

鞘氨醇单胞菌TP-3原生质体制备与再生的研究

周明明¹, 李晓雁², 陈悦², 陈彦梅¹, 黄海东^{1,*}

(1.天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300384;

2.天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384)

摘要:研究了EDTA预处理、菌龄、溶菌酶浓度、酶解温度及酶解时间对鞘氨醇单胞菌TP-3原生质体制备与再生的影响。结果表明:10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理,菌龄18 h,酶浓度60 μg/mL,酶解温度32 ℃,酶解时间30 min时,菌株原生质体的形成率可达96.1%,再生率达32.2%。本文为进行原生质体融合选育优良微生物菌种奠定了基础。

关键词:鞘氨醇单胞菌,原生质体,影响因素

Conditions for protoplast preparation and regeneration by *Sphingomonas sanxanigenens* TP-3

ZHOU Ming-ming¹, LI Xiao-yan², CHEN Yue², CHEN Yan-mei¹, HUANG Hai-dong^{1,*}

(1.College of Agronomy and Resources & Environment, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2.College of Food Science and Biotechnology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: The effect of EDTA pretreatment, cell age and the concentration, temperature and work time of lysozyme on protoplast formation and regeneration by *Sphingomonas sanxanigenens* TP-3 were studied. The results showed that when cell age was 18 h, pretreated by 10 mmol/L EDTA, using 60 μg/mL of lysozyme, enzymolysis at 32 ℃ for 30 min, the protoplast formation rate and regeneration rate respectively reached 96.1% and 32.2%. This work lay the foundation for protoplast fusion to breed good microbial strain.

Key words: *Sphingomonas*; protoplast; influence factors

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)22-0184-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.030

食品胶是一类天然高分子聚合物的统称,这类物质充分水化后能形成黏稠、滑腻或凝胶状的高分子水溶胶,在食品加工中可以起到增稠、乳化、胶凝等作用^[1-2]。食品胶按来源可分为植物胶、动物胶、微生物胶、海藻胶和化学改性胶,其中微生物胶性能优良、用途广泛、资源取之不竭,与其他来源的食品胶相比,生产周期短、不受气候、地理环境和自然灾害的影响,其产品研发和应用日益受到重视^[3-6]。

鞘氨醇单胞菌是合成微生物胶的重要微生物资源,该菌属的菌株能合成包括结冷胶在内的一类生物聚合物,统称为鞘氨醇胶。菌株TP-3是从土壤中分离到的一株鞘氨醇单胞菌属的新种 *Sphingomonas sanxanigenens*, 其发酵合成的产物命名为鞘氨醇胶 Ss, 此胶具有优越的增稠性和剪切稀释性,在含钙离子的水溶液中低浓度即可形成凝胶^[7-9]。将菌株TP-3的发酵液pH调至3.0左右,鞘氨醇胶Ss即可沉淀出

来,与其他鞘氨醇胶所采用的有机溶剂沉淀法提取相比,酸沉提取能够显著地降低生产成本。本文对菌株TP-3的原生质体制备与再生条件进行了研究,为利用原生质体融合选育优良菌株,进一步提高该菌株的产物合成量和生产性能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 *S. sanxanigenens* TP-3 由本实验室保藏; 固体培养基 (g/L) 蔗糖15.0, 蛋白胨5.0, 牛肉膏3.0, 酵母膏3.0, 琼脂粉15.0, pH7.0; 液体培养基 (g/L) 蔗糖15.0, 蛋白胨2.5, 磷酸氢二钾2.5, 磷酸氢二铵1.5, 硫酸镁0.1, 酵母粉1.5, pH7.0; 补充基本培养基 (BNK) (g/L) 蔗糖181.0, 蛋白胨5.0, 牛肉膏3.0, 琼脂粉20.0, pH7.0; 再生补充培养基 (BZNK) (g/L) BNK配方中琼脂改为8.0; 磷酸缓冲液 0.1 mol/L磷酸氢二钠, 0.1 mol/L磷酸二氢钠, pH7.0; 高渗缓冲液

收稿日期: 2015-03-19

作者简介: 周明明(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物多糖方面的研究, E-mail: zmmidx@126.com。

