

烟曲霉震颤素高产菌株的筛选*

刘 江 孟昭赫 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 (100050)

摘要 用改良后的 Czepek-Dox 培养基在 45℃ 下从土壤、饲料及荞麦样品中分离出 18 株烟曲霉菌株, 其分离纯化效率有所提高。选用 26 株烟曲霉分别在半合成培养基及大米培养基中进行产毒培养(25℃, 14~21d), 有 23 株产生烟曲霉震颤素 B(FTB), 未检出 FTA, 菌株在大米培养基中生长较好, 用薄层色谱法和高效液相色谱法测定, FTB 产量亦较高。

关键词 烟曲霉震颤素 B 烟曲霉 培养 高效液相色谱

烟曲霉震颤素(Fumitremorgins, FT)是主要由烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* Fres)产生的, 对实验动物有较强毒性的一类真菌毒素, 包括烟曲霉震颤素 A-N。结构类似的震颤性真菌毒素(tremorgenic mycotoxin)还有疣孢青霉原(verruculogen)和 TR-2 毒素等。到目前为止, 已从 7 种真菌的代谢产物中检出烟曲霉震颤素 B(FTB)。

FTB 被认为与串珠霉症^[1](moniciosis)、燕麦草蹒跚症(ryegrass stagger)和伐木工人病(wood-trimmer's disease)^[2~4]等有关。中毒症状包括震颤、共济失调、对外界刺激高度敏感、强直性痉挛等, 轻者可恢复, 重者可导致死亡。

FTB 的研究在我国尚属空白, 各主要专业试剂公司均没有 FTB 标准品, 只能通过筛选产毒菌株自行制备。文献报道能产生 FTB 的菌种多达 7 种, 但 FTB 产量各不相同, 普遍偏低, 必须筛选出高产毒株, 用于制备 FTB 纯品。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株来源 从北京莲花池菜地、中国医学科学院实验动物中心的土壤和饲料以及荞麦样品中分离烟曲霉 18 株(荞麦样品取自两份猪饲

料, 这两份猪饲料曾引起黑龙江省德都县仔猪三日病), 中国科学院微生物所提供烟曲霉 20 株, 从美国菌种保藏中心(ATCC)购买鱼肝油青霉标准株 ATCC34923 1 株。

标准品来源 FTA 和 FTB 标准品由日本千叶大学山崎千夫教授提供。

培养基

分离培养基 为改良 Czepek-Dox 培养基, 每 1000mL 中含硝酸钠 3.0g, 磷酸氢二钾 1.0g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5g, 氯化钾 0.5g, 硫酸亚铁 0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 30g, 氯霉素 0.1g, 柠檬酸 0.1g, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min, 分装备用。

PDA 斜面 按国标方法常规制备。

天然培养基 大米, 每瓶分装 120~150g, 121℃ 高压蒸汽灭菌 30min 后备用, 用前每瓶加无菌蒸馏水 80~90mL。

半合成培养基^[5] 为改良的 Czepek-Dox 培养基, 每 1000mL 中含葡萄糖 25g, 琥珀酸铵 1.6g, 磷酸二氢钾 0.5g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1mg, 酵母浸膏 0.1g, L-色氨酸 250mg, 硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1mg, 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1mg, 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.15mg, 钼酸铵 $[(\text{NH}_2)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 0.1mg, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后分装备用。

Beckman 高效液相色谱仪 Beckman 公司

* 本课题为国家自然科学基金资助项目

产品。

1.2 方法

菌株的分离 将土壤、饲料、荞麦样品用无菌生理盐水稀释成 10^{-2} 和 10^{-3} , 振荡混悬, 取 1mL 加入无菌培养皿中, 再加入分离培养基混匀, 分别在 28℃ 和 45℃ 培养 4~6d, 观察结果。

产毒培养 选用 26 株菌株(表 1), 按常规方法在 PDA 斜面复苏后, 用无菌水将孢子洗下制成孢子悬液, 接种 1mL 到半合成培养基和大米培养基中, 25℃ 避光培养 14~21d, 在培养过程中, 为避免大米培养基结块, 经常摇动, 使其散开。

