DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2023.24.002

肉源凝固酶阴性葡萄球菌对多环芳烃的 消减作用

刘航航,潘琼,罗慧婷,蔡克周,徐宝才,李沛军*

(合肥工业大学食品与生物工程学院,安徽合肥 230009)

摘 要:多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类食品中广泛存在的危害物,降低其含量有利于提升产品安全性。在模拟体系中考察不同肉源凝固酶阴性葡萄球菌对 PAHs 的消减作用,筛选出消减 PAHs 能力最强的菌株,并探讨其作用机理。研究结果表明:在受试菌株中,马胃葡萄球菌(Staphylococcus equorum)E1 对模拟体系中PAHs 的消减效果最强(P<0.05)。在 S. equorum 不同细胞组分中,全细胞提取液(whole cell extracts, WCE)和细胞碎片悬液均对 PAHs 有显著的降低作用(P<0.05)。进一步酶处理发现,WCE 中关键消减物质是蛋白类物质;同时,在 WCE 中检测到了 PAHs 降解酶活性,这表明 S. equorum 消减 PAHs 存在生物降解途径。另一方面,热灭活处理使 S. equorum 对 PAHs 消减能力显著提升(P<0.05);通过傅里叶变换红外光谱分析,发现 S. equorum 的 WCE 存在与物理吸附 PAHs 相关的官能团,说明 S. equorum 消减 PAHs 存在物理吸附途径。因此,S. equorum 可通过生物降解和物理吸附两种作用途径消减 PAHs。研究为生物法消减食品中的多环芳烃提供了新途径。

关键词: 多环芳烃;凝固酶阴性葡萄球菌;模拟体系;物理吸附;生物降解

Reduction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Meat-derived Coagulase-negative Staphylococci

LIU Hanghang, PAN Qiong, LUO Huiting, CAI Kezhou, XU Baocai, LI Peijun*

Abstract: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a ubiquitous food hazard, and reducing their levels is crucial for enhancing product safety. In this simulation system, the abatement effect of coagulase–negative staphy–lococci on PAHs from various meat sources was investigated, and the strain with the most potent PAH–reducing ability was selected and its mechanism elucidated. The findings indicated that *Staphylococcus equorum* E1 exhibited the most significant reduction effect on PAHs in the simulated system (P < 0.05). Among the different cell components of *S. equorum*, whole cell extracts (WCE) and cell fragment suspensions had significant decreases in PAHs (P < 0.05). Further enzyme treatment revealed that the key subtractive substances in WCE were proteins. At the same time, the activity of PAHs degrading enzyme was detected in WCE, suggesting that *S. equorum* reduced the biodegradation pathway of PAHs. On the other hand, heat inactivation treatment significantly enhanced the capacity of *S. equorum* to degrade PAHs (P < 0.05). Fourier infrared spectroscopy revealed that WCE of *S. equorum* possessed functional groups associated with physical adsorption of PAHs, indicating a possible physical adsorption pathway involved in the degradation process. Therefore, *S. equorum* has the potential to reduce PAHs through biodegradation and physical adsorption, presenting a novel biological approach for reducing PAHs in food.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); coagulase-negative staphylococci (CNS); simulation system; physical adsorption; biodegradation

引文格式:

刘航航,潘琼,罗慧婷,等. 肉源凝固酶阴性葡萄球菌对多环芳烃的消减作用[J]. 食品研究与开发,2023,44(24):9-15. LIU Hanghang,PAN Qiong,LUO Huiting,et al. Reduction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Meat-derived Coagulase-negative Staphylococci[J]. Food Research and Development,2023,44(24):9-15.

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类含有两个或多个由碳原子和氢原子组成的强 疏水性有机化合物,具有至少两个凝聚或融合的芳香 环结构[1]。PAHs源于有机物的不完全燃烧和热解,可以 通过食物链进入人体内造成危害[2]。由于双环氧化合物 的代谢激活会导致 DNA 复制和突变错误从而导致癌 变,PAHs 被认为对人体具有潜在的遗传毒性和致癌 性,易使人体罹患乳腺癌、肺癌和结肠癌等癌症[3]。国 际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)已经将PAHs分类为1类致癌物、2A类 致癌物和 2B 类致癌物^[4],其中研究较多的是 1 类致癌 物苯并[a]芘(benzo [a] pyrene, BaP)和 2B 类致癌物苯 并[a]蒽(benzo [a] anthracene, BaA)、菌(chrysene, CHR) 和苯并[b]荧蒽(benzo [b]fluoranthene, BbFA。欧盟委员 会(European Commission, EC)规定了烟熏肉制品中BaP 和 PAH4(BaA、CHR、BbFA 和 BaP)的最大限量,分别 为 2.0 μg/kg 和 12.0 μg/kg^[5]。我国 GB 2762—2022《食 品安全国家标准食品污染物限量》规定,肉及肉制品 中 BaP 的含量不得超过 5 μg/kg^[6]。为减少食品中 PAHs 危害物对人体健康的潜在危害,降低其含量具有重大 意义。