* 通讯作者: 黄海东(1972-), 男, 博士, 教授, 主要从事资源细菌及工程方面的研究, E-mail: lhaidong@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571790); 天津市大学生创新创业项目(201410061062)。

0.1 mol/L磷酸氢二钠, 0.1 mol/L磷酸二氢钠, 0.8 mol/L甘露醇, pH7.0; 原生质体稳定液(SMM) 0.5 mol/L蔗糖, 20 mol/L MgCl₂, 0.02 mol/L顺丁烯二酸, pH6.5; 溶菌酶 用SMM溶液配制, 终浓度0.5 mg/mL, 过滤除菌备用; 磷酸氢二钾、磷酸氢二铵、硫酸镁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甘露醇、MgCl₂、顺丁烯二酸等均均为分析纯; 酚藏花红染色剂 购自Sigma公司。

KYC-100C摇床 上海福玛公司; TGL16A台式高速离心机 湖南凯达公司; WH-2微型旋涡混合仪 上海沪西公司; BA410荧光显微镜 厦门Motic公司; NDJ-1旋转粘度计 上海精密公司; STARTER 2100实验室pH计 奥豪斯仪器(上海)有限公司; DHG-9078A型电热恒温鼓风烘干箱 上海精宏实验设备有限公司; MCO-15A型恒温培养箱 上海市跃进医疗器械一厂; BCM-1000A生物洁净工作台 苏州安泰洁净有限公司; FA2004电子天平 上海精密天平; 电子显微镜 日本Philips EM400-ST。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 取保藏的TP-3菌种划线接种到平板上, 30 °C恒温培养72 h, 挑取单菌落在试管斜面上蛇形划线, 30 °C恒温培养72 h。

1.2.2 菌株发酵曲线测定 取5 mL无菌水将斜面试管中的菌体冲洗下来, 按10%的接种量将其接种到液体培养基中, 30 °C、180 r/min摇床培养72 h。每隔6 h取一次样, 并测定发酵液的pH、粘度、菌数和鞘氨醇胶Ss产量。

1.2.3 发酵参数的测定 使用校准后的pH计测定发酵液的酸碱度; 在6 r/min的条件下, 使用3号转子测定发酵液的粘度; 发酵液无菌取样后, 用无菌水进行梯度稀释, 取0.1 mL稀释样涂布于固体平板培养基上, 30 °C恒温培养3 d后进行菌落计数, 计算发酵的菌数指标; 发酵过程中取样, 加入1 mol/L的盐酸调节发酵液pH至3.0, 沉淀的产物过滤后80 °C恒温干燥至恒重, 称重得发酵产物量。

1.2.4 原生质体的制备 菌株TP-3液体培养至对数生长前期, 取适量菌液在8000 r/min条件下离心5 min, 弃上清液, 用磷酸缓冲液洗涤菌体细胞。将菌体悬浮于适量的SMM缓冲液中, 使溶液中细胞浓度约为10⁸~10⁹ CFU/mL。取0.1 mL菌悬液, 用无菌水稀释到10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷, 涂布平板培养基, 30 °C培养4 d后得菌落数A(菌落总数)。取剩余的菌悬液, 在其中加入溶菌酶, 混合均匀后于37 °C保温30 min, 4000 r/min离心10 min, 弃上清液, 用高渗缓冲液洗涤除酶, 取菌液0.1 mL, 用无菌水稀释到10⁻²、10⁻³、10⁻⁴, 涂布平板培养基, 进行剩余菌数B(未被酶裂解的剩余细胞)的测定。

1.2.5 原生质体的再生 取0.1 mL酶解后的原生质体悬液, 用SMM缓冲液稀释到10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵, 各取1 mL加入底层BNK培养基的中央, 再倒入上层BZNK培养基, 混匀, 30 °C培养4~5 d后计数, 将菌落数计为C(再生菌落数)。原生质体形成率与再生率的计算公式如下: 原生质体形成率(%)=(A-B)/A×100, 原生质体再生率(%)=(C-B)/(A-B)×100。