产毒培养物的提取 将半合成培养基中生成的菌膜挑出, 置 60℃ 烘干, 研碎后备用。将大米培养物流动蒸汽灭菌 20~30min, 备用。

按山崎等的方法^[5]将研碎后的菌膜或大米产毒培养物, 用乙醚或乙酸乙酯提取 3 次, 合并提取液浓缩至干, 用正己烷-90% 甲醇水(1:1, V/V) 提取, 正己烷可溶部分浓缩至干, 用少量苯或丙酮溶解, 用硅胶 G 柱分离, 加样后用苯-丙酮 50:1 和 25:1(V/V) 梯度洗脱, 分段收集洗脱液, 浓缩至干后, 待测定。

本文设计的方法是将大米产毒培养物用乙酸乙酯提取 3 次, 合并提取液, 无水硫酸钠去除提取液中的水分, 35~40℃ 浓缩提取液至干, 正己烷去杂质, 正己烷不溶部分浓缩至干, 粗提物用正己烷或乙酸乙酯湿法上硅胶 H 柱, 正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱(10:1, 10:3, 2:1, 3:2, 6:5, V/V), 分段收集洗脱液, 浓缩至干。

薄层色谱法(TLC)测定 FTB 常规方法制备硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析板(5×20cm), 用前 110℃ 1~2h 活化, 微量加样器点样, 加样量 5~50μL/点, 展开剂为苯-丙酮(10:1, V/V) 或正己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V), 密封式上行展开, 展开至离顶边 1cm 处取出, 挥干溶剂, 用显色剂(10% 硫酸)喷雾后, 110℃ 烘烤 15min, 在 254nm 或 365nm 紫外灯下观察。

高效液相色谱法(HPLC)测定 FTB Beckman110 型泵, HP3390 型积分仪, Bio-Rad Hi-Pore RP-318 型 C₁₈ 反相色谱柱, 流动相为 90% 甲醇-水, 流速 1mL/min, 紫外检测器, 波长

280nm, 进样量 25~50μL。

2 结果与讨论

以改良 Czepek-Dox 培养基作为土壤、饲料和粮食样品中烟曲霉的分离培养基, 在 18 份土壤、饲料及荞麦样品中, 共分离出 18 株烟曲霉。以 45℃ 作为分离培养温度, 可以抑制绝大多数细菌和真菌的生长, 而烟曲霉由于耐热而成为主要优势菌。样品经适当稀释后一次即可获得纯培养, 而 28℃ 作为分离培养温度, 效果较差。

在选用的半合成培养基和大米培养基中, 肉眼观察发现烟曲霉菌株在大米培养基中生长较好, TLC 和 HPLC 测定 FTB 的产量亦较高, 而在半合成培养基中菌的生长和毒素的产生较差, 这与采用半合成培养基时只挑取菌膜进行分离提取有一定的关系。一般来说, 真菌产毒株在天然培养基中的生长和产毒均优于合成培养基, 如黄曲霉和串珠镰刀菌等。

在两种分离提取方法中, 文献报道的第一种方法^[5]效果不够理想, 收率只有 1.11%^[6](收率的计算以乙醚或乙酸乙酯的提取物为 100%), 含有多重杂质, 进一步分离比较困难。而自行设计的第二种方法, 效果比较理想, 收率在 6.8%~13% 之间, 纯度较高。洗脱分析表明, 洗脱液梯度(正己烷-乙酸乙酯)为 10:1, 10:3, 2:1 和 3:2(V/V) 时, 可洗脱粗提物样品中含有大量杂质的前组分, 随后用 3:2 和 6:5(V/V) 梯度洗脱时, 可收集到绝大部分的 FTB。用无水硫酸钠去除提取液中的水份, 可以提高分离和纯化的效率。文献报道的方法是将正己烷可溶部分浓缩至干后进行提取, 而根据 FTB 的理化性质, FTB 在正己烷中的溶解度较低, 大部分 FTB 应存在于正己烷不溶部分中, 所以改良方法选用正己烷不溶部分进行进一步的提取纯化。