目前,对食品中 PAHs 的减少措施主要集中于物理和化学方法。比较常见的物理方法有改变烟熏方式和食品原料的预处理[□]等;在化学方法方面,通过向肉制品中添加醋和啤酒等物质,利用其中酚类物质和抗氧化成分降低肉制品中 PAHs^{IS}。然而,这些物理和化学方法大多昂贵、复杂和低效,甚至会产生有毒的次生代谢物,使这些方法往往难以推广和大规模实践^[O]。与此同时,随着消费者对良好生活质量的要求不断提高,消费者更愿意接受绿色安全的方法。

近年来,通过生物学方法降解 PAHs 受到广泛关 注。许多细菌已被证实通过代谢或共代谢降解 PAHs, 并且 PAHs 降解酶和生物降解途径是多样的。在环 境领域, Hadibarata 等[10]研究表明白腐真菌(Armillaria sp.)F022 可以将 BaP 降解为苯并[a]芘-1,6-醌,1-羟 基-2-苯甲酸和苯甲酸。在食品领域,乳酸菌和凝固酶 阴性葡萄球菌(coagulase-negative staphylococci, CNS) 是传统发酵肉制品中最主要的细菌群,它们决定了产 品的感官和安全特性[11]。Bartkiene 等[12]研究了乳酸菌 对冷熏猪肉香肠中 PAHs 的降低效果,结果表明乳酸 片球菌(Pediococcus acidilactici)KTU05-7、戊糖片球菌 (Pediococcus pentosaceus) KTU05-9 和清酒乳杆菌 (Lactobacillus sakei)KTU05-6 均能够降低熏肠内部 PAH4 含量,其中 L. sakei KTU05-6 对 PAH4 具有较好 的去除效果。CNS可以通过蛋白质水解和脂肪分解来 促进肉制品风味的形成,还可改善肉制品色泽四。然

而,关于其消减食品中危害物的相关报道鲜见。

本研究通过分析肉源 CNS 菌株在模拟体系中对 PAHs 的降低作用,筛选出消减 PAHs 能力最强的菌株,并通过明确菌株消减方式、消减位置和消减关键成分,探究其消减作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PAHs标准品(BaA、CHR、BbFA和BaP)(纯度>99%): 北京北方伟业计量技术研究院;链霉蛋白酶(EC 3.4.24.31)、结晶紫、阿拉伯树胶粉;上海源叶生物科技有限公司;酸水解酪蛋白、辛基苯基聚氧乙烯醚:北京索莱宝科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、布拉德福德蛋白浓度测定试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;磷酸二氢钠(NaH2PO4)、磷酸氢二钠(Na2HPO4)、乙腈、无水乙醇(均为色谱级):国药集团化学试剂有限公司;除特殊标记外其他试剂均为分析纯。

受试菌株:木糖葡萄球菌(Staphylococcus xylosus) A2、肉葡萄球菌(Staphylococcus carnosus)C2 均分离于自然发酵风干肠,马胃葡萄球菌(Staphylococcus equorum)E1 分离于风鸭,小牛葡萄球菌(Staphylococcus vitulinus)CICC 10850:中国工业微生物菌种保藏管理中心。

7.5%氯化钠肉汤(sodium chloride broth, SCB)培养基:广东环凯微生物科技有限公司;甘露醇氯化钠琼脂(mannitol salt agar, MSA)培养基:广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

洁净工作台(AlphaClean 1300):力康精密科技(上海)有限公司;振荡培养箱(BSD-250):上海博迅实业有限公司;台式低速离心机(TDZ5-WS):湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;酶标仪(SynergH1):美国 Bio-Tek 仪器公司;液相色谱仪(S-6000):华谱科仪(北京)科技有限公司;水浴振荡器(WE-3):天津欧诺仪器股份有限公司;分光光度计(UV-6000PC):上海元析仪器有限公司;静音液晶超声波清洗器(KS-7200XDS):昆山洁力美超声仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养

在无菌环境下,用无菌接种环挑取葡萄球菌斜面上的一环菌泥,将其接入10 mL 无菌 SCB 培养基中,随后漩涡振荡,将接过菌的 SCB 培养基置于恒温培养箱,在恒温条件(37℃,150 r/min)下培养18 h 进行活化。在无菌环境下,将活化后的 SCB 培养基漩涡振荡,通过无菌移液枪吸取 0.2 mL 菌液接入10 mL 无菌SCB 培养基中进行传代,连续传代培养2次(37℃,18 h),

