

网络出版时间:2024-07-05 16:56 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2025.01.002  
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20240704.1127.004

# 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选鉴定及 降解效果评价

薛琳琳<sup>1</sup>,张朋振<sup>1</sup>,杨小进<sup>2</sup>,范收武<sup>2</sup>,李旺<sup>1</sup>

(1 河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471023;2 洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司,河南 洛阳 471600)

**【摘要】**【目的】筛选高效实用的玉米赤霉烯酮(ZEN)降解菌株,并初步探究其降解机制及降解效果。【方法】以 ZEN 为唯一碳源,从发霉饲料和土壤样品中筛选菌株,通过形态学观察、16S rDNA 测序分析对菌株进行鉴定;以培养时间为变量对菌株生长速率和 ZEN 降解率进行相关分析;通过测定菌株不同活性成分及失活处理后的 ZEN 降解率对降解活性物质进行初步分析定位;对比探究硫酸铵沉淀法(硫酸铵饱和度分别为 30%,40%,50%,60%,70%和 80%)和单宁-聚乙二醇法(单宁质量浓度分别为 2,5,10,15 和 20 mg/mL;聚乙二醇质量浓度分别为 6,8,10,12 和 14 mg/mL)对粗降解酶的提取效果;通过 SDS-PAGE 凝胶电泳测定目标活性蛋白的分子质量,最后以菌株和粗酶液调节霉变玉米粉的水分质量分数,测定 ZEN 的降解效果。【结果】筛选得到试验菌株 XJ-140,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),该菌在培养 24 h 时可降解 93.75%的 ZEN(2  $\mu$ g/mL)。菌株 XJ-140 以胞外酶降解 ZEN 为主,同时辅以细胞壁吸附。硫酸铵沉淀法(硫酸铵饱和度 60%)和单宁-聚乙二醇法(最优单宁质量浓度为 10 mg/mL,最优聚乙二醇质量浓度为 10 mg/mL)提取粗降解酶的 ZEN 降解率分别为 37.14%和 51.49%,单宁-聚乙二醇法提取效果更佳。初步推断目标活性蛋白的分子质量在 61 ku 或 28 ku。此外,菌株 XJ-140 的发酵液和粗酶液均能够降解霉变玉米粉中的 ZEN。【结论】筛选的菌株 XJ-140 通过胞外酶降解 ZEN,实际应用中对 ZEN 污染的玉米粉有一定清除效果。

**【关键词】** 玉米赤霉烯酮;解淀粉芽孢杆菌;降解酶;降解效果

**【中图分类号】** S816.3

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2025)01-0013-10

## Screening, identification and degradation efficacy evaluation of zearalenone degrading bacteria

XUE Linlin<sup>1</sup>, ZHANG Pengzhen<sup>1</sup>, YANG Xiaojin<sup>2</sup>, FAN Shouwu<sup>2</sup>, LI Wang<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China;

2 Luoyang OKBK Biotechnology Co., Ltd, Luoyang, Henan 471600, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study screened efficient and practical strains capable of degrading zearalenone (ZEN) and preliminarily investigated the degradation mechanism and effectiveness. 【Method】 Strains were screened from moldy feed and soil samples using ZEN as the sole carbon source and were identified by morphological observation and 16S rDNA genes equence analysis. The growth rate of strains and ZEN degradation rate were analyzed using time as a variable. The degradation active substances were preliminarily analyzed and localized through the determination of ZEN degradation rate in different active components and inactivated treatments. The extraction effects of crude degradation enzymes using ammonium sulfate

**【收稿日期】** 2023-10-18

**【基金项目】** 河南省重点攻关项目(212102110157);河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(212102110174)

**【作者简介】** 薛琳琳(2000—),女,河南宜阳人,在读硕士,主要从事生物饲料与动物精准营养研究。E-mail:2818046943@qq.com

**【通信作者】** 李旺(1976—),男,河北丰宁人,教授,硕士生导师,主要从事生物饲料与动物精准营养研究。

E-mail:liwang@haust.edu.cn

(AS) precipitation (AS saturation of 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80%) and tannin-polyethylene glycol method (tannin mass concentrations of 2, 5, 10, 15 and 20 mg/mL and polyethylene glycol solution mass concentrations of 6, 8, 10, 12 and 14 mg/mL) were compared. The molecular weights of target active proteins were determined by SDS-PAGE gel electrophoresis. Finally, the degradation effect of ZEN was determined by adjusting moisture mass fraction of mold-contaminated cornmeal with identified strains and crude enzyme solution. 【Result】 The screened test strain XJ-140 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, which could degrade 93.75% of ZEN (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) within 24 hours. The strain XJ-140 mainly degraded ZEN with extracellular enzymes and was complemented by cell wall adsorption. The ZEN degradation rates of crude degradative enzymes extracted by 60% saturation of AS and tannin-polyethylene glycol method (optimal tannin concentration 10 mg/mL and optimal polyethylene glycol concentration 10 mg/mL) were 37.14% and 51.49%, respectively. The tannin-polyethylene glycol method of extraction was more favorable. The molecular weight of target active protein was preliminarily inferred to be 61 ku or 28 ku. Both the fermentation solution and crude enzyme solution of strain XJ-140 could degrade ZEN in mold-contaminated cornmeal. 【Conclusion】 The strain XJ-140 utilized extracellular enzymes to degrade ZEN and exhibited discernible efficacies in reducing ZEN contamination in practical applications involving mold-contaminated cornmeal.

