

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(7):956-964; 4 July 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

乳杆菌吸附苯并芘的特性

漆叶琼¹, 张佳涛¹, 潘向辉¹, 裴家伟^{1*}, 张柏林^{1,2*}

¹河北农业大学食品科技学院, 保定 071000

²北京林业大学食品科学系, 北京 100083

摘要:【目的】探讨植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 121 和戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) ML32 的苯并芘吸附作用与机制。【方法】采用高效液相色谱检测菌体对苯并芘的吸附率。【结果】菌株 121 和 ML32 对苯并芘的吸附率分别为 65.9% 和 64.9%, 这种吸附特性与菌体活力无关, 随培养时间延长、温度提高以及细胞浓度的上升而增加。菌株 121 和 ML32 的吸附率在 pH 4 和 5 时达到最大, 分别为 87.6% 和 89.0%。当培养液中 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 浓度大于 0.05 mol/L 时, 菌体吸附率与盐离子浓度呈正相关。苯洗脱会导致乳杆菌所吸附的苯并芘减少 90%。经碱性蛋白酶、中性蛋白酶、溶菌酶及 TCA 和 SDS 等方法处理后, 菌体吸附率上升, 且不易被苯去除。在胆盐及胃酸环境下, 两株菌的吸附率均提高至 70% 以上, 而胰蛋白酶的存在仅对菌株 121 的吸附率有较大影响。【结论】两株乳杆菌可以通过吸附作用从环境中清除苯并芘, 其吸附效果与细菌细胞壁的结构和组成有关。

关键词: 乳杆菌, 苯并芘, 吸附作用

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)07-0956-09

长期以来, 乳酸菌的抗癌与抗突变特性^[1] 是学者与商家关注的问题之一。Goldin 报道, 给小鼠喂食嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 可以降低致癌物 1,2-二甲基联苯 (DMH) 诱导的结肠癌发生几率^[2]。Pool-Zobel 指出, 摄入乳酸菌可以预防小鼠胃肠液中致癌物引起的 DNA 损伤^[3]。研究显示, 乳酸菌对存在于食物中的多种致癌及致突变因子都具有抵抗作用, 如真菌毒素、杂环胺以及多环芳烃等, 但其机制尚不完全明确。部分研究认为, 乳酸菌细胞因吸附致突变因子, 避免宿主对它的吸收代谢, 从而具有抗癌或抗突变作用^[4]。Sreekumar 报道, 格氏乳杆菌 (*L. gasseri*) 能够吸附致突变物 Trp-P-1 (色氨酸热解产物), 吸附率达到 80%, 吸附位点主要在细胞壁,

而胞壁多糖可能是重要的吸附因子^[5]。El-Nezami 等报道, 鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) LGG 对黄曲霉毒素 B1 表现出良好的吸附能力, 吸附率达到 79%, 且这种吸附作用是一个物理过程^[6]。

苯并芘是一种强致癌物, 是环境中多环芳烃物质存在与否的一个重要标志。苯并芘进入体内后, 在细胞色素酶系 P450 作用下, 经一系列活化反应生成致癌物, 将直接作用于 DNA, 诱发癌症产生^[7]。由于环境污染及不当的烹调方式, 部分食物中也会含有苯并芘^[8], 长期食用, 毒性积累, 会对人体健康产生极大危害。目前, 在乳酸菌抗突变方面, 对黄曲霉毒素及杂环胺类致癌物的研究较多, 而对去除苯并芘等多环芳烃类物质的报道较少。本实验以筛选

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) “益生菌定向筛选与功能开发关键技术 (2008AA10Z335)”

* 通信作者。Tel: +86-312-7528439; E-mail: zhangbolin888@163.com, peijw@yahoo.com.cn

作者简介: 漆叶琼 (1985-), 女, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: qiyeq@163.com

收稿日期: 2011-02-26; 修回日期: 2011-03-20

到的对苯并芘具有较高吸附率的乳杆菌菌株为材料, 探讨乳杆菌吸附苯并芘的特性, 旨在为利用乳杆菌开展苯并芘生物脱除方面的应用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 所选菌株分别为植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、戊糖乳杆菌 (*L. pentosus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 共 14 株, 均由中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC) 收藏; 2 株大肠杆菌 (*E. coli*) 由河北农业大学食品科技学院微生物实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 苯并芘 ($\geq 99\%$, Sigma)、胰蛋白酶 (Sigma)、胃蛋白酶 (Sigma)、甲醇 (色谱纯)、苯等; 高效液相色谱仪 (Agilent1200)、紫外/可见分光光度计 (普析通用)、反向 Luna-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm 5 μ m, Phenomenex) 等。

1.2 菌体悬液的制备

将 14 株乳杆菌按 4% 接种量转接于 MRS 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 18–22 h。大肠杆菌按 3% 接种量转接于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12–16 h。将培养液离心 (4 $^{\circ}$ C, 5 000 \times g, 5 min) 收集菌体, 无菌水离心洗涤 2 次, 据各菌体生长曲线调整细胞浓度为 5 \times 10⁹ cfu/mL。