第 3 代菌液 4 ℃冷藏备用。取 10 mL 受试菌株第 3 代菌液 $(1\times10^8 \text{ CFU/mL})$,离心 $(12\ 000\times g,15\ \text{min},4\ \text{℃})$ 去上清液得全细胞。全细胞经无菌磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution,PBS,50 mmol/L,pH7.0)洗涤 2 次,并溶解在 $10\ \text{mL}$ PBS 中以获得全细胞悬液 (whole cell suspension, WCS)。

1.3.2 不同菌株对 PAHs 消减能力的测定

不同菌株对 PAHs 消减能力的评定参照 Yousefi 等^[14]的方法并稍作修改。在 PBS 添加 10 ng/mL PAHs 标准品,制备得到模拟体系。即向 WCS 和 PBS 中添加 PAHs 标准品,使其最终浓度为 10 ng/mL,其中 PBS 作为 对照组。培养 $(37 \, ^{\circ}\text{C}, 150 \, ^{\circ}\text{r/min}, 18 \, \text{h})$ 结束后检测 PAHs 含量。

PAHs 含量测定参照 Li 等^[15]的方法并稍做修改,采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)进行。待测样品经 0.22 μm 滤膜过滤后,将其添加到 2 mL 进样瓶中用于 HPLC 检测。色谱条件:在装配荧光检测器的高效液相色谱仪上进行分离采用双流动相,A 相乙腈,B 相水。流动相洗脱梯度:0~17.5 min,40%~100%乙腈;17.5~24.0 min,100%乙腈;24.0~25.5 min,40%乙腈;25.5~27.5 min,40%乙腈。荧光检测器的激发与发射波长为 BaA:274/382 nm;CHR:260/360 nm;BbFA:283/430 nm;BaP:285/410 nm。1.3.3 S. equorum 不同细胞组分消减 PAHs 能力的测定

参照 Xiao 等¹¹⁶的方法并稍作修改。 $S.\ equorum\ WCS$ 经超声破碎(600 W,工作 2 s,间歇 3 s,180 次,0 ℃)得全细胞提取液(whole cell extracts, WCE),将全细胞提取液离心(12 000×g,15 min,4 ℃)得胞内提取液(intracellular extracts,IE) 和细胞碎片。将细胞碎片溶解在10 mL PBS 中,获得细胞碎片悬液(cell debris suspension,CDS)。分别向 WCS、WCE、CDS、IE 和 10 mL PBS 中添加 PAHs 标准品,使其最终浓度为 10 ng/mL,培养(37 ℃,150 r/min,18 h)结束后检测 PAHs 含量。

1.3.4 蛋白酶处理对 S. equorum WCE 消减 PAHs 效果的影响

参照 O'Brien 等^[17]的方法并稍作修改。将 0.1 mL 链霉蛋白酶溶液添加到 10 mL *S. equorum* WCE 中,以不添加链霉蛋白酶作为对照,水浴(37 ℃,1 h)冷却后,添加 PAHs 标准品,使其最终浓度为 10 ng/mL,培养(37 ℃,150 r/min,18 h)结束后检测 PAHs 含量。

1.3.5 S. equorum 中 PAHs 降解酶活力的测定

取上述制备的 S. equorum IE 样品,用于邻苯二酚 2,3-双加氧酶、脂肪酶和 α -淀粉酶活力的测定。

1.3.5.1 邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力

参照 Xi 等^[18]的方法并稍做修改。酶活性反应体系:0.2 mL 邻苯二酚(5 mmol/L),3 mL PBS(50 mmol/L,

pH 8.0)和 0.2 mL IE,测定其在 3 min 内、375 nm 处吸光度的变化。定义每分钟 1 μmoL 邻苯二酚裂解产生 2-羟粘糠酸半醛所需要的酶量为 1 个酶活力单位 U。邻苯二酚 2,3-双加氧酶的酶活力按公式(1)计算。

$$U = \frac{A V_{t}}{\varepsilon t dV_{s}} \times 10^{6} \tag{1}$$

式中:U 为酶活力,U/mL;A 为样品吸光值; V_1 为反应总体积,mL; ε 为摩尔吸光系数;t 为反应时间,min;d 为比色皿内腔厚度,cm; V_2 为粗酶液体积,mL。

通过布拉德福德蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度后,用公式(1)所得结果再除以每毫升粗酶液中所含蛋白含量,即可得酶的比活力。

