 培养基中接种  $1 \text{ mL } 1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$  的产毒标准株孢子液, 按“2.1.2”项下方法制备高效拮抗菌发酵产物, 分别按 0、250、500、1 000、1 500、2 000  $\mu\text{L}$  加入到 PDB 中,  $28^\circ\text{C}$  培养 5 d 至产毒中期。无菌纱布滤过, 收集菌丝体于  $60^\circ\text{C}$  烘至恒定质量, 测定菌丝体干质量, 每组 3 个平行, 以仅接种  $1 \text{ mL } 1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$  的产毒标准株孢子液为对照组, 计算抑制率。结果见图 4, JC2 与 Xd1 发酵产物对产毒标准株菌丝生长均有显著抑制作用, 随着发酵产物加入量的增加, 抑制率逐渐上升, 当加入量达到 2 000  $\mu\text{L}$  时, JC2 和 Xd1 菌丝生长抑制率分别为 73.82% 和 63.34%, 抑制作用良好, 表明 JC2 和 Xd1 发酵产物能明显抑制产毒黄曲霉菌生长。

抑制率 = (对照组菌丝体干质量 - 实验组菌丝体干质量) / 对照组菌丝体干质量

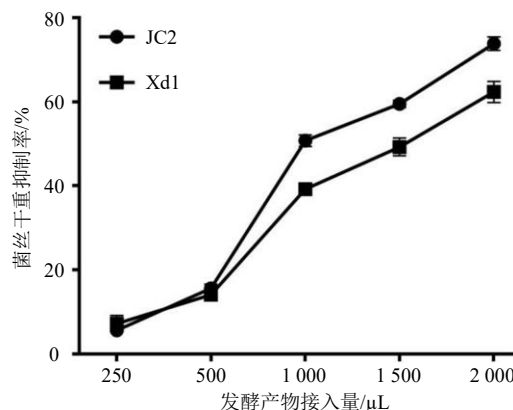


图 4 高效拮抗菌发酵产物对产毒标准株菌丝干重的影响

Fig. 4 Effect of highly efficient antagonistic microorganisms fermentation products on mycelia dry weight of toxigenic *A. flavus*

### 2.3.2 RT-qPCR 法

(1) 总 RNA 的提取: 按“2.3.1”项下条件培养产毒标准株至产毒中期, 分别取加入了 500、1 000、2 000  $\mu\text{L}$  高效拮抗菌发酵产物的黄曲霉菌丝, 抽滤, 于液氮中迅速冷冻,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。再取未加入高效拮抗菌发酵产物的黄曲霉菌丝作为空白组进行同样操作。提取 RNA 所用的玻璃器皿、研钵等用

0.1% DEPC 水 37 °C 浸泡 12 h, 121 °C 灭菌 30 min, 称取冻存的新鲜菌株 100 mg, 液氮研磨法进行 RNA 提取, 具体方法参见 M5 Plant RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒说明书。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 超微量分光光度计检测 RNA 质量浓度。所提取的总 RNA 其  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0, 完整性好, 无降解, 可用于后续反应。

(2) 去 DNA 反应: 对样品中可能存在的 DNA 进行去除, 向除酶管中加入 total RNA 1  $\mu$ g, 5 $\times$  gDNA Eraser Buffer 2  $\mu$ L, gDNA Eraser 1  $\mu$ L, 补 Rnase free dH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L, 在 PCR 仪中 42 °C 2 min 反应, 4 °C 下保存。

(3) cDNA 的合成: 采用 TaKaRa 反转录试剂盒进行。反应体系: 总 RNA 10  $\mu$ L, Rnase free dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L, 5 $\times$  Prime Script Buffer 4  $\mu$ L, RT Prime MTX 1  $\mu$ L, Prime Script RT Engine MTXI 1  $\mu$ L。反转录条件: 37 °C、15 min; 85 °C、5 s; 1 个循环。

(4) RT-qPCR 检测基因的表达情况: 方法要求设计引物的合成片段不宜过大 (50~200 bp), 选用 18S rRNA (F: 3'-GCTCTTTGGGTCTCGTAATTGG-5'; R: 3'-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-5') 作为内参基因, 其他所用引物为 *aflR* (F: 3'-GATAGC-TGTACGAGTTGTGC-5'; R: 3'-CAGCCCAGCGG-GGCGTGGGG-5')<sup>[10]</sup>, *aflD* (F: 3'-ACCGCTACGC-CGGCACTCTCGGCAC-5'; R: 3'-GTTGGCCGCC-AGCTTCGACACTCCG-5')<sup>[10]</sup>, *aflM* (F: 3'-GTGG-GCCTCCCTGTGGAT-5'; R: 3'-CACTTACCCATTC-GGCTGTGT-5')<sup>[11]</sup>, *aflP* (F: 3'-CACGCTTTCAGA-GCAGGTAA-5'; R: 3'-TTCGGTGGAGGAGGGAG-