1.3 菌体对苯并芘吸附率的测定

取供试菌株悬液 1 mL 离心 (4 $^{\circ}$ C, 5000 \times g, 5 min) 收集菌体, 加 900 μ L 无菌水, 100 μ L 苯并芘工作液 (100 μ g/mL), 得到含有 10 μ g/mL 苯并芘的菌悬液。将该混合液 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 离心 (3000 \times g, 5 min) 收集上清。将上清液于 75 $^{\circ}$ C 水浴中减压蒸馏至 150 μ L, 冷却后加入 500 μ L 氯仿, 超声萃取 10 min, 静置分层。取有机相于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 用 HPLC 法检测苯并芘的含量。以不含乳杆菌细胞的 10 μ g/mL 苯并芘水溶液 (1 mL) 作为空白对照^[9]。

色谱条件: 紫外检测波长 299 nm, 流动相为纯甲醇, 柱温 39.9 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μ L。

苯并芘吸附率 (%) = [(空白样中苯并芘的含量 - 上清液中苯并芘的含量)

/ 空白样中苯并芘的含量] \times 100%

1.4 吸附苯并芘菌株的筛选

将 16 株供试菌按操作 1.2 与 1.3 所述分别制

备菌悬液, 并测定苯并芘吸附率。

1.5 影响乳杆菌吸附苯并芘的物理因素

按操作 1.3 ①将 2 株供试菌 (5 \times 10⁹ cfu/mL), 即植物乳杆菌 121 和戊糖乳杆菌 ML32 (以下同) 与苯并芘 (10 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C 分别培养 1、2、4、10、24、48 h。②将 2 株菌的细胞浓度分别调至 5 \times 10⁷、5 \times 10⁸、5 \times 10⁹、5 \times 10¹⁰、5 \times 10¹¹ cfu/mL, 与苯并芘 (10 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h。③将 2 株菌 (5 \times 10⁹ cfu/mL) 与苯并芘 (10 μ g/mL) 分别在 4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 培养 4 h。培养结束后, 取样测定不同培养时间、菌体浓度以及温度下菌体的苯并芘吸附率^[10]。

取 2 株供试菌分别悬浮于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3、4、5、6) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7、8、9) 中, 添加苯并芘工作液 (100 μ g/mL) 至 10 μ g/mL, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 按操作 1.3 测定苯并芘吸附率。以不含乳杆菌的缓冲液与苯并芘工作液混合, 作为空白对照。

将菌体分别悬浮于浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、1 mol/L 的 CaCl₂ 及 MgCl₂ 溶液中, 室温静置处理 1 h, 离心洗涤 1 次, 按操作 1.3 测定其菌体吸附率。

1.6 不同处理方式下菌体的吸附特性及吸附后稳定性

热及酸处理^[11]: ①取 2 株供试菌悬液 100 $^{\circ}$ C 加热 15 min; ②将菌体悬浮于 2 mol/L HCl 溶液中, 静置处理 90 min, 无菌水离心洗涤 2 次。将处理后的菌体按操作 1.3 测定苯并芘吸附率。取未经处理的菌体作为对照。

酶及化学处理: 取 2 株供试菌悬液, 离心后向菌体沉淀内: ①加入 10 mL 8% SDS (或 10% TCA), 沸水浴搅拌 10 min (或 20 min), 迅速冷却至室温, 离心洗涤 6 次至无泡沫^[12]; ②加入 0.05 mol/L 高碘酸钠溶液 (NaIO₄) 4 $^{\circ}$ C 反应 12 h, 离心洗涤 2 次; ③分别加入 10 mg/mL 中性蛋白酶, 10 mg/mL 碱性蛋白酶, 0.5 mg/mL 蛋白酶 E, 4 mg/mL 溶菌酶, 40 $^{\circ}$ C 摇床 (150 \times g) 培养 4 h, 离心洗涤 2 次^[13]; ④加入 0.3% TritonX-100 裂解液^[14] (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.3% (V/V) TritonX-100, 0.0002 mol/L NaCl, 10% (V/V) 蔗糖, 1 mol/L Na-EDTA, pH 为 7.2) 4 $^{\circ}$ C 处理 12 h, 离心洗涤 2 次, 分为 2 份, 一份用于测定菌体吸附率, 另一份重悬于该裂解液中, 加入溶菌酶 (4 mg/mL) 4 $^{\circ}$ C 下继续处理 24 h, 离心洗涤。经上

述各方式处理后按 1.3 所述测定菌体吸附率。

吸附稳定性:将上述方式处理后的菌体与苯并芘培养,离心收集菌体沉淀,加入苯(每 5×10^9 cfu/mL 菌体加入 1 mL),反复震荡,离心后取有机相,利用 HPLC 法测定洗脱液中苯并芘的含量。

1.7 胃肠环境下乳杆菌对苯并芘的吸附性研究

将 2 株供试菌分别悬浮于浓度为 3、2.5、1.5、1、0.3 g/L 的牛胆盐溶液或胰蛋白酶溶液(无菌水 500 mL 溶解 KH_2PO_4 6.8 g,以 0.4% (W/V) NaOH 调节 pH 为 6.8,加水至 1 L,添加胰蛋白酶 1 g/100 mL,250 U/mg)中,调整菌体浓度为 5×10^9 cfu/mL,37℃ 处理 2、4、6、8 h,分别取样离心洗涤 1 次,按 1.3 所述测定处理后菌体的苯并芘吸附率。