1.3.5.2 脂肪酶活力

参照 Wang 等¹⁹的方法并稍作修改。底物溶液的制备方法如下:取 90 mg 对硝基苯酚棕榈酸酯溶于 30 mL 乙腈后,将 100 μ L 对硝基苯酚棕榈酸酯溶液加入到 900 μ L 含有 0.1%阿拉伯树胶和 0.4% Triton X-100的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中。在 37 \mathbb{C} 和 150 r/min条件下孵育 5 min后,向样品中加入 50 μ L IE,并在 150 r/min 和 37 \mathbb{C} 条件下再孵育 5 min。用 300 μ L 的 10% Na_2CO_3 终止反应。混合物经离心后测量 410 nm 处的吸光度。定义在 37 \mathbb{C} 条件下,每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚(p-nitrophenol)所需的酶量为 1 个酶活力单位 \mathbb{U} 。脂肪的酶活力按公式(2)计算。

$$U=[(A_1-A_0)\times K+C_0]\times V_1\times n/(V_2\times t)$$
 (2)

式中:U为酶活力,U/mL; A_1 为样品吸光值; A_0 为样品空白吸光值;K为对硝基苯酚标准曲线的斜率; C_0 为对硝基苯酚标准曲线的截距;n为稀释倍数; V_1 为反应液体积,mL; V_2 为粗酶液体积,mL;t为反应时间, min_0

通过布拉德福德蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度后,用公式(2)所得结果再除以每毫升粗酶液中所含蛋白含量,即可得酶的比活力。

1.3.5.3 α-淀粉酶酶活力

参照 Božić等[20]的方法并稍作修改。采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定 α-淀粉酶活力。将含有 100 μL IE 和 400 μL 1.0%可溶性淀粉的反应混合物在 PBS(50 mmol/L, pH7.0)中孵育(40 $^{\circ}$ C,30 min)。通过加入 1 mL DNS 试剂停止反应,然后将混合物煮沸 5 min,冷却至室温并用蒸馏水稀释。淀粉水解过程中释放的还原糖量通过葡萄糖标准曲线测定。定义在 40 $^{\circ}$ C、pH7 条件下,每分钟淀粉水解产生 1 mg 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位 U。α-淀粉酶的酶活力按公式(3)计算。

$$U = \frac{m \times n}{V \times t} \tag{3}$$

式中:U 为酶活力,U/mL;m 为葡萄糖质量,mg;n

为稀释倍数;V 为反应所用淀粉酶原液体积,mL;t 为反应时间,min。

通过布拉德福德蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度后,用公式(3)所得结果再除以每毫升粗酶液中所含蛋白含量,即可得酶的比活力。

1.3.6 热失活 S. equorum 对 PAHs 消减作用的影响

参考 Yousefi 等[14]的方法对 *S. equorum* 进行热处理。WCS 经热处理(100 \mathbb{C} ,15 min)冷却后,添加 PAHs 标准品,使其最终浓度为 10 ng/mL,对照组不经热处理直接添加 PAHs 标准品。培养(37 \mathbb{C} ,150 r/min,18 h)结束后通过离心(12 000×g,15 min,4 \mathbb{C})去除细胞,收集上清液用于检测 PAHs 含量。

1.3.7 S. equorum WCE 的傅里叶变换红外光谱分析

参照 Peng 等^[21]的方法并稍做修改。*S. equorum* 的 WCE 经冻干机冻干后,采用傅里叶变换红外光谱仪进行光谱扫描,扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹。

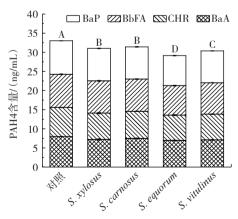
1.4 数据处理

试验重复 3 次,结果以平均值±标准差表示。使用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析,各数据之间的显著性 差异(*P*<0.05)使用 Duncan's 多重分析法进行检验,利用 Origin 2017 作图。

2 结果与分析

2.1 不同 CNS 菌株对 PAH4 的消减效果

食品中将包括 BaP 在内的 16 种多环芳烃列为食品系统的主要污染物,欧洲食品安全委员会(EFSA)建议用 PAH4(BaA、CHR、BbFA 和 BaP)代表食品中多环芳烃的产生和毒性水平,因此本研究将 PAH4 作为筛选菌株的依据。在模拟体系中接种不同菌株对 PAHs的消减效果见图 1。