1.2.6 原生质体制备与再生的影响因素

1.2.6.1 EDTA预处理对原生质体制备与再生的影响 酶解前, 在菌龄18 h, 酶浓度100 μg/mL, 酶解温度37 °C, 酶解时间30 min的固定条件下, 加入2~14 mmol/L浓度梯度的EDTA对菌悬液进行预处理, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.6.2 青霉素浓度对原生质体制备与再生的影响 用10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理, 菌龄为18 h, 酶浓度100 μg/mL, 温度37 °C, 酶解时间30 min的固定条件下, 加入0~100 μg/mL的青霉素预处理2 h, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.6.3 菌龄对原生质体制备与再生的影响 依据1.2.2发酵曲线中的结果, 用10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理, 酶浓度100 μg/mL, 温度37 °C, 酶解时间30 min的固定条件下, 选择6~36 h的细菌培养物制备原生质体, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.6.4 溶菌酶浓度对原生质体制备与再生的影响 用10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理, 菌龄18 h, 温度37 °C, 酶解时间30 min的固定条件下, 取10~120 μg/mL的溶菌酶制备原生质体, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.6.5 酶解温度对原生质体制备与再生的影响 用10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理, 菌龄18 h, 酶浓度100 μg/mL, 酶解时间30 min的固定条件下, 选择17~47 °C范围的酶解温度制备原生质体, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.6.6 酶解时间对原生质体制备与再生的影响 用10 mmol/L EDTA对菌体进行预处理, 菌龄18 h, 酶浓度100 μg/mL, 酶解温度37 °C的固定条件下, 酶解时间为10~70 min制备原生质体, 测定原生质体形成率和原生质体再生率。

1.2.7 原生质体制备条件的验证 在上述原生质体各制备因素的基础上, 得到原生质体制备与再生的最佳条件, 进行各影响因素的综合实验, 得出菌株原生质体的最高形成率和再生率。

1.2.8 菌体细胞与原生质体的观察 用接种环取菌悬液于干净的载玻片上, 晾干, 加结晶紫染液进行染色, 用水冲洗并晾干, 在显微镜下进行观察。细菌电子显微镜观察方法见参考文献[9], 配制0.01%的酚藏花红染色剂^[10], 在原生质体溶液中按1:1的比例加入染色剂, 将混合溶液滴于载玻片上, 加盖玻片, 在荧光显微镜下进行观察。

1.3 数据处理

实验进行三次重复, 应用软件Origin 6.1和Excel 2003对得出的数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 菌株TP-3的发酵曲线

在实验菌株发酵培养的过程中, 进行pH、发酵液粘度、菌数和鞘氨醇胶Ss产物量的测定, 结果如图1所示。从细胞生长曲线可以看出, 菌株TP-3在培养8 h后进入对数生长期, 46 h进入稳定期, 此时菌数达1.5×10¹⁰ CFU/mL; 产物鞘氨醇胶Ss的合成曲线与细

胞生长曲线近乎平行,在60 h达到最高24.1 g/L,结晶紫染色后镜检发现,在发酵培养的全部阶段均能观察到纤毛状的产物包裹在细胞周围,说明鞘氨醇胶Ss是一种初级代谢产物;发酵培养在32 h之前,发酵液的pH基本稳定,随着产物合成量的增加,发酵液粘度逐渐增加,产物鞘氨醇胶Ss属于酸性多糖,因此32 h之后发酵液的pH略有降低。由于整个发酵周期中,胞外均存在高分子多糖,不利于原生质体的制备,提示应该选择发酵液粘度低、产物合成少的发酵阶段,进行原生质体制备的研究。

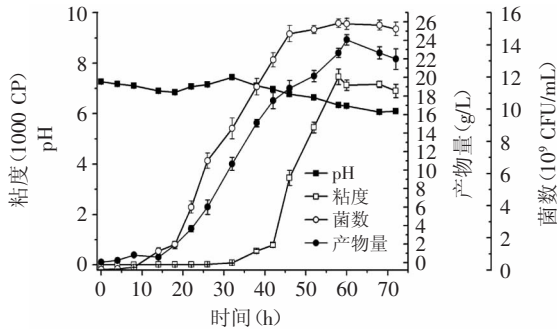


图1 菌株TP-3的发酵曲线

Fig.1 Fermentation growth curve of strain TP-3

2.2 原生质体的制备与再生

2.2.1 EDTA预处理对原生质体制备与再生的影响

鞘氨醇单胞菌TP-3为革兰氏阴性细菌,结构和成分较革兰氏阳性菌复杂,特别是细胞外壁中的脂多糖及多糖类,会影响溶菌酶的作用。Minghua D等发现,制备原生质体时,在添加溶菌酶之前用EDTA预处理,可以提高原生质体的形成率^[11]。本实验用EDTA对菌悬液进行预处理,结果如图2所示。