将 2 株乳杆菌分别悬浮于 pH 为 1.5、2.5、3.5、4.5 的人工胃液(用无菌水稀释 10% (W/V) HCl 以调节 pH,添加胃蛋白酶 1 g/100 mL,10000 U/mg)中,调整浓度为 5×10^9 cfu/mL,37℃ 处理 1、2、3、4 h,分别取样离心洗涤 1 次,检测处理后菌体的苯并芘吸附率^[15]。

1.8 数据分析

采用 SPSS17.0 统计软件对实验数据进行统计分析,做 *t* 检验及单、双因素方差分析,所有实验均重复 3 次,实验数据采用平均值±标准差表示。

2 结果和分析

2.1 吸附苯并芘菌株的筛选

从表 1 可以看出,14 株乳杆菌和 2 株大肠杆菌对苯并芘的吸附效果不同,菌株间差异较大。其中,植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 121 和戊糖乳杆菌 (*L. pentosus*) ML32 具有较好的吸附效果,吸附率分别达到 65.9% 和 64.9%,而瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) LH-1 的吸附率仅为 8.4%。大肠杆菌 (*E. coli*) JM-2 和 F33 的吸附率明显较多数乳杆菌低。因此,我们选取吸附效果较好的植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 121 和戊糖乳杆菌 (*L. pentosus*) ML32 作进一步的吸附特性研究。

2.2 影响乳杆菌吸附苯并芘的物理因素

2.2.1 培养时间:在 24 h 培养时间内,2 株乳杆菌对苯并芘的吸附速度较快,24 h 时达到最大,吸附率分别为 99.1% 和 99.8% (见图 1-A)。这一时期,

表 1 不同菌株的苯并芘吸附率

Table 1 Percentage of BaP bound to different strains		
Species	Strain	The percentage of BaP-binding /%
<i>L. plantarum</i>	121	65.9 ± 1.23
<i>L. casei</i>	D-400	26.1 ± 0.36
<i>L. acidophilus</i>	1132	10.2 ± 0.66
<i>L. plantarum</i>	ZJ1	9.6 ± 1.87
<i>L. pentosus</i>	SD6	17.7 ± 0.87
<i>L. helveticus</i>	LH-2	43.4 ± 1.63
<i>L. pentosus</i>	SN23	32.7 ± 1.63
<i>L. plantarum</i>	C33	27.4 ± 1.98
<i>L. pentosus</i>	ML32	64.9 ± 1.28
<i>L. helveticus</i>	LH-1	8.4 ± 1.48
<i>L. pentosus</i>	X28	13.8 ± 0.86
<i>L. casei</i>	Y5-2b	43.9 ± 1.87
<i>L. helveticus</i>	H-1	49.6 ± 1.23
<i>L. plantarum</i>	B37	34.9 ± 1.78
<i>E. coli</i>	JM-2	23.4 ± 0.88
<i>E. coli</i>	F33	19.8 ± 1.53

菌株 121 及 ML32 的吸附率与培养时间成正相关。24 h 以后,2 株菌的吸附率均略有下降。EL-Nezam 等报道,鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) LGG 及 LC-705 对黄曲霉毒素 B1 的吸附率在 0 h 内即达到 78% 以上。这说明供试菌株对苯并芘的吸附作用是一个缓慢的过程,与吸附黄曲霉毒素 B1 不太一样,这可能与致癌物的结构种类不同有关^[6]。

2.2.2 菌体浓度:图 1-B 显示,乳杆菌 121 及 ML32 的细胞浓度在 10^7 cfu/mL- 10^{11} cfu/mL 范围时,与苯并芘吸附率成正相关。当菌体浓度为 10^{11} cfu/mL 时,HPLC 只能检测到微量苯并芘,说明苯并芘的减少确与乳杆菌的存在有关,这与 Sreekumar 的研究结果一致。同时,Sreekumar 还指出乳酸菌菌体表面对致癌物的这种吸附作用是有限的,达到一定程度,吸附率将不再提高^[5]。

2.2.3 温度:由图 1-C 可见,在 4℃ - 50℃ 范围内,随培养温度上升,2 株乳杆菌吸附苯并芘的效果逐渐提高,吸附率与培养温度之间呈一定的正相关性。在 Zinedine 的报道中,乳酸菌在 25℃ 时对黄曲霉毒素 B1 的吸附率达到最大,在 15℃ 及 37℃ 时吸附率较低,这与乳杆菌在不同温度下对苯并芘的吸附特性不尽相同。Zinedine 认为是细胞壁酶参与了菌体对黄曲霉毒素 B1 的吸附,因此酶的温度敏感性导致了菌体吸附性的温度敏感性^[16]。本实验中温度对菌体吸附苯并芘的影响机制还有待于进一步研究。