不同字母表示不同组间存在显著性差异,P<0.05。

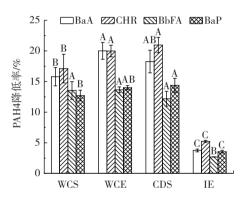
图 1 不同菌株对 PAH4 降低量的影响

Fig.1 Effects of different bacteria on PAH4 reduction

由图 1 可知,接种组中 PAH4 含量均显著低于对 照组(P<0.05),即 4 种葡萄球菌菌株均能显著降低模 拟体系中的 PAH4(*P*<0.05)。 *S. xylosus* A2、*S. carnosus* C2、*S. equorum* E1 和 *S. vitulinus* CICC 10850 对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别为 3.63%~12.14%、3.86%~8.69%、12.71%~17.11%和 6.21%~15.12%。在所有待测菌株中,*S. xylosus* A2 和 *S. carnosus* C2 降低PAH4能力最弱,*S. equorum* E1 降低PAH4能力最强,*S. equorum* E1 对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别达到 15.79%、17.11%、13.54%和 12.71%。不同的葡萄球菌菌株对PAHs 表现出不同的消减效果,这与 Zhao等^四的结果类似,他们的研究表明,15 株乳酸菌均可去除无菌蒸馏水中的 BaP,去除率为 11%~67%。这主要由菌株特异性造成。后续试验以降低PAH4能力最强的 *S. equorum* E1 为研究对象,探究其对PAHs 的消减机理。

2.2 不同细胞组分对消减 PAH4 的影响

为了明确 S. equorum 各细胞组分对 PAHs 的消减效果,比较了 WCS、WCE、IE 和 CDS 对 PAHs 的消减效果。S. equorum 的 WCS、WCE、CDS 和 IE 对 PAH4 降低率见图 2。



不同字母表示组间存在显著性差异,P<0.05。

图 2 S. equorum 的 WCS、WCE、CDS 和 IE 对 PAH4 降低率 Fig.2 The reduction rate of PAH4 treated with the WCS,WCE, CDS and IE of S. equorum

如图 2 所示, WCS 组对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别为 15.79%、17.11%、13.54%和 12.71%。WCE 组对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别为 20.00%、19.98%、13.65%和 14.00%,WCE 组对 BaA 和 CHR 的降低率显著高于 WCS 组(P<0.05),这表明超声破碎处理提高了 S. equorum 对 PAHs 的降低效果,可能是超声处理使细胞中更多的消减物质暴露,PAHs 更容易与消减物质接触作用的结果。Yousefi等呼研究发现超声处理可以改变细胞壁结构、增加其通透性,从而增加肽聚糖的可利用性,使细胞壁上产生新的结合位点。可见,S. equorum 对 PAHs 的消减可能与物理吸附途径同时存在。WCE 组对 PAH4 的降低率和 CDS组不存在显著差异(P>0.05),但显著高于 IE 组(P<0.05),

这表明细胞碎片和细胞内物质都具有消减作用,从IE组的消减效果可得,S. equorum 对 PAHs的消减可能存在生物降解途径。与本研究结果类似,Zhao等空研究表明植物乳杆菌(L. plantarum)CICC 22135 和戊糖乳杆菌(L. pentosus)CICC 23163 肽聚糖在去除 BaP 中起重要作用,并且细胞结构完整程度影响 BaP 去除效率。

2.3 S. equorum 生物降解 PAH4 关键消减成分的确定 在生物降解 PAHs 时,细菌中有多种酶及其蛋白 质产物参与细菌对 PAHs 的降解。为了确认S. equorum 中蛋白质类物质(酶和蛋白质产物)是否在消减 PAHs 中起关键作用,探究蛋白酶处理对 S. equorum 消减 PAHs 的影响。蛋白酶处理前后 S. equorum 对 PAH4 的 消减效果如表 1 所示。

表 1 蛋白酶处理对 S. equorum 消减 PAH4 的影响

Table 1 Effects of protease treatment on PAH4-decreasing ability of S. equorum

组别	降低率/%					
	BaA	CHR	BbFA	BaP	PAH4	
对照组	20.00±1.37ª	19.98±0.93ª	13.65±0.47ª	14.00±0.34ª	16.26±0.61ª	
蛋白酶 处理组	11.53±0.49 ^b	13.77±0.02 ^b	7.55±0.62 ^b	1.61±0.02 ^b	$6.89 \pm 0.20^{\rm b}$	

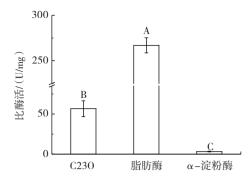
注:同列不同字母表示存在显著性差异,P<0.05。

对照组(未经蛋白酶处理)对 BaA、CHR、BbFA 和BaP 的降低率分别为 20.00%、19.98%、13.65%和14.00%,蛋白酶处理组对 BaA、CHR、BbFA 和BaP的降低率分别为 11.53%、13.77%、7.55%和 1.61%。经蛋白酶处理后,S. equorum 对 PAH4 消减能力显著下降(P<0.05),由此表明 S. equorum 细胞片段上蛋白质类物质(酶和蛋白质产物)在消减 PAHs 过程中起重要作用。Xiao 等[16]在探究戊糖乳杆菌 R3 对 N—亚硝胺降解时,发现其表层蛋白能显著降低 N—亚硝胺含量(P<0.05)。