TT-5')<sup>[12]</sup>。采用 TaKaRa 公司的 TB Green® Premix Ex Taq™ 进行 RT-qPCR 反应, 反应体系: 稀释后的 cDNA 溶液 2  $\mu$ L, TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.4  $\mu$ L, ROX Reference DyeII 0.4  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L, 反应设 1 复孔, 以 2  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O 取代 cDNA 作为空白对照。每组 3 个平行。反应条件: 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、34 s, 40 循环; 95 °C、15 s; 60 °C、1 min; 95 °C、15 s。

(5) 引物特异性: 将 4 对特异性引物进行实时荧光定量 PCR 反应, 观察熔解曲线是否为单一峰, 以判断引物的特异性, 结果见图 5。4 对引物的熔解曲线均为单一峰, 可见设计的引物特异性良好。

(6) 数据分析: 反应结束后, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算不同样品中各基因的相对表达量, 结果见表 3。随着发酵产物加入量的增加, 2 株高效拮抗菌对毒素合成 4 个关键基因的 mRNA 表达水平下调趋势逐渐显著,

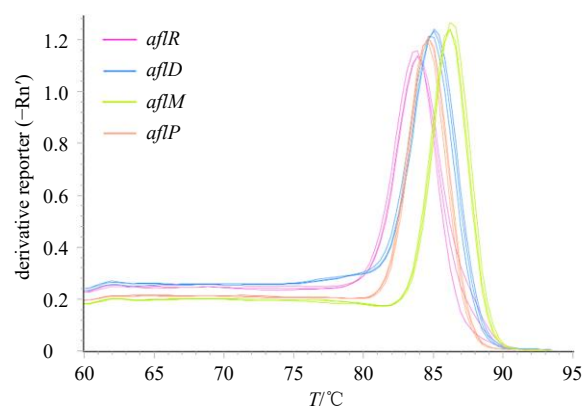


图 5 荧光定量 PCR 4 对引物溶解曲线

Fig. 5 RT-qPCR four-pair primer dissolution curve

表 3 高效拮抗菌发酵产物对黄曲霉菌毒素合成关键基因 mRNA 表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of highly efficient antagonistic fermentation products on mRNA expression of key genes in aflatoxin synthesis

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 发酵产物<br>加入量/ $\mu$ L | 基因 mRNA 相对表达量 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) |                     |                     |                     |
|-----|----------------------|-------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|     |                      | <i>aflR</i>                               | <i>aflD</i>         | <i>aflM</i>         | <i>aflP</i>         |
| 空白  | 0                    | 1.000 $\pm$ 0.000                         | 1.000 $\pm$ 0.000   | 1.000 $\pm$ 0.000   | 1.000 $\pm$ 0.000   |
| JC2 | 500                  | 0.426 $\pm$ 0.008**                       | 0.858 $\pm$ 0.035** | 0.437 $\pm$ 0.012** | 0.841 $\pm$ 0.045** |
|     | 1 000                | 0.242 $\pm$ 0.032**                       | 0.380 $\pm$ 0.049** | 0.405 $\pm$ 0.045** | 0.560 $\pm$ 0.019** |
|     | 2 000                | 0.098 $\pm$ 0.005**                       | 0.220 $\pm$ 0.021** | 0.263 $\pm$ 0.025** | 0.266 $\pm$ 0.003** |
|     | 2 000                | 0.098 $\pm$ 0.005**                       | 0.220 $\pm$ 0.021** | 0.263 $\pm$ 0.025** | 0.266 $\pm$ 0.003** |
| Xd1 | 500                  | 0.566 $\pm$ 0.036**                       | 0.228 $\pm$ 0.017** | 0.697 $\pm$ 0.018** | 0.482 $\pm$ 0.028** |
|     | 1 000                | 0.415 $\pm$ 0.026**                       | 0.107 $\pm$ 0.009** | 0.367 $\pm$ 0.040** | 0.349 $\pm$ 0.010** |
|     | 2 000                | 0.144 $\pm$ 0.017**                       | 0.075 $\pm$ 0.003** | 0.245 $\pm$ 0.042** | 0.176 $\pm$ 0.005** |
|     | 2 000                | 0.144 $\pm$ 0.017**                       | 0.075 $\pm$ 0.003** | 0.245 $\pm$ 0.042** | 0.176 $\pm$ 0.005** |

与空白组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs blank group.