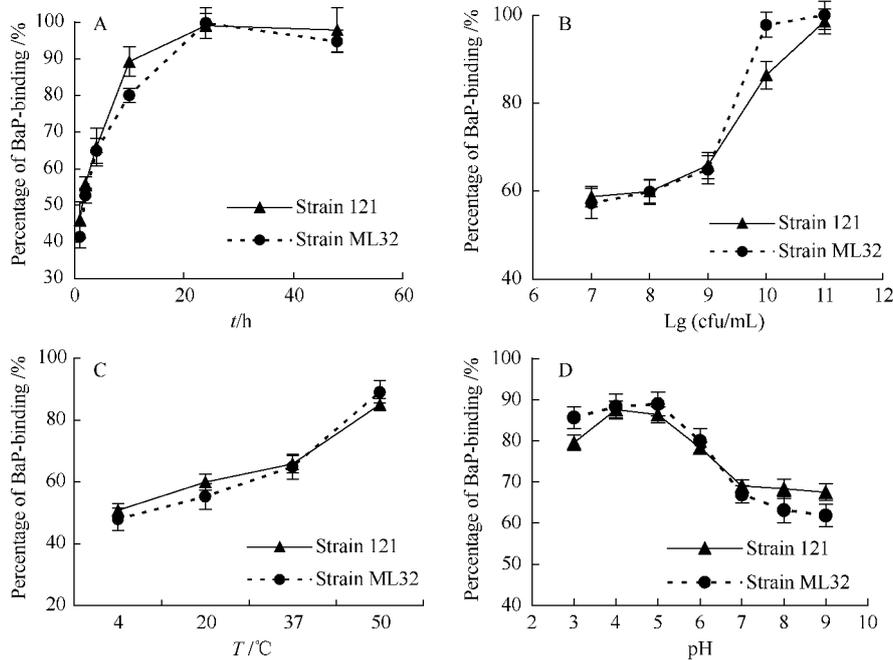


图 1 培养时间(A)、菌体细胞浓度(B)、温度(C)及 pH(D)对乳杆菌 121 和 ML32 吸附苯并芘的影响

Fig.1 Effects of incubation time (A) , cell concentrations of strains (B) , temperatures (C) and pH (D) on BaP bond by strains 121 and ML32.

2.2.4 pH:由图 1-D 可以看出,在 pH 为 3 - 5 时,菌株 ML32 吸附苯并芘的能力较高,在 pH 为 4 - 5 时,菌株 121 的苯并芘吸附能力较高,两株菌的吸附率均大于 80%。当 pH 大于 5 时,2 株乳杆菌的吸附率显著下降。而在 pH 为 7 - 9 时,2 株菌的吸附率变化不显著。显然,酸性环境有利于提高供试菌株对苯并芘的吸附能力。许多文献报道,pH 是影响乳酸菌吸附致突变因子的重要因素,其影

响效果因菌株及致癌物的不同而不同^[4],有的吸附效果随 pH 升高而升高,有的则随 pH 升高而降低,有的仅在某一 pH 范围才会产生较大吸附率^[17]。

2.2.5 金属离子:由图 2-A 可见,经 0.05 mol/L Ca²⁺ 处理后,乳杆菌吸附苯并芘的能力无显著变化,当 Ca²⁺ 浓度增大后,2 株菌的吸附能力逐渐提高,至浓度为 1 mol/L 时,吸附率达到最大,分别为 98.4%

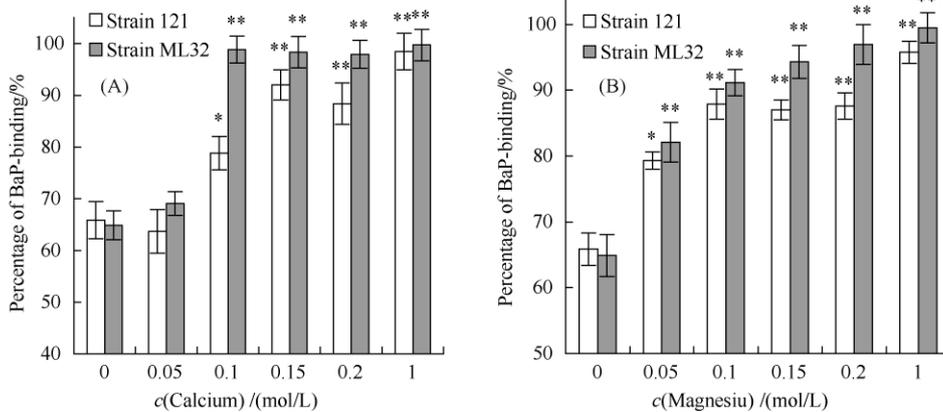


图 2 Ca²⁺ (A) 及 Mg²⁺ (B) 对菌株 121 和 ML32 吸附苯并芘的影响

Fig.2 Effects of Ca²⁺ (A) or Mg²⁺ (B) concentrations on BaP bond by strains 121 and ML32.

Note: * :P < 0.05 , ** :P < 0.01 compared with strains without treatments.