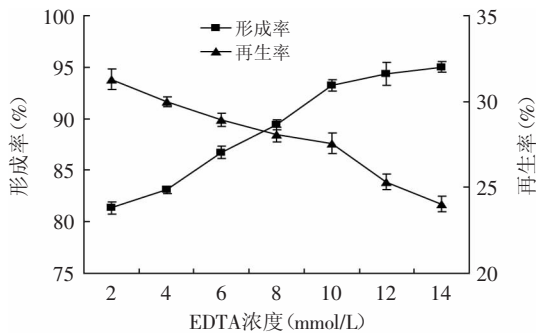


图2 EDTA预处理对原生质体形成率与再生率的影响

Fig.2 Effect of EDTA pretreatment on protoplast formation and regeneration of strain TP-3

随着EDTA浓度的增大,原生质体的形成率在10 mmol/L之前逐渐提高;原生质体的再生率则相反,呈下降趋势。以原生质体形成率与再生率的乘积最大,作为判断原生质体制备最佳条件的依据^[12],以此标准,选择10 mmol/L的浓度作为EDTA预处理的最佳浓度。

2.2.2 青霉素浓度对原生质体制备与再生的影响

在菌株TP-3液体培养的过程中加入一定量的青霉

素,可以在一定程度上提高原生质体的形成率(图3)。与抑制革兰氏阳性菌的机理不同,青霉素可以与革兰氏阴性菌细胞膜上的青霉素结合蛋白PBPS发生结合,从而干扰细胞壁代谢,并造成细胞形变^[13]。

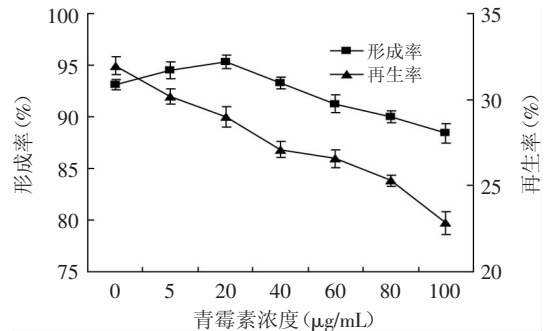


图3 青霉素浓度对原生质体形成率与再生率的影响

Fig.3 Effect of concentration of penicillin on protoplast formation and regeneration of strain TP-3

从实验结果可以看出,青霉素的加入明显降低了原生质体再生率;在浓度低于20 μg/mL时,使用青霉素有利于原生质体的形成,但浓度继续升高后,由于细胞存活率下降,实验过程中的剩余细胞数量迅速下降,原生质体形成率也相应降低。

2.2.3 菌龄对原生质体制备与再生的影响 菌龄对原生质体的制备与再生很重要,处于对数生长期的细胞生理状态相对一致,细胞分裂迅速,对酶的敏感性高,易于原生质体化和再生^[14]。菌龄对原生质体制备与再生的影响,结果如图4所示。

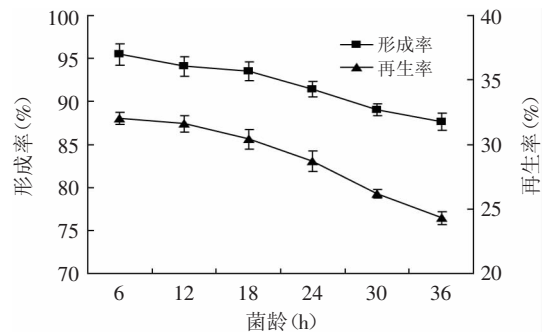


图4 菌龄对原生质体形成率与再生率的影响

Fig.4 Effect of cell age on protoplast formation and regeneration of strain TP-3

原生质体的形成率和再生率都随着菌龄的增加而下降。说明随着发酵时间的延长,菌体细胞周围的多糖产物逐渐增多,影响溶菌酶的作用效果;但菌龄过短时细胞数量偏低,不利于后续的原生质体融合研究,因此选择菌龄为18 h作为原生质体制备与再生的最佳发酵时间。