**Key words:** zearalenone; *Bacillus amyloliquefaciens*; degradation enzyme; degradation efficacy

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等镰刀菌属真菌产生的次级代谢产物,是一种酚的二羟基苯酸的内酯结构<sup>[1]</sup>,此结构与具有雌激素效力的类固醇激素(17- $\beta$ 雌二醇)特征相似<sup>[2]</sup>,进入人和动物体后可竞争性 with 生殖器官中的雌激素受体结合,从而使机体表现出生殖毒性,以及致癌毒性、基因毒性和免疫毒性等<sup>[3]</sup>。此外,ZEN 还具有高度污染性,是粮食谷物中污染范围最广泛的真菌毒素之一,在玉米、小麦、豆类等农作物及其相关制品中 ZEN 污染问题均有报道<sup>[4-5]</sup>。ZEN 的高危性和污染普遍性严重威胁畜禽养殖效益和人类健康,因此为了提高畜禽生产及保障食品安全,研究脱除或降解 ZEN 的技术方法非常有必要。

ZEN 的脱毒法主要包括物理法、化学法和生物法。物理法和化学法具有降解效率较低、营养物质流失、易造成二次污染等局限性;而生物法则是利用某些功能微生物及其代谢产物,如分泌的酶对 ZEN 进行降解,此方法更为绿色、高效和安全<sup>[6]</sup>。目前研究发现可用于 ZEN 解毒的非致病微生物有芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)<sup>[7]</sup>、乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)<sup>[8]</sup>、酵母菌属(*Saccharomyces* spp.)<sup>[9]</sup>和酪丁酸梭菌(*Clostridium tybutyricum*)<sup>[10]</sup>等,且呈现出不同的作用机理。除单一菌种外,已有研究证实,微生物菌群能通过菌株间的协同效应实现对 ZEN 及其同源物的降解<sup>[11]</sup>。生物法中除了筛选 ZEN 降解

菌株外,挖掘降解酶也一直是消除 ZEN 的研究热点。ZEN 降解酶具有较强的特异性和专一性,其反应过程温和可控,是 ZEN 脱毒应用中最有潜力和商业价值的技术手段<sup>[12]</sup>。已报道的 ZEN 降解酶有内酯酶(lactonase, ZHD101)<sup>[13]</sup>、内酰胺酶(lactamase, ZENG)<sup>[14]</sup>、漆酶(laccase, CotA)<sup>[15]</sup>、过氧化物酶(oxidase, Prx)和氧化酶(oxidase, Oxa)<sup>[16]</sup>等。另外, AZAM 等<sup>[17]</sup>研究了一种融合酶 ZHDCP,可同时降解 ZEN 和赭曲霉毒素 A (ochratoxin, OTA)。但是对 ZEN 降解酶的分离提取和酶促降解研究仍有待深入。硫酸铵(AS)沉淀法是最常见的蛋白质分离提取法之一。AS 沉淀法中蛋白质的沉淀是基于离子强度的溶解度降低,从而实现蛋白质的粗分离<sup>[18]</sup>。但是该方法的盐用量较大,且易造成蛋白失活。丹宁-聚乙二醇法中,利用丹宁与蛋白质形成不溶于水的复合物,然后再用聚乙二醇溶液作为解析剂从单宁-蛋白质的复合物中解析出蛋白质<sup>[19]</sup>,1 mol 单宁可以结合 12 mol 蛋白质<sup>[20]</sup>。已有研究人员采用丹宁-聚乙二醇法从黑曲霉发酵液中成功解析出了纤维素酶<sup>[21]</sup>。

本研究旨在筛选降解动物饲料中 ZEN 的微生物菌株,使用 AS 沉淀法和单宁-聚乙二醇法进行降解酶的提取,并应用于霉变玉米粉中验证其在实际应用中的降解效果,以期后续阐释 ZEN 降解机理、挖掘相关功能基因,以及解决玉米副产物等饲料原料的安全问题提供方法和依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验样品来源

随机采集河南省洛阳市某养殖场发霉饲料 6 份及周边生长农作物土壤 4 份,共计 10 份样品,每份样品收集 100 g,编号后装入自封袋并及时带回,于 4 ℃ 冷藏保存。玉米粉样品取自洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司生产部。

### 1.2 主要试剂及培养基

主要试剂:ZEN 标准品(纯度 > 98%),上海源叶生物科技有限公司;甲醇(色谱级)、十二烷基硫酸钠(SDS)、单宁酸、聚乙二醇 4000,天津科密欧化学试剂有限公司;蛋白酶 K,福州飞净生物科技有限公司;玉米赤霉烯酮荧光定量检测盒,天津龙科新域生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、5×SDS-PAGE Loading Buffer、Protein Marker (10~200 ku),武汉赛维尔生物科技有限公司;其余常规试剂均为国产分析纯。

富集培养基:蔗糖 10.00 g/L,磷酸二氢钾 1.52 g/L,磷酸氢二钠 2.44 g/L,硫酸镁 0.20 g/L,硫酸铵 0.50 g/L,胰蛋白胨 5.00 g/L,自然 pH,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

基础盐培养基(minimal salt medium, MSM):氯化钙 0.07 g/L,磷酸二氢钾 1.52 g/L,磷酸氢二钠 2.44 g/L,硫酸镁 0.20 g/L,硫酸铵 0.50 g/L,琼脂 20.00 g/L(固体培养基),自然 pH,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

Luria-Bertani(LB)培养基:胰蛋白胨 10.00 g/L,酵母浸粉 5.00 g/L,氯化钠 10.00 g/L,琼脂 20.00 g/L(固体培养基),pH 值为 7.0~7.2,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