和 99.7%。Mg²⁺ 处理后,菌株 121 及 ML32 吸附特性的变化与 Ca²⁺ 处理后的结果相似(见图 2-B),但经 0.05 mol/L Mg²⁺ 处理后 2 株菌的吸附率已呈显著性提高。

2.3 不同处理方式下菌体的吸附特性及吸附后稳定性

2.3.1 不同活力下菌体的吸附特性及其稳定性:由表 2 可以看出,热灭活处理后 2 株菌的苯并芘吸附率与未处理菌株相比无显著性差异。经苯洗脱后,

热灭活菌体的吸附率分别下降到 25.2% 和 32.0%。酸处理后 2 株菌的吸附率呈极显著上升,经苯洗脱后,酸处理菌体的吸附率仅下降至 52.9% 和 53.6%。未处理菌株吸附苯并芘后,经苯洗脱 2 株菌的吸附率下降到 6.9% 和 5.2%。这说明菌体吸附苯并芘的稳定性较低,易被苯除去。同时,热与酸的处理可以使两株菌的吸附稳定性有所增强,尤其是酸处理后,菌体吸附率也有所上升,说明这两种处理方式会引起菌体吸附苯并芘的机制发生变化。

表 2 菌体活力对苯并芘吸附率的影响及吸附后的稳定性

Table 2 Percentage of BaP bound to viable cells, heat-treated and acid-treated bacterial cells

Strain	Treatment	The percentage of BaP-binding /%		
		Viable	Acid-treated	Heat-treated
121	No treatment	65.9 ± 2.01	91.6 ± 1.23**	68.2 ± 2.21
	After 1 wash by benzene	6.9 ± 2.45	52.9 ± 2.30**	25.2 ± 2.65**
ML32	No treatment	64.9 ± 3.00	95.0 ± 1.36**	61.4 ± 1.35
	After 1 wash by benzene	5.1 ± 2.36	53.6 ± 1.57**	32.0 ± 1.75**

Note: * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ compared with viable strains.

2.3.2 酶及化学处理对菌体吸附苯并芘的影响

由表 3 可见 2 株乳杆菌经酶及化学处理后,苯并芘吸附率均有显著提高。溶菌酶与 TritonX-100 联合处理以及溶菌酶单独处理、SDS 煮沸处理均会使 2 株菌的吸附率提高至 90% 以上。TCA、NaIO₄ 及 TritonX-100 处理使菌体吸附率提高至 80% 以上,而蛋白酶处理(中性蛋白酶,碱性蛋白酶及蛋白酶 E)对菌体吸附率的影响较其他处理方式弱一些。

2 株乳杆菌经不同方式处理后,对苯并芘的吸附稳定性均有所提高。其中,经联合处理的菌株吸附稳定性最高,苯洗脱后,吸附率分别达到 65.4% 和 62.3%。TritonX-100 及蛋白酶处理后,稳定性次之,而经 TCA 处理的菌株吸附稳定性最低,苯洗脱后,吸附率仅达到 17.5% 和 17.0%。不同处理方式对菌体细胞产生了不同的影响,由此可能造成了菌体吸附率及吸附稳定性的差异。

表 3 预处理方式对菌体吸附苯并芘能力的影响

Table 3 Effects of several pre-treatments on the ability of strains 121 and ML32 to bind BaP

Bacterial treatment	The percentage of BaP-binding /%			
	Strain 121		Strain ML32	
	Supernatant	After wash by benzene	Supernatant	After wash by benzene
Lysozyme	99.0 ± 1.42	30.0 ± 3.10	99.9 ± 2.36	26.4 ± 3.20
10% TCA: 100°C 20min	90.3 ± 1.36	17.5 ± 2.63	88.6 ± 2.17	17.0 ± 2.65
NaIO ₄ : 4°C 12h	85.6 ± 1.02	31.4 ± 2.56	83.6 ± 1.89	26.2 ± 2.13
8% SDS: 100°C 10min	93.7 ± 1.78	33.1 ± 2.75	90.5 ± 1.76	20.4 ± 2.22
Alkaline protease	77.4 ± 2.31	35.3 ± 2.34	80.3 ± 2.56	29.3 ± 2.71
Neutral proteinase	86.5 ± 2.10	37.1 ± 1.98	73.8 ± 2.33	31.1 ± 2.47
Pronase E	87.2 ± 1.66	35.7 ± 1.77	88.9 ± 2.45	31.6 ± 1.69
0.3% TritonX-100	88.3 ± 2.03	48.5 ± 2.31	88.1 ± 1.56	46.9 ± 1.78
0.3% TritonX-100 and then lysozyme	97.3 ± 1.69	65.4 ± 2.45	93.5 ± 1.63	62.3 ± 2.10

2.4 胃肠道环境条件对菌株吸附苯并芘的影响

2.4.1 胰蛋白酶:由表 4 可见,胰蛋白酶处理时,随处理时间不同,菌株 121 吸附苯并芘的效果不同,其吸附率呈极显著差异($P < 0.01$),但菌株 ML32 吸

附苯并芘的能力并未受到影响($P > 0.05$)。这说明在胰蛋白酶存在下,乳杆菌吸附苯并芘的能力具有菌株差异性,其中对菌株 121 吸附苯并芘的效果影响较大,而对菌株 ML32 影响小。