2.2.4 溶菌酶浓度对原生质体制备与再生的影响

经EDTA预处理后,实验菌株细胞壁表面的脂多糖层的Ca²⁺、Mg²⁺被螯合去除,破坏了脂多糖的结构,使溶菌酶可以作用于细胞壁的肽聚糖^[15]。用不同浓度的溶解酶进行原生质体的制备与再生实验,结果如图5

所示。

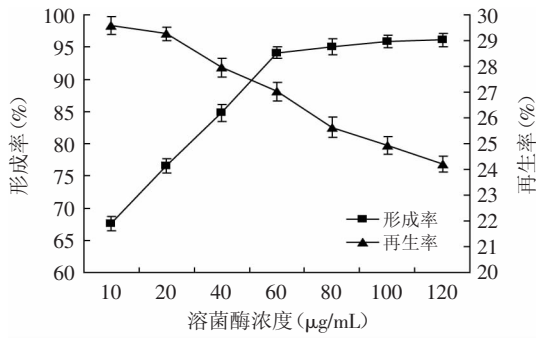


图5 酶浓度对原生质体形成率与再生率的影响
Fig.5 Effect of concentration of lysozyme on protoplast formation and regeneration of strainTP-3

随着溶菌酶量的增加,原生质体形成率呈上升趋势,由于细胞壁破坏影响菌体活性,再生率呈下降趋势。溶菌酶浓度在10~60 μg/mL范围内,原生质体形成率迅速增长,继续提高溶菌酶浓度,原生质体形成率增加不明显,但原生质体再生率迅速下降。原因可能是随着酶浓度的增加,酶不仅酶解了细胞壁,还对早期形成的原生质体细胞膜造成了损伤,再生率下降^[12]。依据原生质体形成率与再生率乘积最大原则^[12],选择溶菌酶浓度为60 μg/mL作为原生质体制备与再生的最佳条件。

2.2.5 酶解温度对原生质体制备与再生的影响 原生质体制备时,低于酶解最适温度时,酶活性低,酶解时间长;温度高于酶解最适温度时,酶蛋白逐渐变性而使酶失活,不利于原生质体的形成^[16]。本文对不同的酶解温度进行了实验,结果如图6所示。

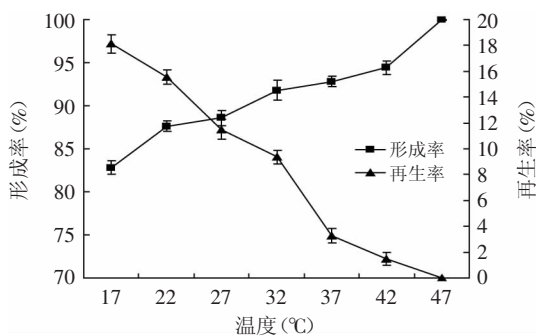


图6 酶解温度对原生质体形成率与再生率的影响
Fig.6 Effect of temperatures of lysozyme on protoplast formation and regeneration of strainTP-3

随着温度的升高,原生质体的形成率呈上升趋势,再生率则持续下降,酶解温度达到47 °C时,再生率降为0。随着温度的升高溶菌酶活性增强,因此原生质体形成率增高,再生率的下降一方面是由于溶菌酶对细胞的损伤,另一方面,菌株TP-3的最适发酵温度为28~30 °C,温度过高对菌体本身的内酶系统造成破坏,使原生质体无法再生^[17]。选择32 °C为最佳酶解温度。

2.2.6 酶解时间对原生质体制备与再生的影响 溶

菌酶作用时间也是影响原生质体制备的重要因素,酶解时间不足,细胞不能完全去壁;酶解时间过长,会使早期释放的原生质体膜受到伤害,使原生质体破碎或再生能力减弱^[18]。本文对不同的酶解时间进行了实验,结果如图7所示。