2.4 S. equorum 生物降解 PAH4 关键酶的探究

生物降解是在高度污染环境中去除 PAHs 的主要途径, Chen 等^[23]研究表明枯草芽孢杆菌(Bacillus sub-tilis)和伯克霍尔德菌(Burkholderia cepacia)降低 PAHs能力主要取决于它们是否具有参与芘降解的关键酶。已有研究表明,邻苯二酚 2,3-双加氧酶(C230)、脂肪酶和α-淀粉酶都与 PAHs 和烃类化合物的代谢有关^[23-25]。C230是超二醇双加氧酶家族的成员,催化邻苯二酚和取代邻苯二酚环的裂解效应。Karimi等^[24]研究发现细菌产生的淀粉酶和商业淀粉酶均能降解烃类化合物。脂肪酶在油性烃类的生物降解中也起重要作用^[25]。因此,通过检测 S. equorum 中关键酶(C230、脂肪酶和α-淀粉酶)的活性可以初步判断 PAHs 降解代谢途径。

在 S. equorum 中检测到 3 种酶活性如图 3 所示。



不同字母表示存在显著性差异,P<0.05。

图 3 S. equorum 中 C23O、脂肪酶和 α-淀粉酶的比酶活 Fig.3 Specific activity of C23O, Lipase and α-amylase in S. equorum

由图 3 可知,C230、脂肪酶和 α -淀粉酶的比酶活分别为 56.65、266.92、3.31 U/mg,其中脂肪酶活性最高 (P<0.05),这表明 S. equorum 可能通过产生这些关键降解酶来降解 PAHs。

2.5 热失活 S. equorum 对 PAH4 的物理吸附作用

为了明确 S. equorum 对 PAHs 的去除是否存在物理吸附途径,研究了细胞活性对消减 PAHs 的影响,结果见表 2。

表 2 细胞活性对 S. equorum 消减 PAH4 的影响
Table 2 Effect of cell viability on PAH4-decreasing ability of
S. equorum

组别	降低率/%					
	BaA	CHR	BbFA	BaP	PAH4	
对照组	15.79±1.50 ^B	17.11±2.33 ^B	13.54±1.45 ^B	12.71±0.87 ^B	14.35±1.37 ^B	
热处 理组	28.77±1.21 ^A	30.52±1.10 ^A	25.41±0.74 ^A	27.38±0.42 ^A	27.91±0.66 ^A	

注:同列不同字母表示各组之间存在显著性差异,P<0.05。

由表 2 可以看出,对照组对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别为 15.79%、17.11%、13.54%和 12.71%,热处理组对 BaA、CHR、BbFA 和 BaP 的降低率分别为 28.77%、30.52%、25.41%和 27.38%,S. equorum 经热处理后对 PAH4 的降低能力显著提升(P<0.05),这与 Yousefi 等¹⁴¹的结果一致。Zhu 等¹²⁶研究指出热处理提高了乳酸菌对酚甲烷的结合去除能力。结合本研究结果可知,S. equorum 在热处理后可能改变了细菌细胞壁结构,从而产生新的结合位点,增加了细胞对多环芳烃的吸附。Zhao 等¹²⁵认为乳酸菌对 BaP 的去除不存在生物代谢,在 PAH4 的照料实料是以指

2.6 S. equorum 对 PAH4 的吸附官能团分析

通过 FTIR 分析 S. equorum 的 WCE 以识别与 PAHs 结合相关的潜在官能团和可能的结合位点,获取 PAHs 消减过程中涉及官能团的更多信息结果见图 4。

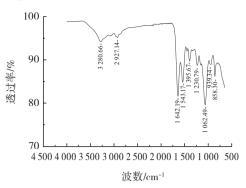


图 4 S. equorum 全细胞提取液的傅里叶红外分析 Fig.4 Fourier transform infrared spectrum of the whole cell extracts of S. equorum

如图 4 所示,根据文献[27]报道对 L. pentosus R3 主要吸收谱带进行归属:3 280.66 cm⁻¹(—OH 的伸展振动吸收);2 927.14 cm⁻¹(C—H 键的不对称伸缩振动吸收);1 642.19 cm⁻¹(酰胺 I 带中的 C=O 伸缩振动吸收);1 543.17 cm⁻¹(酰胺 II 带中的 N—H 键的弯曲振动吸收和 C—N 键的拉伸);1 395.67 cm⁻¹(羧基的对称伸缩振动);1 230.79 cm⁻¹(脂质和多糖 P=O 的伸缩振动);1 062.49 cm⁻¹(肽聚糖 C—O 的伸缩振动)。939.34 cm⁻¹(羧酸面外弯曲振动吸收);858.30 cm⁻¹(C—H 面外弯曲振动吸收)。Xiao 等^[28]表明官能团(羟基、胺基等)除了引发范德华力,还可以引发各种分子水平的相互作用,这些基团在白腐真菌吸附 PAHs 过程中也发挥重要作用。此外,这些化学基团存在于多糖、蛋白质和核酸等物质中,一些脂肪族和芳香族成分可能有助于 S. equorum 对 PAHs 物理吸附。