表 4 胰蛋白酶存在下菌株 121 及 ML32 吸附苯并芘的效果

Table 4 Effects of trypsin on BaP bound by strains 121 and ML32

Strain	The percentage of BaP-binding /%			
	2h	4h	6h	8h
121	59.6 ± 1.67	69.1 ± 0.96	68.3 ± 1.21	74.3 ± 1.46
ML32	66.3 ± 1.30	63.2 ± 1.78	57.7 ± 1.63	64.0 ± 1.10

2.4.2 胆盐: 表 5 数据经双因素方差分析, 菌株 121 在不同浓度胆盐处理后, 吸附率差异较为显著

表 5 胆盐浓度对两株乳杆菌吸附苯并芘的影响

Table 5 Effects of bile salt concentrations on BaP bond by strains 121 and ML32

Strain	t/h	The percentage of BaP-binding /%				
		Bile salts / (g/L)				
		0.3	1	1.5	2.5	3
121	2	76.5 ± 0.98**	73.9 ± 1.30**	70.7 ± 1.06*	74.6 ± 1.65**	73.6 ± 2.06*
	4	65.9 ± 1.37	66.0 ± 1.30	65.5 ± 1.67	72.0 ± 1.32*	78.6 ± 1.69**
	6	65.0 ± 1.98	72.2 ± 2.14*	68.4 ± 1.37	74.5 ± 0.86**	74.8 ± 1.73**
	8	72.2 ± 1.45*	79.2 ± 1.82**	79.9 ± 1.23**	75.5 ± 1.97**	79.4 ± 1.58**
ML32	2	65.9 ± 2.03	69.4 ± 1.69*	85.0 ± 1.68**	75.0 ± 1.77*	66.3 ± 1.93
	4	79.8 ± 1.66**	83.0 ± 0.88**	81.7 ± 1.87**	89.3 ± 1.63**	79.7 ± 1.20**
	6	70.1 ± 1.43*	75.9 ± 0.96**	76.6 ± 1.29**	73.6 ± 2.00*	74.5 ± 1.65*
	8	75.0 ± 0.78**	84.6 ± 1.46**	78.9 ± 1.12**	76.3 ± 1.34**	79.4 ± 1.44**

Note: * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ compared with strains without treatments.

2.4.3 人工胃液: 菌株 121 经不同 pH 人工胃液处理后, 苯并芘吸附率呈极显著差异 ($P < 0.01$), 菌株 ML32 的吸附率呈较显著差异 ($P < 0.05$)。进一步, 在同一 pH 不同处理时间下, 菌株 121 和 ML32 对苯并芘的吸附能力没有呈现显著差异 ($P < 0.05$) (见

($P < 0.05$), 而在不同处理时间下, 吸附率差异不显著 ($P > 0.05$), 菌株 ML32 与菌株 121 呈现相同的变化规律。这说明胆盐浓度对 2 株菌吸附苯并芘的能力产生了较大影响, 而作用时间影响较小。菌株 121 与 ML32 未经胆盐处理时吸附率分别是 65.9% 和 64.9%, 而处理后, 2 株菌对苯并芘的吸附率有显著提高, 这可能是由于胆盐对细菌外膜蛋白和磷脂具有破坏作用, 影响了细菌表面结构^[18], 从而提高了吸附率。

表 6)。这表明两株菌的苯并芘吸附率受 pH 影响较大, 但与处理时间关系不大。经 t 检验, 低 pH 胃液环境使两株菌的吸附率均表现出显著上升趋势 (见表 6), 与图 1-D 所得结果一致。

表 6 人工胃环境对乳杆菌 121 和 ML32 吸附苯并芘的影响

Table 6 Effects of artificial gastric juice on BaP bond by strains 121 and ML32

Strain	t/h	The percentage of BaP-binding /%			
		pH			
		1.5	2.5	3.5	4.5
121	1	70.3 ± 0.63*	76.0 ± 1.26**	73.4 ± 0.38*	78.1 ± 1.45**
	2	71.8 ± 1.32*	76.1 ± 1.19**	65.5 ± 0.46	68.7 ± 1.67
	3	79.1 ± 0.56**	87.2 ± 0.39**	81.1 ± 0.32**	83.9 ± 1.32**
	4	83.1 ± 0.98**	88.4 ± 0.64**	73.8 ± 0.59**	84.6 ± 0.87**
ML32	1	88.3 ± 0.71**	78.6 ± 0.58**	80.2 ± 0.97**	76.0 ± 1.88**
	2	70.2 ± 0.84*	78.6 ± 1.35**	81.3 ± 1.34**	86.3 ± 1.77**
	3	85.5 ± 0.59**	83.3 ± 1.29**	87.8 ± 1.56**	89.1 ± 0.89**
	4	91.8 ± 1.30**	92.9 ± 0.47**	89.2 ± 0.78**	89.0 ± 0.64**

Note: * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ compared with strains without treatments.