### 1.3 ZEN 降解菌株的筛选和鉴定

1.3.1 ZEN 降解菌株的筛选 将试验样品依次编号后分别称取 10 g 于锥形瓶中,加入 100 mL 无菌生理盐水,35 ℃、200 r/min 振荡 2 h 后静置 30 min;取上层液体 1 mL 于 49 mL 液体富集培养基(ZEN 终质量浓度为 2 μg/mL)中,35 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h 获得富集培养菌液。吸取 100 μL 2 μg/mL ZEN 涂布至 MSM 固体培养基,静置晾干 2 min,随后取 100 μL 富集培养菌液涂布至含毒素的 MSM 培养基,37 ℃ 恒温倒置培养,观察生长情况。挑取长势良好、不同形态的菌落接种于 LB 固体培养基上进行纯化。将纯化后的各单菌株挑至 LB 液体培养基中,35 ℃、200 r/min 发酵培养 24 h;取 1

mL 发酵液接种于 49 mL LB 液体培养基(ZEN 终质量浓度为 2 μg/mL)中,振荡混合均匀,以含 2 μg/mL ZEN 的无菌 LB 液体培养基为空白对照,35 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h。根据玉米赤霉烯酮荧光定量检测盒说明书,对菌株发酵液进行处理,使用恒温孵育器对样品及免疫层析试纸条进行共孵育,荧光定量读数仪对结果读值。计算各菌株降解率。ZEN 降解率=(对照样品 ZEN 读值-试验样品 ZEN 读值)/对照样品 ZEN 读值×100%。

1.3.2 ZEN 降解菌株的鉴定 (1)形态学鉴定。将目标菌株稀释涂布于 LB 平板上,于 37 ℃ 恒温倒置培养。培养 24 h 后观察菌落形态并进行革兰氏染色,于光学显微镜下观察菌体颜色及特征。

(2)16S rDNA 鉴定。对目标菌株的 DNA 进行扩增,选择正向引物 BSF(27F)和反向引物 BSR(1492R)对菌株进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL):Premix Taq 12.5 μL,27F、1429R 各 1 μL,模板 1 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;72 ℃ 再延伸 10 min。扩增后的 PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI 上 BLAST 对比分析序列同源性,用 MEGA 11.0 软件邻位连接法(Neighbour-joining)构建系统发育树。

### 1.4 菌株 XJ-140 降解 ZEN 的动力曲线

将复苏好的菌株 XJ-140 按 2% 接种量接种至含 2 μg/mL ZEN 的 LB 培养基中,培养条件设置为 35 ℃、200 r/min,分别在培养 0,3,6,9,12,15,18,21,24 和 27 h 取样测定菌液 OD<sub>600 nm</sub> 值和培养基中 ZEN 的残留量,绘制菌体生长和 ZEN 降解率随时间变化的曲线。

### 1.5 菌株 XJ-140 降解活性物质的定位及分析

将菌株 XJ-140 培养至稳定期的 LB 液体培养物进行等分。在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集的上清液过 0.22 μm 无菌滤膜后作为无细胞上清液;收集的菌体经无菌 PBS 洗涤 2 次,再用等体积的无菌 PBS 重悬后制备 3 种不同组分。制备的 3 种组分如下:重悬后备用,作为活菌体;重悬后经 121 ℃、30 min 的高压蒸汽处理,作为灭活菌体;重悬后置于冰浴中超声破碎,10 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 无菌滤膜后,作为细胞内容物。将制备的各试验组分与 ZEN 共培养,体系中 ZEN 的终质量浓度为 2 μg/mL,以含相同质量浓度 ZEN(2 μg/mL)的无菌 PBS(0.2 mol/L,pH

6.8)为空白对照,在 35 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 24 h,测定各组分 ZEN 残留量并计算降解率。

以上述试验为基础,取降解率最高的组分进行不同失活处理:处理组 1,无细胞上清液中加入蛋白酶 K(终质量浓度为 1 mg/mL),于 55 ℃水浴 2 h;处理组 2,无细胞上清液中加入蛋白酶 K(终质量浓度为 1 mg/mL)和 1% SDS,于 55 ℃水浴 2 h;处理组 3,上清液在 100 ℃水浴 30 min。将不同处理后的 3 组上清液与 ZEN 共培养,体系中 ZEN 的终质量浓度为 2 μg/mL,以含相同质量浓度 ZEN(2 μg/mL)的无菌 PBS 为空白对照,于 35 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 24 h,测定各处理组 ZEN 残留量并计算降解率。

### 1.6 菌株 XJ-140 降解酶粗提取条件的优化

(1)硫酸铵(AS)沉淀法。取无细胞上清液 180 mL,于冰浴环境下缓慢加入研磨后的 AS,使其终质量分数分别为 30%,40%,50%,60%,70%和 80%,置于 4 ℃过夜沉淀,10 000 r/min、4 ℃离心 10 min 收集蛋白沉淀。用无菌磷酸(PB)缓冲液(0.2 mol/L,pH 6.8)重新溶解不同盐沉浓度的蛋白沉淀,之后将样品放入 2 ku 的透析袋于 4 ℃透析 24 h,交换液为蒸馏水。将透析过的各组样品与 ZEN 共培养,体系中 ZEN 的终质量浓度为 2 μg/mL,以含相同质量浓度 ZEN(2 μg/mL)的无菌 PBS 为空白对照,于 35 ℃反应 24 h,测定各组样品 ZEN 残留量并计算降解率。