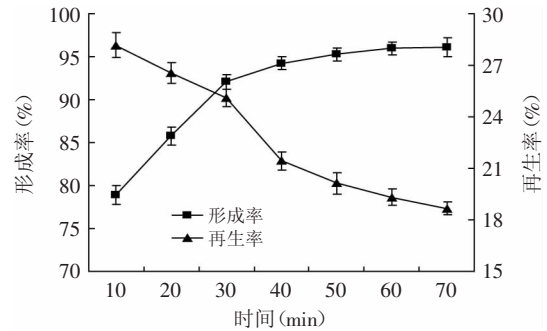


图7 酶解时间对原生质体形成率与再生率的影响
Fig.7 Effect of operational times of lysozyme on protoplast formation and regeneration of strainTP-3

在酶作用10~30 min之间,原生质体的形成率随酶解时间延长而迅速提高,之后增速缓慢,再生率则呈下降趋势。酶解30 min后,原生质体再生率的迅速下降,说明过长的酶解时间影响了原生质体的活性,因此选择30 min作为原生质体形成与再生的最佳酶解时间。

2.3 原生质体制备条件的验证

根据上述实验结果,得到原生质体制备与再生的最佳条件为:10 mmol/L EDTA预处理,菌龄18 h,溶菌酶浓度60 μg/mL,酶解温度32 °C,酶解时间30 min。在该条件下进行验证实验,结果表明原生质体形成率和再生率分别达到96.1%和32.2%。对原生质体制备前后的菌体形态进行观察,图8为菌体细胞的电子

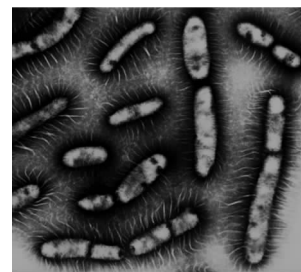


图8 TP-3菌体细胞(7000×)
Fig.8 Cell of strainTP-3(7000×)

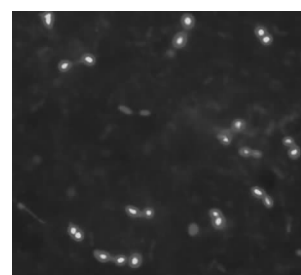


图9 菌株TP-3的原生质体(1000×)
Fig.9 Protoplast of strainTP-3(1000×)

显微镜观察结果,可以看出菌株TP-3的细胞为杆状,大小为 $0.6\sim 0.9\ \mu\text{m}\times 1.5\sim 2.0\ \mu\text{m}$,细胞周围可以观察到明显的纤毛状产物,鞘氨醇胶Ss。菌株TP-3的原生质体进行酚藏花红染色,在荧光显微镜下观察(图9),大多数菌体呈类球状,直径 $0.9\sim 1.2\ \mu\text{m}$,原生质体周围仍然能观察到多糖产物。

3 结论与讨论

本文对菌株TP-3的原生质体制备条件进行了优化,发现EDTA预处理、菌龄、溶菌酶浓度、酶解温度和时间等因素对原生质体的形成率与再生率影响明显。由于菌株TP-3外包装着产物Ss胶,影响了溶菌酶对菌株的作用,进而影响原生质体的制备。通过优化实验得出原生质体制备与再生的最佳条件:10 mmol/L EDTA预处理,菌龄18 h,酶浓度 $60\ \mu\text{g/mL}$,酶解温度 $32\ ^\circ\text{C}$,酶解时间30 min,在此条件下菌株原生质体的形成率可达96.1%,再生率达32.2%。菌株TP-3是鞘氨醇单胞菌属的新种,该菌株的原生质体制备与再生条件的研究还未见报道。实验中发现加入 $20\ \mu\text{g/mL}$ 浓度以下的青霉素,可干扰细胞壁合成,原生质体形成率有所提高,但使用青霉素后细菌存活率降低,不利于后期原生质体融合育种,因此选择不加青霉素进行预处理。菌株TP-3原生质体周围仍可以观察到多糖产物的分泌,进一步说明鞘氨醇胶Ss合成后连接在细胞膜的脂载体上,并不分泌到细胞壁外。