当 JC2 发酵产物加入量为 2 000  $\mu\text{L}$  时, *aflR* 表达下调最为明显, 依次为 *aflD*、*aflM*、*aflP*; 当 Xd1 发酵产物加入 2 000  $\mu\text{L}$  时 4 个基因下调程度由高到低依次为 *aflD*、*aflR*、*aflP*、*aflM*。

$$\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ 靶基因} - C_t \text{ 内参})_{\text{试验组}} - (C_t \text{ 靶基因} - C_t \text{ 内参})_{\text{空白组}}$$

$C_t$  表示在反映中 cDNA 样本荧光信号达到设定阈值所需的循环数

### 3 讨论

目前, AFT 的去除方法主要包括物理法、化学法和生物法。生物法降解 AFT 相比于常规的物理、化学法更加温和、安全和经济。本实验从 15 株产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物中筛选出具有抑制产毒黄曲霉菌生长和降解 AFB<sub>1</sub> 的高效拮抗菌——黑曲霉菌 (JC2) 和枯草芽孢杆菌 (Xd1), 黑曲霉菌不仅可以有效抑制产毒黄曲霉菌的生长, 使其生长速度减慢, 还可以有效降解培养基中已经产生的 AFB<sub>1</sub>, 它是通过直接代谢和分泌胞外酶 (主要方式) 2 种途径共同降解 AFB<sub>1</sub> 的<sup>[13]</sup>。

有学者<sup>[14]</sup>从黑曲霉发酵产物中分离出了一种能明显干扰 AFT 毒素合成信号传导途径、抑制黄曲霉生长的抗真菌肽 (antifungal peptide, AFP), 认为黑曲霉抑制黄曲霉菌的活性成分可能主要为其分泌具有半胱氨酸的抗真菌肽; 此外, 枯草芽孢杆菌也主要通过分泌胞外活性物质来抑制产毒黄曲霉菌生长和降解黄曲霉毒素, 这些化合物, 尤其是脂肽和蛋白酶, 是抑制黄曲霉菌生长和脱除 AFT 的有效因子<sup>[15]</sup>。其机制可能是拮抗物质使菌丝细胞壁出现消融, 降低孢子萌发率来实现<sup>[16]</sup>。另外, 目前国内外已有将黑曲霉菌<sup>[17]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[18]</sup>作为生防菌防控 AFT 的应用研究。

近年来, 随着 AFT 合成及调控机制的研究深入, 已经确定位于黄曲霉菌 3 号染色体端粒上的一段包含 30 个基因的基因簇影响着 AFT 合成, 它们的 mRNA 表达水平直接影响 AFT 的合成水平<sup>[19]</sup>。其中, *aflR* 编码一个具有锌指结构的 DNA 结合蛋白 (AflR), 该蛋白可以结合 AFT 途径基因启动子区的回文序列 (5'-TCGN5CGA-3') 从而激活基因的表达, 因此 *aflR* 基因对 AFT 合成来说是必需的, 有研究表明: *aflR* 基因转录水平在产毒黄曲霉菌中很明显, 在不产毒黄曲霉菌株中, *aflR* 基因的转录却受到了明显的抑制, 甚至不表达<sup>[20]</sup>。合成 AFT 至少经历 18 个酶促反应, 而位于毒素合成基因簇上的 *aflD*、*aflM*、*aflP* 所表达的 AFLD、AFLM 和 AFLP

蛋白分别在 AFT 合成早、中、晚期起着至关重要的催化作用<sup>[21]</sup>。它们的表达直接调控着产 AFT 微生物毒素合成代谢路径上多个关键物质的转化<sup>[22-24]</sup>。

本实验发现, JC2、Xd1 发酵产物在 PDB 中具有很强的抑制产毒黄曲霉标准株菌丝生长作用; 不同浓度发酵产物作用后, 提取菌丝 RNA 进行实时荧光定量 PCR, 它们对黄曲霉毒素合成激活基因及毒素合成的早、中、晚期催化基因的 mRNA 表达量均有明显抑制, JC2 发酵产物对 *aflR* 基因的 mRNA 表达下调最为明显, 而 Xd1 对 *aflD* 基因的 mRNA 表达下调最明显, 推测 JC2 可能主要通过下调毒素合成激活基因的表达, 而 Xd1 可能主要通过限制毒素合成早期诺素罗瑞尼克酸 (NOR) 的转化<sup>[22]</sup>。