(2)单宁-聚乙二醇法。参照文献[19]的提取方式。取无细胞上清液 150 mL,加入适量单宁使其终质量浓度分别为 2,5,10,15 和 20 mg/mL,涡旋 60 s,静置提取 2 h,4 000 r/min、4 ℃离心 15 min 收集单宁沉淀后的上清液。将该上清液与 ZEN 共培养,体系中 ZEN 的终质量浓度为 2 μg/mL,以含相同质量浓度 ZEN(2 μg/mL)的无菌 PBS 为空白对照,于 35 ℃反应 24 h 后,计算降解率。在此结果基础上,选取最佳单宁质量浓度沉淀蛋白,分别加入 6,8,10,12 和 14 mg/mL 聚乙二醇溶液,涡旋 60 s,静置提取 2 h,4 000 r/min、4 ℃离心 10 min 收集聚乙二醇解析后的上清液。将该上清液与 ZEN(终质量浓度为 2 μg/mL)共培养,以含相同质量浓度 ZEN(2 μg/mL)的无菌 PBS 为空白对照,于 35 ℃反应 24 h 后,计算降解率,确定聚乙二醇解析单宁-蛋白质复合物的最佳质量浓度。

### 1.7 菌株 XJ-140 降解粗酶液的分子质量测定

按照 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书

进行制胶。待胶完全凝固后将其装置于电泳槽中,加入电泳缓冲液,将 1.6 节采用单宁-聚乙二醇法分离纯化的样品进行上样。吸取单宁沉淀后的上清液和聚乙二醇解析后的上清液各 40 μL,之后各加入 10 μL 的 5×SDS-PAGE Loading Buffer 振荡混匀,煮沸变性 10 min 后上样,上样量为 15 μL,选择标准蛋白 Marker 分子质量 10~200 ku 作为参照。设置上层胶电压为 90 V,待样品进入分离胶中,将下层胶的电压增大为 120 V,直至溴酚蓝跑至底部时结束电泳。参照景思源<sup>[22]</sup>的方法配制考马斯亮蓝染色液及脱色液,对胶板进行处理,直至凝胶的条带清晰,在凝胶成像仪中观察并记录结果。

### 1.8 菌株 XJ-140 对玉米粉中 ZEN 的脱毒效果

取自然霉变玉米粉(ZEN 含量为(1 253.678±14.407) μg/kg)样品,灭菌后烘干。取 720 g 玉米粉样品(水分质量分数为 3.98%),充分混合后均等分成 24 份,设立对照组和处理组。分别以灭菌蒸馏水(对照组 1-CH 组)、灭菌 LB 培养液(对照组 2-CP 组)、粗酶液(处理组 1-EM 组)、菌株发酵液(处理组 2-EJ 组,5×10<sup>8</sup> CFU/mL)调节霉变玉米粉的水分质量分数分别为 30%,40%,50%,60%,70%和 80%。将各组样品置于 35 ℃培养箱好氧培养 24 h,之后在 105 ℃烘箱中干燥 30 min,根据玉米赤霉烯酮荧光定量检测盒说明书,提取玉米粉中的 ZEN,测定样品中 ZEN 含量,并计算 ZEN 降解率。

### 1.9 数据处理

试验数据以“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 26.0 进行数据的差异显著性分析(Tukey 检验), $P<0.05$  为差异显著。采用 Pearson 相关性分析法对菌株生长速率与 ZEN 降解率之间的相互关系进行分析。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZEN 降解菌株的筛选和鉴定

2.1.1 ZEN 降解菌株的筛选 对采集的发霉饲料和土壤样品进行筛选,初筛得到生长稳定、状况良好的菌株 14 株,其能在 ZEN 为唯一碳源的培养基中生长。复筛得到 8 株菌株,其能有效降解(ZEN 降解率>30%)培养基中的 ZEN,其中从发霉饲料中分离出的 XJ-140 脱毒效果最好,ZEN 降解率达到 92.19%(图 1)。因此,选择菌株 XJ-140 进行后续研究。

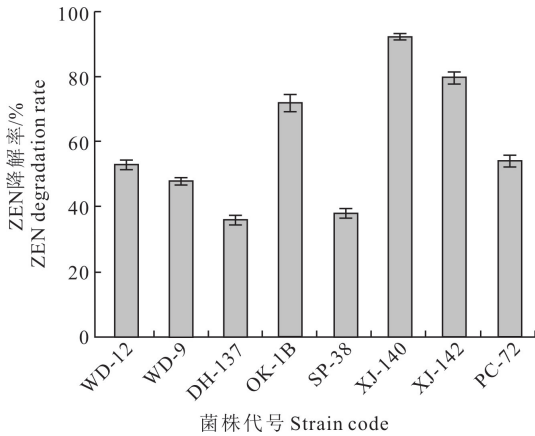
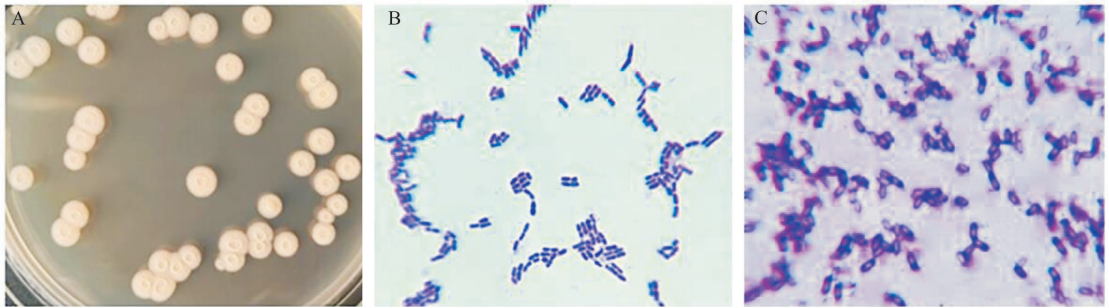