TLC 方法检测时发现, 粗提物中均含有多个荧光点, 经硅胶 H 柱层析后, 样品中荧光点减至 1~2 个。从柱层析结果来看, 硅胶 H 分离效果优于硅胶 G。TLC 的展开系统为苯-丙酮(10:1, V/V) 时, FTB 的 R_f 值约为 0.31, 而展开

系统为正己烷- 乙酸乙酯时, R_f 值约为0.23。

表 1 26 株烟曲霉
产毒培养物 FTB 测定结果(TLC 法)

菌 号	来 源	定性测量	半定量测定 FTB 含 量 ($\mu\text{g/L}$ 培养物)
C4104	微生物所	++	1400
C4625	微生物所	+	1450
红字	微生物所	+	1450
临 1	微生物所	+	1450
C5846	微生物所	++++	5800
C5484	微生物所	+++	4350
3508	微生物所	++	2900
5091	微生物所	-	0
8061	微生物所	+	1160
C5761	微生物所	++++	4640
C4878	微生物所	++++	4640
C5056	微生物所	++	2320
93	微生物所	-	0
491	微生物所	-	0
3656	微生物所	++++	4640
C4587	微生物所	++	2320
8247 ⁽¹⁾	微生物所	++	2320
3655	微生物所	+++	3480
001	荞麦样品	+++	3480
002	荞麦样品	+++	3480
003	荞麦样品	+	1160
004	荞麦样品	++	2320
005	荞麦样品	++	2320
006	荞麦样品	+++	3480
007	土壤样品	++	2320
008	土壤样品	++	2320

(1) 烟曲霉胶胞变种

以山崎千夫教授惠赠 FTB 标准品作 TLC 分析

(展开系统为苯- 丙酮) 时, 发现出现两个荧光点, R_f 值分别为 0.27 和 0.31。推测一是纯度不够, 二是 FTB 结构发生改变, 因此在大量制备 FTB 时有必要进行结构鉴定。

26 株烟曲霉培养物 FTB 测定结果见表 1。

在摸索 HPLC 工作条件时, 曾选用 100% MeOH, MeOH: H₂O (98: 2), MeOH: H₂O (93: 7), MeOH: H₂O (90: 10), MeOH: H₂O (80: 20) 和 MeOH: H₂O (70: 30) 作为流动相组分, 流速 1mL/min。结果表明, 在流动相为 MeOH: H₂O (90: 10) 时, FTA, FTB 混合进样时分离较好, 保留时间分别为 14.37min 和 9.60min。(HPLC 检测 FTA 和 FTB 的结果见图)。