3 结论

在模拟体系中,受试 4 株 CNS 菌株对 PAHs 都具有消减作用,其中 S. equorum 效果最好。进一步分析发现,S. equorum 的 WCS、WCE、IE 和 CDS 对 PAHs 均具有消减效果,且 WCE 和 CDS 对 PAHs 消减效果最强(P<0.05)。蛋白酶处理使 S. equorum WCE 对 PAH4 消减能力显著降低(P<0.05),说明 S. equorum 关键消减物质为蛋白类物质;同时,在 WCE 中检测到 PAHs 关键降解酶活性,表明 S. equorum 消减 PAHs 存在生物降解途径。热灭活处理使 S. equorum 对 PAH4 消减能力显著提升(P<0.05),说明 S. equorum 对 PAH4 消减能力显著提升(P<0.05),说明 S. equorum 消减 PAHs 存在物理吸附途径,并且一OH、C=O、N—H、C—N等官能团参与了物理吸附过程。因此,S. equorum 可以通过物理吸附和生物降解两种作用途径消减 PAHs。

参考文献:

 AKYÜZ M, ÇABUK H. Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of

- Zonguldak, Turkey[J]. Science of the Total Environment, 2010, 408 (22): 5550–5558.
- [2] CHEN S, KAO T H, CHEN C J, et al. Reduction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in meat by sugar–smoking and di– etary exposure assessment in Taiwan[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(31):7645–7653.
- [3] BINELLO A, CRAVOTTO G, MENZIO J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee samples: Enquiry into processes and analytical methods[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128631.
- [4] WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS I A R C. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures[J]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2010, 92: 1–853.
- [5] EUROPEAN COMMISSION E. Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/ 2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs [J]. Official Journal of the European Union, 2011, 215(4): 1–5.
- [6] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.

 National food safety standard Limits of contaminants in food: GB 2762—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022.
- [7] KENDIRCI P, ICIER F, KOR G, et al. Influence of infrared final cooking on polycyclic aromatic hydrocarbon formation in ohmically pre-cooked beef meatballs[J]. Meat Science, 2014, 97(2): 123–129.
- [8] WANG C, XIE Y T, WANG H Y, et al. Phenolic compounds in beer inhibit formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from charcoal-grilled chicken wings[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 578–586.
- [9] ZHAO L L, WEI J Y, ZHAO H F, et al. Detoxification of cancerogenic compounds by lactic acid bacteria strains[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(16): 2727–2742.
- [10] HADIBARATA T, KRISTANTI R A. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus Armillaria sp. F₀₂[J]. Bioresource Technology, 2012, 107: 314–318.
- [11] HU Y Y, CHEN Q, WEN R X, et al. Quality characteristics and flavor profile of Harbin dry sausages inoculated with lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosus*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 114: 108392.
- [12] BARTKIENE E, BARTKEVICS V, MOZURIENE E, et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages[J]. Food Control, 2017, 71: 285–292.
- [13] JEONG D W, LEE B, HER J Y, et al. Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 236: 9–16.
- [14] YOUSEFI M, SHARIATIFAR N, TAJABADI EBRAHIMI M, et al. In vitro removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by lactic acid bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(3): 954–964.
- [15] LI Y Z, CAI K Z, HU G F, et al. Substitute salts influencing the formation of PAHs in sodium–reduced bacon relevant to Maillard reactions[J]. Food Control, 2021, 121: 107631.
- [16] XIAO Y Q, LI P J, XU M, et al. Decrease of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine by *Lactobacillus pentosus* R3 is associated with surface-layer proteins[J]. Annals of Microbiology, 2018, 68(1): 27-34.