图 1 在 LB 培养基中不同菌株的 ZEN 降解率  
Fig. 1 ZEN degradation rates of different strains in LB medium

2.1.2 菌株 XJ-140 的鉴定 菌株 XJ-140 在 LB 平板上生长,菌落形状近似圆形,表面有褶皱,中间低凸起,边缘不规则,质地软、易挑起,菌落颜色呈不透明浅黄色(图 2-A)。革兰氏染色阳性,在显微镜下观察呈短杆状(图 2-B),产芽孢,芽孢椭圆形(图 2-C)。

对菌株 XJ-140 的 16S rDNA 基因序列进行扩增,测序结果为 1 487 bp。将序列(GenBank 登录号为 SUB13117527)在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析比对,结果显示,菌株 XJ-140 与解淀粉芽孢杆菌的 16S rDNA 基因序列相似度最高,达到 99.92%。基于供试菌的基因序列构建系统发育树,结果(图 3)显示,该菌株与解淀粉芽孢杆菌聚类成为一支,与其亲缘关系最近。因此,确定菌株 XJ-140 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。



A. 菌落形态;B. 革兰氏染色(10×100);C. 芽孢形态的革兰氏染色(10×100)。

A. Colony morphology;B. Gram stain(10×100);C. Gram staining of spore morphology(10×100).

图 2 菌株 XJ-140 的菌落形态和革兰氏染色结果

Fig. 2 Colony morphology and gram staining results of strain XJ-140

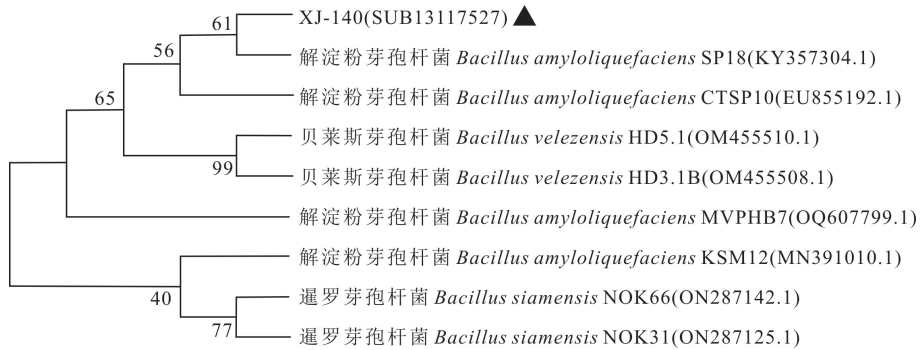


图 3 菌株 XJ-140 的 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain XJ-140 based on 16S rDNA gene sequences

## 2.2 菌株 XJ-140 降解 ZEN 的动力曲线

由图 4 可知,在培养 0~18 h 时,随着发酵时间的延长,菌株 XJ-140 发酵液的 ZEN 降解率呈上升趋势,总体上与该菌株的生长速率基本保持一致。在培养 18 h 时,菌株 XJ-140 的  $OD_{600\text{ nm}}$  值达到最大,为 1.835;在培养 18 h 之后,ZEN 降解率稳定在

90%以上,继续延长培养时间,ZEN 降解率也不会出现显著变化;在培养 24 h 时,ZEN 降解率最高,为 93.75%。Pearson 相关性分析结果证实,菌株 XJ-140 生长速率与 ZEN 降解率之间存在显著正相关( $r=0.981$ )。因此,菌株 XJ-140 的最佳培养时间为 24 h。

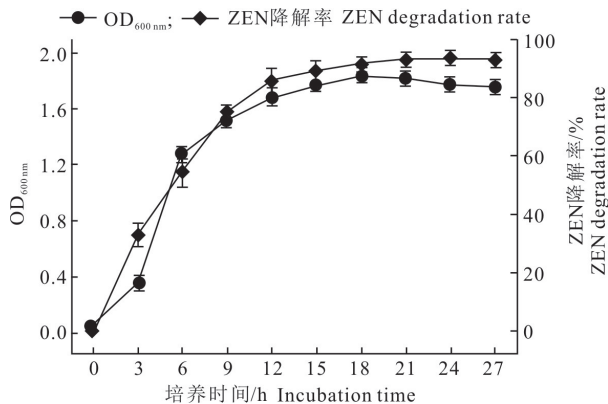


图 4 菌株 XJ-140 降解 ZEN 的动力曲线

Fig. 4 Kinetic curve of ZEN degradation by strain XJ-140

### 2.3 菌株 XJ-140 降解活性物质的定位及分析

由图 5 可以看出,菌株 XJ-140 的不同组分对 ZEN 的降解效果差异显著( $P < 0.05$ )。其中无细胞上清液的 ZEN 降解率最高,为 60.10%,显著高于