3 讨论

苯并芘在环境中是一种难降解物质, 在其生物

修复方面, 国内外研究多集中于环境微生物对它的降解作用, 降解菌主要包括放线菌、真菌和酵母等^[19]。目前, 仅有少数文章涉及到乳酸菌抗苯并芘致突变性的效果, Chalova 研究表明, 少数乳杆菌的

上清液能够显著降低苯并芘的致突变性^[20]。Lo 报道乳酸双歧杆菌 (*B. lactis*) Bb-12 具有降低苯并芘致突变性的效果^[21]。然而,有关乳杆菌吸附苯并芘作用的研究报道尚不多见。

本实验对 14 株乳杆菌菌株吸附苯并芘的效果进行了检测,菌株间表现出不同的吸附率。瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) LH-1 对苯并芘仅有 8.4% 的吸附率,而植物乳杆菌 121 和戊糖乳杆菌 ML32 分别达到 65.9% 和 64.9%,说明所选乳杆菌对苯并芘的吸附能力具有菌株特异性。此外,大肠杆菌菌株吸附苯并芘的效率也不是很明显。在与苯并芘的共培养过程中,时间、温度、菌体细胞浓度、pH 及 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的处理均能不同程度地影响乳杆菌 121 及 ML32 吸附苯并芘的效果。经热灭活处理后 2 株菌的吸附率未发生显著变化,这说明菌体细胞对苯并芘的吸附作用与其活力无关,并非生理代谢作用所引起。菌体所吸附的苯并芘易被苯洗脱,表明菌体对苯并芘的这种吸附作用稳定性较低,是一种物理性质的吸附。Peltonen 在研究中表明,乳酸菌及双歧杆菌所吸附的黄曲霉毒素 B1 经无菌水多次洗脱后会解吸附^[22],Haskard 认为,乳酸菌对黄曲霉毒素 B1 的这种吸附作用是由一种较弱的非共价键所形成^[23],容易受到破坏,这与 2 株乳杆菌吸附苯并芘的作用相似。

2 株乳杆菌经酶及化学处理后,吸附率都有极大提高(见表 2 和表 3)。其中,酸处理会破坏多糖糖苷键,释放单糖,进一步产生醛基。同时,它还会破坏蛋白质及多肽中的硫胺键,产生肽段释放氨基酸。这使细胞壁肽聚糖层的交联度降低,出现“小孔”,增加了苯并芘与细胞壁甚至是细胞膜相互作用的机会,而完整菌体细胞是不可能实现的^[18]。蛋白酶和 SDS 都能够去除细胞表面的蛋白成分,但化学方法对菌体破坏大,而酶法较为温和,仅作用于蛋白质,不会破坏胞壁结构。因此,酶法处理后蛋白脱落的位置,可能成为了新的吸附位点。TritonX-100 是一种非离子型表面活性剂,一定浓度时能溶解细菌胞壁蛋白,而对细胞壁结构影响较小。TritonX-100 还具有溶脂作用,许多结合牢固的膜蛋白也易被除去。因此,采用 TritonX-100 处理菌体,会较酶法处理暴露出更多吸附位点。

利用 10% TCA 煮沸法可以去除胞壁内大量磷酸,使肽聚糖层的交联变得疏松;溶菌酶能水解胞

壁肽聚糖的 β -1,4 糖苷键,使胞壁劈裂;联合处理时,先经 TritonX-100 除去胞壁蛋白,使大量肽聚糖暴露,再用溶菌酶处理,肽聚糖水解将更彻底(观察发现菌悬液较处理前明显澄清)。显然,胞壁肽聚糖层的疏松为苯并芘提供了大量吸附位点。综上,酶处理和化学处理改变了菌体细胞表面结构,从而为结合苯并芘提供了大量的吸附位点,使菌体吸附率有所上升。同时,处理过的菌体对苯并芘的吸附稳定性有所提高,这说明处理后的菌体与苯并芘之间可能产生了新的结合方式,使菌体对苯并芘的作用更强不易受到苯的影响。

苯并芘在体内的吸收是其产生危害的首要条件,模拟胃肠道环境研究 2 株乳杆菌吸附苯并芘的效果很有必要。在模拟胆盐及低 pH 人工胃液环境下,菌株 121 及 ML32 的苯并芘吸附率均有显著增加。然而,菌体的苯并芘吸附率会受到胆盐浓度及 pH 的影响。胰蛋白酶的存在仅对菌株 121 产生了一定影响,但对菌株 ML32 基本没有影响。Bolognani 研究了长双歧杆菌 (*B. longum*) 在小鼠体内去除苯并芘的情况,发现在小肠中 4 h 内长双歧杆菌有明显的去除效果,而 4 h 后去除效果与对照并无差异;其次,在大肠环境中,这种去除效果能保持在 10 h 以上^[4]。与体外模拟环境相比,胃肠道环境非常复杂,因此 2 株乳杆菌在体内是否也能产生良好的苯并芘吸附效果,仍需更多的实验加以证明。

参考文献

- [1] Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*, 2002, 88(1): 89-94.
- [2] Goldin BR, Gorbach SL. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 1980, 64:263-265.
- [3] Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney CJ, Moretti M, Vilarini I, Scasselati-Sforzolini R, Rowland IR. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutrition and Cancer*, 1996, 26:365-380.
- [4] Bolognani F, Rumney CJ, Rowland IR. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, 1997, 35:

- 535-545.
- [5] Sreekumar O , Hosono A. The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutation Research* , 1998 , 421 : 65-72.
- [6] El-Nezami H , Mykkänen H , Kankaanpää P , Salminen S , Ahokas J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove Aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection* , 2000 , 63 : 549-552.
- [7] 刘宇红 , 于晓英 , 韩宁. 苯并[a]芘 (BaP) 的毒性作用与致毒机理研究现状. 内蒙古农业大学学报 (*Journal of Inner Mongolia Agricultural University*) , 2008 , 29(1) : 184-188.
- [8] Kazerouni K , Sinhi R , Hsu CH , Greenberg A , Rothman N. Analysis of 200 food items for Benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology* , 2001 , 39 : 423-436.
- [9] He-Mendoza A , Garcia HS , Steele JL. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind Aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology* , 2009 , 47 : 1064-1068.
- [10] Guan S , Ji C , Zhou T , Li JX , Ma QG , Niu TG. Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences* , 2008 , 9 : 1489-1503.
- [11] El-Nezami H , Polychronaki N , Salminen S , Mykkänen H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with Zearalenone and its derivative zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* , 2002 , 68 (7) : 3545-3549.
- [12] Vanhaecke L , Vercruyse F , Boon N , Verstraete W , Cleenwerck I , De Wachter M , De Vos P , Van de Wiele T. Isolation and characterization of human intestinal bacteria capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4 , 5-b] pyridine , *Applied and Environmental Microbiology* , 2008 , 74 (5) : 1469-1477.
- [13] Rajendran R , Ohta Y , Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso , a fermented Japanese food. *Canadian Journal of Microbiology* , 1998 , 44 : 109-115.
- [14] Smiley RD , Draughon FA. Preliminary evidence that degradation of Aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *Journal of Food Protection* , 2000 , 63 : 415-418.
- [15] Lo PR , Yu RC , Chou CC , Huang EC. Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic *Bifidobacteria* under acidic and bile conditions against Benzo[a]pyrene by a modified Ames test. *International Journal of Food Microbiology* , 2004 , 93 : 249-257.
- [16] Zinedine A , Faid M , Benlemlih M. In vitro reduction of Aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan Sourdough bread. *International Journal of Agriculture & Biology* , 2005 , 1(7) : 67-70
- [17] Haskard C , Binnion C , Ahokas J. Factors affecting the sequestration of Aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions* , 2000 , 128 : 39-49.
- [18] Begley M , Gahan C , Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Review* , 2005 , 29 : 625-651.
- [19] 臧淑艳 , 李培军 , 张英 , 王娟 , 许华夏. 污染土壤中苯并(a)芘的微生物降解途径研究进展. 生态学杂志 (*Chinese Journal of Ecology*) , 2006 , 25(8) : 978-982.
- [20] Chalova VI , Lingbeck JM , Kwon YM , Rieke SC. Extracellular antimutagenic activities of selected probiotic *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. as a function of growth phase. *Journal of Environmental Science and Health* , 2008 , 43(2) : 193-198.
- [21] Lo PR , Yu RC , Chou CC , Tsai YH. Antimutagenic activity of several probiotic *Bifidobacteria* against Benzo[a]pyrene. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 2002 , 94 (2) : 148-153.
- [22] Peltonen K , El-Nezami H , Haskard C , Ahokas JT , Salminen S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* , 2001 , 84 : 2152-2156.
- [23] Haskard CA , El-Nezami HS , Kankaanpää PE , Salminen S , Ahokas JT. Surface binding of Aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 6 : 3086-3091.

Binding of benzo(a) pyrene by *Lactobacilli* strains

Yeqiong Qi¹, Jiatao Zhang¹, Xianghui Pan¹, Jiawei Pei^{1*}, Bolin Zhang^{1,2*}

¹ College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China

² School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Objective] We studied the ability of *Lactobacillus plantarum* 121 and *Lactobacillus pentosus* ML32 to bind benzo(a) pyrene. [Methods] The percentage of benzo(a) pyrene bound by the lactobacilli strains was quantitated by HPLC after bacterial cells and benzo(a) pyrene were co-incubated in MRS media at 37°C for 4 h. [Results] The percentage of benzo(a) pyrene-binding was 65.9% for 121 and 64.9% for ML32. Physical factors affecting binding ability included incubation time, temperature, bacterial cell viability, pH and concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺. Different chemical and enzymatic treatments to cells affected the binding of the two strains to benzo(a) pyrene. The simulation of gastrointestinal environments showed that the binding ability of the two strains depended largely upon pH and bile salt concentrations, but less upon treating time. Trypsin had only influence on the ability of 121 to bind benzo(a) pyrene. The presence of benzene in washing cell impaired the ability of the two strains to bind benzo(a) pyrene. [Conclusions] Strains 121 and ML32 had potential to bind benzo(a) pyrene.

Keywords: *Lactobacillus* strains, benzo(a) pyrene, binding

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the High Technology Research and Development Program of China(2008AA10Z335)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528439; E-mail: zhangbolin888@163.com, peijw@yahoo.com.cn

Received: 26 February 2011/Revised: 20 March 2011

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】