- [17] O'BRIEN A, SHARP R, RUSSELL N J, et al. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 157-167.
- [18] XI L J, LIU D J, WANG L L, et al. Catechol 2, 3-dioxygenase from a new phenolic compound degrader *Thauera* sp. K11: Purification and biochemical characterization[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(3): 255–262.
- [19] WANG D F, CHEN H T, LI J R, et al. Screening and validation of quorum quenching enzyme PF2571 from *Pseudomonas fluorescens* strain PF08 to inhibit the spoilage of red sea bream filets[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 362: 109476.
- [20] BOŽIĆ N, SLAVIĆ M Š, GAVRILOVIĆ A, et al. Production of raw-starch-digesting α-amylase isoform from Bacillus sp. under solid-state fermentation and biochemical characterization[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(7): 1353–1360.
- [21] PENG H, YIN H, DENG J, et al. Biodegradation of benzo[a]pyrene by Arthrobacter oxydans B4[J]. Pedosphere, 2012, 22(4): 554–561.
- [22] ZHAO H F, ZHOU F, QI Y Q, et al. Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to bind Benzo[a]pyrene and the mechanism of the process[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 59: 67–71.
- [23] CHEN K, ZHU Q, QIAN Y G, et al. Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by

- PAH—degrading bacteria *Burkholderia cepacia*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98: 361–367.
- [24] KARIMI M, BIRIA D. The synergetic effect of starch and alpha amylase on the biodegradation of n-alkanes[J]. Chemosphere, 2016, 152: 166-172.
- [25] KADRI T, MAGDOULI S, ROUISSI T, et al. Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes [J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 132: 279–287.
- [26] ZHU Y T, YANG C X, LUO B B, et al. Efficiency of dairy strains of lactic acid bacteria to bind bisphenol A in phosphate buffer saline [J]. Food Control, 2017, 73: 1203–1209.
- [27] 刘森. 乳酸菌吸附重金属镉(II)的能力及机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017. LIU Miao. Study on the mechanism of cadmium biosorption by lactic acid bacteria[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017.
- [28] XIAO L, QU X L, ZHU D Q. Biosorption of nonpolar hydrophobic organic compounds to *Escherichia coli* facilitated by metal and proton surface binding[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(8): 2750–2755.

加工编辑:王雪 收稿时间:2023-05-19

(上接第8页)

- [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24 (S1): 83–86.
- [28] 刘洋, 乔少婷, 李嘉雯, 等. 氮源对嗜热链球菌胞外多糖表型特征的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 58-66.
 LIU Yang, QIAO Shaoting, LI Jiawen, et al. Effects of nitrogen sources on the phenotypic characteristics of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 58-66.
- [29] 李安, 秦晓庆, 赵树臣, 等. 不同培养条件下空肠弯曲菌胞外多糖合成研究[J]. 动物医学进展, 2014, 35(12): 23–26.

 LI An, QIN Xiaoqing, ZHAO Shuchen, et al. Study on exopolysaccharide syntheses of *Campylobacter jejuni* in different states [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(12): 23–26.
- [30] 胡红伟, 段明房, 闫凌鹏, 等. 一株枯草芽孢杆菌的鉴定及液体 发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2017(5): 13-19. HU Hongwei, DUAN Mingfang, YAN Lingpeng, et al. Identification of a *Bacillus subtilis* and optimization of liquid fermentation process [J]. China Feed, 2017(5): 13-19.
- [31] MAHAPATRA S, BANERJEE D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 182–191.
- [32] 尚天翠, 卫刚, 赵玉. 一株产胞外多糖土壤细菌培养条件的优化 [J]. 生物学杂志, 2017, 34(1): 103-106. SHANG Tiancui, WEI Gang, ZHAO Yu. The optimizition of ex-

- opolysacchrides production by an soil bacterium[J]. Journal of Biology, 2017, 34(1): 103–106.
- [33] 蒋樟丽, 韩福霞, 金泽霖, 等. 粪产碱杆菌 AF01 产可溶性胞外多糖发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(23): 165–169. JIANG Zhangli, HAN Fuxia, JIN Zelin, et al. Optimization of fermentation conditions for soluble extracellular polysaccharide production by *Alcaligenes Faecalis* AF 01[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(23): 165–169.
- [34] 张文平, 赵英杰, 罗晟, 等. 高产胞外多糖植物乳杆菌筛选及其发酵工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 38-45. ZHANG Wenping, ZHAO Yingjie, LUO Sheng, et al. Screening of Lactobacillus plantarum with higher yield of exopolysaccharides and optimization of fermentation conditions[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 38-45.
- [35] BANERJEE A, BREIG S J M, GÓMEZ A, et al. Optimization and characterization of a novel exopolysaccharide from *Bacillus haynesii* CamB6 for food applications[J]. Biomolecules, 2022, 12(6): 834.
- [36] NIKNEZHAD S V, NAJAFPOUR-DARZI G, MOROWVAT M H, et al. Eexopolysaccharide production of *Pantoea* sp. BCCS 001 GH: Physical characterizations, emulsification, and antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 1103–1111.

加工编辑:张岩蔚 收稿日期:2023-07-03