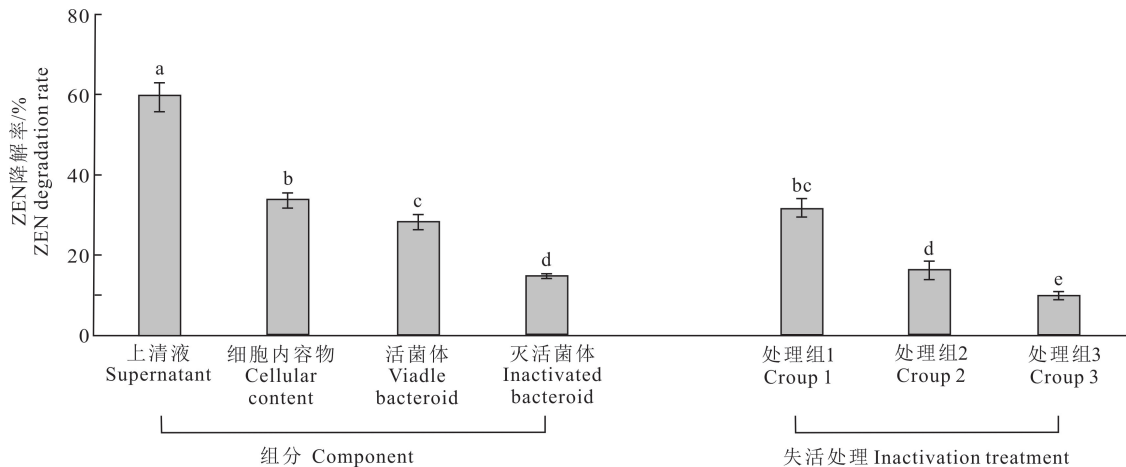


图 5 菌株 XJ-140 的不同组分及无细胞上清液经不同失活处理后对 ZEN 的降解率

Different lowercase letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

Group 1. Proteinase K; Group 2. Proteinase K+SDS; Group 3. 100 °C water bath.

图 5 菌株 XJ-140 的不同组分及无细胞上清液经不同失活处理后对 ZEN 的降解率

Fig. 5 Degradation rates of ZEN by different components of strain XJ-140 and cell-free supernatant after different inactivation treatments

### 2.4 菌株 XJ-140 降解酶粗提取条件的优化

硫酸铵沉淀法处理上清液的降解率结果见图 6。由图 6 可以看出,随着 AS 饱和度增大,菌株 XJ-140 粗酶液的 ZEN 降解率不断增加,当 AS 饱和度大于 60% 时 ZEN 降解率逐渐下降。因此,硫酸铵饱和度为 60% 是 ZEN 降解酶的最佳盐沉条件,此时粗酶液的 ZEN 降解率仅有 37.14%,酶活性回收率为 61.80%。推断原因,一是盐沉法中盐用量较大,导致降解酶容易失活;二是该方法未将降解酶完全析出。

细胞内容物的 ZEN 降解率(34.11%),说明降解 ZEN 的活性物质主要存在于胞外。此外,活菌体和灭活菌体的 ZEN 降解率分别为 28.69% 和 15.14%。由此可以推断,菌株 XJ-140 对 ZEN 最主要的清除作用是无细胞上清液,此外菌体细胞对 ZEN 也有一定程度的物理吸附作用。

由图 5 还可以看出,对菌株 XJ-140 的无细胞上清液进行不同的失活处理后,其对 ZEN 的降解效率均显著下降( $P < 0.05$ ),其中处理组 1、2 和 3 的 ZEN 降解率分别为 31.81%、16.65% 和 10.18%。由此说明,菌株 XJ-140 的无细胞上清液中存在某种酶类会降解 ZEN,蛋白酶 K 和沸水浴处理会破坏这种酶的结构,导致酶活力下降甚至失活,使得 ZEN 降解率随之下降,这与吴宗芮等<sup>[23]</sup>的研究结果相符。综上推断,菌株 XJ-140 对 ZEN 的降解活性物质为胞外降解酶。

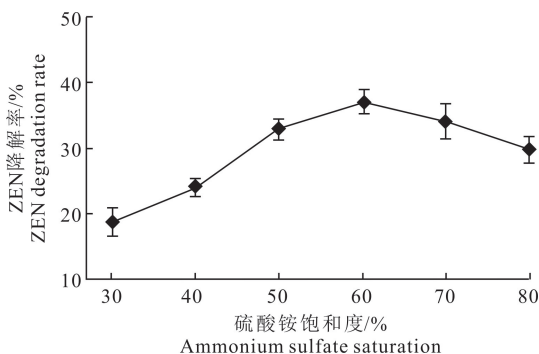


图 6 硫酸铵沉淀法处理上清液的降解率

Fig. 6 Degradation rates of treated supernatant by ammonium sulfate precipitation method

由图 7 可以看出,随着单宁质量浓度增加,单宁沉淀后的上清液对 ZEN 的降解率明显下降,当单宁质量浓度为 10 mg/mL 时上清液 ZEN 降解率为 10.43%,之后下降趋势缓慢,说明此时降解酶的沉淀最为完全。因此,选定最佳单宁沉淀质量浓度为 10 mg/mL。

由图 7 还可以看出,当聚乙二醇质量浓度为 10

mg/mL 时,解析出的上清液对 ZEN 降解率为 51.49%,酶活性回收率为 85.67%,解析出的酶活性较高;之后随聚乙二醇质量浓度增加,ZEN 降解率有下降趋势。因此,当单宁质量浓度为 10 mg/mL,聚乙二醇质量浓度为 10 mg/mL 时,采用单宁-聚乙二醇法解析出的降解酶活性较硫酸铵沉淀法更高。