本实验筛选的高效拮抗菌 JC2、Xd1, 在其安全性达标之后, 通过混菌发酵<sup>[25]</sup>等方法不仅能为提高淡豆豉  $\gamma$ -氨基丁酸含量提供有潜力的候选菌株, 也将为防控淡豆豉的 AFT 污染、揭示“再闷”后期 AFT 降解机制提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 李婷, 胡小松, 巩颖, 等. 中药材中黄曲霉毒素的防控措施研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 228-234.
- [2] 李翠英, 贺婧, 戴家齐, 等. 淡豆豉炮制过程中不产毒黄曲霉菌的分布特征及其对产毒菌的拮抗作用 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1775-1782.
- [3] Pickova D, Ostry V, Toman J, et al. Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation [J]. *Toxins*, 2021, 13(6): 399.
- [4] 李汶, 庄学聪. ELISA 法检测常用中药黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> [J]. 中国药事, 2000, 14(2): 101-102.
- [5] Qiu F, Shi H N, Wang S Q, et al. Safety evaluation of *Semen Sojae Preparatum* based on simultaneous LC-ESI-MS/MS quantification of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and M<sub>1</sub> [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(8): e4541.
- [6] 王郡瑶, 程显隆, 李婷, 等. 发酵类中药质量控制现状和问题 [J]. 中国食品药品监管, 2022(2): 60-68.
- [7] 陈青峰, 贺婧, 谢小梅, 等. 淡豆豉炮制中  $\gamma$ -氨基丁酸含量测定及其抗抑郁作用研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 688-694.
- [8] 熊京京, 任佳秀, 周姝含, 等. 淡豆豉炮制过程中产  $\gamma$ -氨基丁酸微生物的筛选和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2266-2273.
- [9] 李春玲, 贺婧, 王立元, 等. 淡豆豉炮制过程中拮抗菌对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的拮抗能力考察 [J]. 中草药, 2021,

- 52(12): 3544-3551.
- [10] 徐丹. 酿造酱油中 AFTB<sub>1</sub> 的产生及其控制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [11] Buitimea-Cantúa G V, Buitimea-Cantúa N E, Rocha-Pizaña M D R, *et al.* Inhibitory effect of *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits, capsaicin and piperine on aflatoxins production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of *afl D*, *afl M*, *afl R*, and *afl S* genes of aflatoxins biosynthetic pathway [J]. *J Environ Sci Health B*, 2020, 55(9): 835-843.
- [12] 宁焕宸. 枯草芽孢杆菌 J-15 代谢产物抑制黄曲霉生长及产毒作用 [D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2022.
- [13] 陈志辉, 徐馨, 李仲玉, 等. 黑曲霉菌降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的影响因素的研究 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(12): 110-113.
- [14] Gun Lee D, Shin S Y, Maeng C Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(3): 646-651.
- [15] Veras F F, Correa A P F, Welke J E, *et al.* Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines [J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 238: 23-32.
- [16] 张学雯, 王奕丁, 李红亚, 等. 黄曲霉拮抗菌 B10-6-1 脂肽类抗生素粗提物的性质与抑菌机理研究 [J]. 湖北农业科学, 2019, 58(14): 70-75.
- [17] Fang Q A, Du M R, Chen J W, *et al.* Degradation and detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by tea-derived *Aspergillus niger* RAF106 [J]. *Toxins*, 2020, 12(12): 777.
- [18] 赵杨, 要灿, 郭晓军, 等. 黄曲霉毒素降解菌 N-1a 的降解特性及在全株玉米青贮中的应用 [J]. 中国饲料, 2019(17): 30-34.
- [19] Caceres I, Khoury A A, Khoury R E, *et al.* Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review [J]. *Toxins*, 2020, 12(3): 150.
- [20] 陈茹, 刘钟滨. 黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列变异与 AFT 产生相关联 [J]. 细胞生物学杂志, 2006(6): 912-916.
- [21] Abdel-Hadi A, Carter D, Magan N. Temporal monitoring of the nor-1 (*aflD*) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B<sub>1</sub> production during storage of peanuts under different water activity levels [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(6): 1914-1922.
- [22] 王婷. 黄曲霉菌及其毒素合成关键酶抗体的研制 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [23] Skory C D, Chang P K, Cary J, *et al.* Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(11): 3527-3537.
- [24] Yu J, Cary J W, Bhatnagar D, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* encoding an *O*-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(11): 3564-3571.
- [25] 王琛郴, 叶淑红, 龙丹丹, 等. 混菌发酵黑木耳合成  $\gamma$ -氨基丁酸的工艺优化 [J]. 食用菌学报, 2023, 30(1): 91-102.

[责任编辑 郑礼胜]