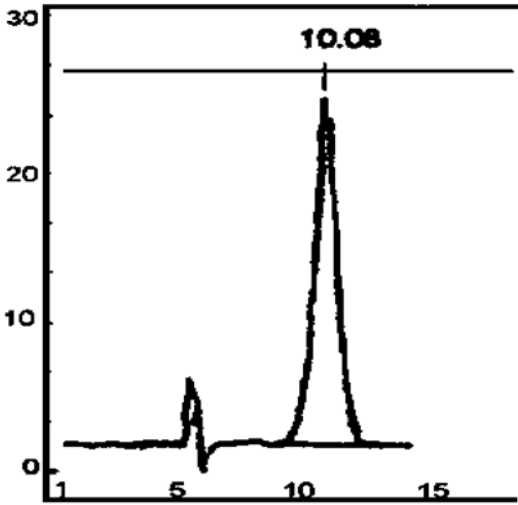


图 1 FTB 标准(MeOH) 的 HPLC 分析图谱

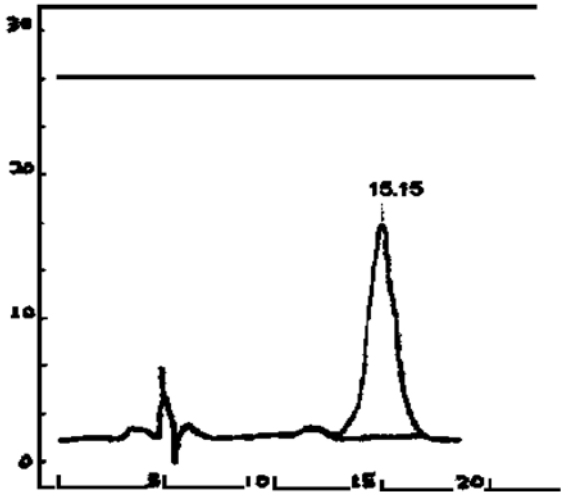


图 2 FTA 标准(MeOH) 的 HPLC 分析图谱

到目前为止, 尚无一种比较理想的化学检测方法, TLC 法灵敏度比较低(约为毫克级), 而

文献报道的 HPLC 方法只适用于定性和半定量测定,而且方法的回收率低,FTB 峰与杂质峰分离度较低,单个样品的检测时间较长(约为 1h),不适于大量样品的检测。因此本文仅用 HPLC 方法作为定性测定,未进行定量检测。基于同样的考虑,本文只选用数个烟曲霉菌株在大米培养基中进行产毒培养,以了解烟曲霉菌株在大米培养基和半合成培养基中的生长和产毒情况,具体数据未列出。通过本次实验的观察结果,在以后的 FTB 大量制备过程中,对产毒培养基培养条件和提取纯化方法等进行了较大的改进。

在实验中还发现,有的烟曲霉产毒株(如 3656 和 C4104)经数次传代后,其产毒能力有大幅度下降现象,所以在分离出菌株后,应及时冷冻干燥保存,避免多次传代,以保持其产毒能力。

从筛选产毒株中可以看出,大多数烟曲霉在适当的环境中可以产生 FTB 而不产生 FTA。26 株烟曲霉中有 88.5% 可以生物合成 FTB,培养物中均未检出 FTA,与以往的观察结果基本一致。^[7]

烟曲霉在世界各地分布极广,尤其是在高温(40℃以上)情况下为主要优势菌,经常污染粮食和饲料,曾发现与此菌有关的、有痉挛症状的鸡烟曲霉中毒,对人畜的健康构成潜在性威胁。堀江等^[7]在研究烟曲霉及其同源菌属产生 FTA FTB 能力时发现,104 株烟曲霉中,仅有 3 株能产生 FTA,而且产毒量较低(0.9~11.6mg/kg 培养物),而有 98 株能产生高含量的 FTB(4.8~3052.0mg/kg 培养物),从日本 22 个县采集的 1147 份土壤样品中,共有 673 份(59%)分离出烟曲霉,其中稻田和菜地土样中该菌检出率较高,分别为 69%~100% 和 36%

~100%,而在森林地带(5%~74%)、草地、牧场(5%~82%)和果园(23%~100%)中的分布相对较少。将其中 90 株烟曲霉进行产毒培养实验,89 株可产生 FTB,只有 1 株产生 FTA。有鉴于此,本实验结果提示在我国粮食及饲料中存在的烟曲霉污染很可能伴随着严重的 FTB 污染,有必要开展进一步的研究。

日本千叶大学山崎千夫教授提供 FTA 和 FTB 标准品;中国科学院微生物所齐祖同教授提供部分烟曲霉菌株,在此特表感谢。

3 参考文献

- 1 孟昭赫,孙玉书译.真菌毒素图解.北京:人民卫生出版社,1983
- 2 Mantle P G, Penny R H C. Tremorgenic mycotoxins and neurological disorders. Vet Annal, 1981; 21: 51~ 62
- 3 Land C J, et al. Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus fumigatus* as a possible occupational health problem in sawmills. Appl Environ Microbiol, 1987; 53(4): 787~ 790
- 4 Beuchat L R, Nielsen P V, Frisvad J C. Environmental factors influencing fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri*. Bioact. Mol., 10(Mycotoxins Phycotoxins' 88), 1988; 7 ~ 12
- 5 Yamazaki M, Uzuki S, Miyaki K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus* Fres Chem Pharm Bull., 1971, 19(8): 1739~ 1740
- 6 Yamazaki M. Chemistry of tremorgenic mycotoxins. Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi. 1977, 35(6): 479~ 490
- 7 Horie Y. Yamazaki M. Productivity of tremorgenic mycotoxins A and B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. Nippon Kingakkai Kaiho, 1981, 22(1): 113~ 119