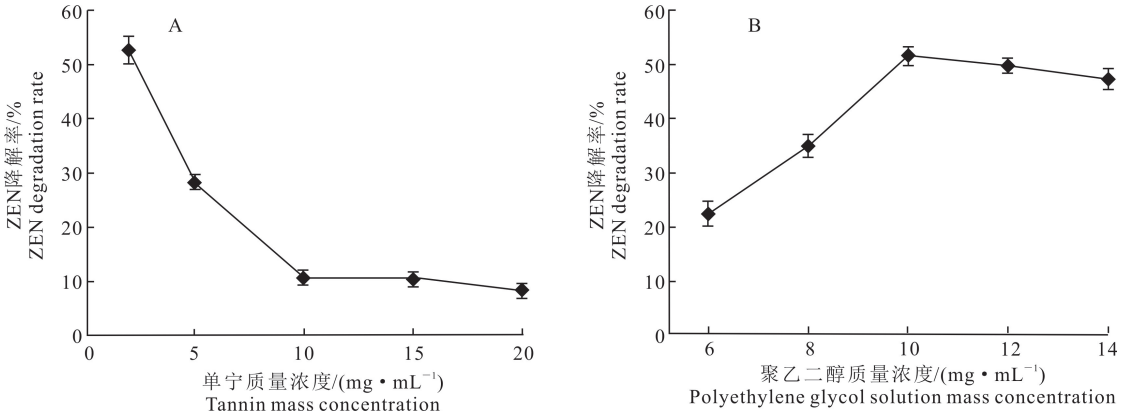
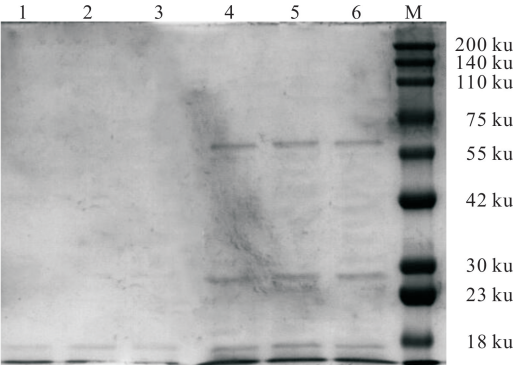


图 7 丹宁-聚乙二醇法处理上清液的降解率

Fig. 7 Degradation rates of treated supernatant by tannin-polyethylene glycol method

## 2.5 菌株 XJ-140 降解粗酶液的分子质量测定

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳测定丹宁-聚乙二醇法提取得到的粗酶液,结果如图 8 所示。



1,2,3 为丹宁沉淀后上清液,4,5,6 为聚乙二醇解析后的粗酶液。

M. 蛋白标志物。

1,2 and 3 are supernatants after tannin precipitation, and 4,5 and 6 are crude enzyme solutions after polyethylene glycol analysis.

M. Protein marker.

图 8 菌株 XJ-140 降解粗酶液的 SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳结果

Fig. 8 Results of SDS-PAGE gel protein electrophoresis of strain XJ-140 degrading crude enzyme solution

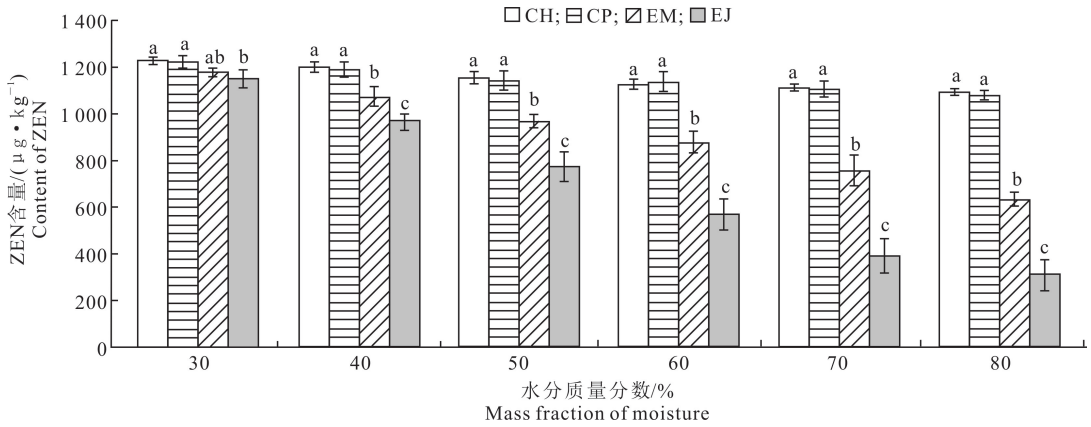
由图 8 可以看出,丹宁沉淀后上清液中除 18 ku 外无明显蛋白条带,丹宁-聚乙二醇法提取得到的粗

酶液中,存在 3 条明显的单一条带,各条带分子质量分别在 61, 28 和 18 ku,结合 2.4 节结果,初步认为目标活性蛋白的分子质量在 61 ku 或 28 ku。

## 2.6 菌株 XJ-140 对玉米粉中 ZEN 的脱毒效果

菌株 XJ-140 发酵液及粗酶液对霉变玉米粉脱毒效果的影响见图 9。由图 9 可知,水分质量分数在 30% 时,处理组 EM 的 ZEN 含量与对照组 CH、CP 差异不显著( $P > 0.05$ );处理组 EJ 的 ZEN 含量较对照组 CH、CP 显著降低( $P < 0.05$ ),但与处理组 EM 差异不显著( $P > 0.05$ )。随着水分质量分数增加至 40%,50%,60%,70% 和 80% 时,处理组 EM、EJ 的 ZEN 含量较两组对照组均显著降低( $P < 0.05$ ),此外处理组 EJ 的 ZEN 含量显著低于处理组 EM( $P < 0.05$ ),说明菌株发酵液在固体基质中对 ZEN 的清除效果更好。

菌株 XJ-140 发酵液及粗酶液对霉变玉米粉中 ZEN 降解率的影响见图 10。由图 10 可知,随着水分质量分数的增加,处理组 EM 和处理组 EJ 的 ZEN 降解率逐渐升高。处理组 EM 与处理组 EJ 均在水分质量分数为 80% 时,对 ZEN 的降解率达到最高,ZEN 降解率分别为 49.18% 和 74.71%。由此说明,菌株 XJ-140 粗酶液及发酵液在实际应用基质中具有一定的降解作用。



CH. 灭菌蒸馏水(对照组 1);CP. 灭菌 LB 培养液(对照组 2);EM. 粗酶液(处理组 1);EJ. 菌株发酵液(处理组 2), 下同。图柱上标不同小写字母表示相同水分质量分数下组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

CH. Sterilized distilled water (control group 1);CP. Sterilized LB culture medium (control group 2);EM. Crude enzyme solution (treatment group 1);EJ. Strain fermentation broth (treatment group 2), the same below.