Ss是鞘氨醇胶家族的一个新品种,增加产物量、提高产品粘度、降低胶凝临界浓度等诸多研究工作有待开展。对菌株进行传统诱变,获得目的性状提高的突变株后,通过多轮递推式原生质体融合,可以快速得到发酵性状更优良的菌株。原生质体的制备和再生是决定融合效率的关键因素,本文为菌株TP-3进行原生质体融合及基因组改组等育种工作奠定了基础。

参考文献

- [1] Vasiliki E, Maria M, Ioanna M, et al. Compression of gellan gels. Part II :effect of sugars[J]. Food Hydrocoll,2010,24(4):392-397.
- [2] 胡国华. 功能性食品胶[M]. 北京:化学工业出版社,2003:1-22.
- [3] Prajapati VD, Jani GK, Zala BS, et al. An insight into the

emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer[J]. Carbohydr Polym,2013,93(2):670-678.

- [4] Bradbeer JF,Hancocks R,Spyropoulos F,et al. Self-structuring foods based on acid-sensitive low and high acyl mixed gellan systems to impact on satiety[J]. Food Hydrocoll,2014,35(100):522-530.
- [5] 张伟,沈年汉,陈秀芳,等. 几种微生物多糖的特性及在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技,2010,31(6):358-360.
- [6] 朱桂兰,童群义. 微生物多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(6):444-448.
- [7] Haidong H,Wei W,Ting M,et al. *Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov.,isolated from soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol,2009,59(4):719-723.
- [8] Huang HD, Wang W, Ma T, et al. Analysis of molecular composition and properties of a novel biopolymer[J]. Chem J Chinese Univ,2011,30:324-327.
- [9] 胡冰. 生物电子显微镜技术[M]. 南京:南京农业大学出版社,2004:99-101.
- [10] 龙建友,唐世荣,吴文君. 原生质体融合技术对秦岭霉菌产量提高的影响[J]. 中国农业科学,2007,40(7):1416-1421.
- [11] Minghua D,Sara Z,Thomas R,et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli*. [J]. Metabolic Engineering,2005,7(1):45-52.
- [12] 岑沛霖. 工业微生物学[M]. 北京:化学工业出版社,2001:335-344.
- [13] 张凤凯,金少鸿. β -内酰胺类抗生素的作用靶位-青霉素结合蛋白[J]. 国外医药:抗生素分册,2000,21(3):107-110.
- [14] 曾献春,孟冬丽. 乳酸菌原生质体制备与再生研究[J]. 食品科学,2006,27(10):269-272.
- [15] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京:科学出版社,2003:302-303.
- [16] 韩光杰,孙俊,李传明,等. 苏云金芽孢杆菌原生质体的制备及大质粒转化[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):37-40.
- [17] 甘邱锋,张晓琳,王洁颖,等. 刺糖多孢菌原生质体制备与再生条件优化[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(1):18-24.
- [18] 宋爱环,李红叶,刘小红. 指状青霉(*Penicillium digitatum*)原生质体制备和再生条件[J]. 农业生物技术学报,2004,12(2):197-201.
- [14] Tian FW,Zhai QX,Zhao JX,et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice[J]. Biological Trace Element Research,2012,150(3):264-271.
- [15] Zhong YZ, Zhi FH, Hong JL, et al. *In vitro* removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria[J]. Food Science and Biotechnology,2012,21(6):1677-1683.
- [16] Shaimaa H, Tianli Y, Osama M. Reduction of Patulin in Aqueous Solution by Lactic Acid Bacteria[J]. Food Microbiology & Safety,2012,77(4):238-241.
- [17] Peltonen K,El-Nezami H,Haskard C,et al. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria [J]. Journal of Dairy Science,2001,84(10):2152-2156.

(上接第183页)

社,2012.

- [10] SN/T 2534-2010,进出口水果和蔬菜制品中展青霉素含量检测方法[S].
- [11] 张茜,张娟,堵国成. 具有微囊藻毒素清除能力的乳酸菌的分离筛选及其影响因素[J]. 应用与环境生物学报,2012,18(5):745-751.
- [12] Topcu A,Bulat T,Wishah R,et al. Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains[J]. International Journal of Food Microbiology,2010(39):202-205.
- [13] Karita DP,Hani SE,Seppo JS,et al. Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2000(80):1942-1945.