Different lowercase letters indicate significant differences between groups at the same moisture mass fraction ( $P < 0.05$ ).

图 9 菌株 XJ-140 发酵液及粗酶液对霉变玉米粉脱毒效果的影响

Fig. 9 Effects of fermentation broth and crude enzyme solution of strain XJ-140 on detoxification of mold-contaminated cornmeal

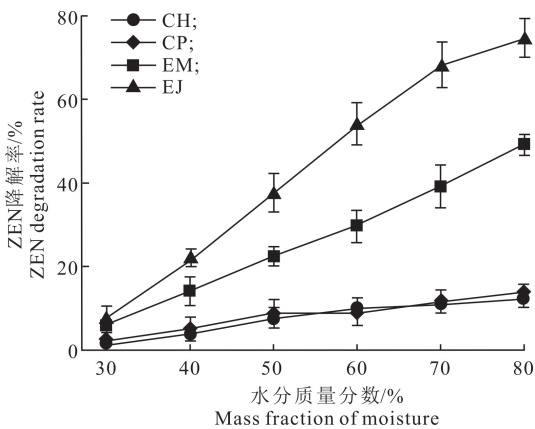


图 10 菌株 XJ-140 发酵液及粗酶液对霉变玉米粉中 ZEN 降解率的影响

Fig. 10 Effects of fermentation broth and crude enzyme solution of strain XJ-140 on the degradation rate of ZEN in mold-contaminated cornmeal

### 3 讨论

降解碳氢化合物的细菌以假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、芽孢杆菌属、鞘氨单胞菌属(*Sphingomonas* spp.)、放线菌属(*Actinomycetes* spp.)和克雷伯菌属(*Klebsiella* spp.)等为主,ZEN 是以碳氢化合物为基础的化学物质,因此这些菌属也被归类为可降解 ZEN 的解毒细菌<sup>[24]</sup>。芽孢杆菌属对 ZEN 的脱毒多以酶降解为主,菌体吸附为辅。目前有关 ZEN 降解的研究中,已被证实可降解 ZEN 的芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)<sup>[25]</sup>、解淀粉

芽孢杆菌<sup>[26]</sup>、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)<sup>[27]</sup>、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)<sup>[28]</sup>、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)<sup>[29]</sup>、沙福芽孢杆菌(*B. safensis*)<sup>[30]</sup>和蔬菜芽孢杆菌(*B. oleronius*)<sup>[12]</sup>等。GONZÁLEZ 等<sup>[3]</sup>评估了 11 种芽孢杆菌菌株对 ZEN 的降解能力,结果表明所有实验菌株均具有一定的 ZEN 降解能力,各菌株在 72 h 内对 ZEN 的降解率在 58%~96%,并指出 ZEN 内酯环的断裂可能是其主要降解机理。LEE 等<sup>[26]</sup>从霉变玉米样品中筛选获得了 1 株解淀粉芽孢杆菌,几乎完全去除了 LB 培养基中的 ZEN(3.5 µg/mL)。本试验从发霉饲料中筛选出了 1 株在培养 24 h 时对 ZEN 降解率可达 93.75% 的菌株 XJ-140,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌,与上述菌属的菌种相符,具有高效降解 ZEN 的能力。在该菌对 ZEN 降解动力学研究中发现,在培养 18 h 内,菌株 XJ-140 降解 ZEN 的能力与菌株的生长状态存在着显著关联,且与发酵时间呈正向线性关系。

为了确定解淀粉芽孢杆菌 XJ-140 对 ZEN 的脱毒方式,本试验对菌株 XJ-140 降解活性物质进行探究,结果表明,菌株 XJ-140 是通过分泌胞外降解酶降解 ZEN,且菌体细胞对 ZEN 有一定的吸附作用。以往研究表明,芽孢杆菌的吸附机制与乳酸杆菌相似,因为两者细胞壁特征相同,ZEN 主要被乳酸杆菌细胞壁的表面疏水性和碳水化合物成分吸附<sup>[31]</sup>。因此,菌株 XJ-140 对 ZEN 的吸附机理可能与此相同。杨凡等<sup>[25]</sup>用相同方法对枯草芽孢杆菌 ZJ-



2019-1 的活性物质进行定位,结果表明该菌株通过吸附和酶降解方式共同清除 ZEN,其中酶降解发挥主要作用,与本研究结果相符。

合适的微生物必须易于在饲料中使用,其解毒作用在复杂的环境如胃肠道或饲料预处理中必须足够高效<sup>[32]</sup>。在本研究中,使用自然霉变玉米粉(ZEN 含量为 1 253.678  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )作为底物,菌株 XJ-140 发酵液降解 ZEN 的能力达到 74.71%,粗酶液的降解能力次之,为 49.18%。毕可等<sup>[33]</sup>将植物乳杆菌菌粉与 ZEN 内酯水解酶 ZENC 联用,对麸皮发酵 48 h 后的 ZEN 降解率达到 53.4%。CHEN 等<sup>[34]</sup>用受 ZEN 污染的玉米(人为添加 ZEN 5 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )培养枯草芽孢杆菌 B2,其降解 ZEN 的能力达到 56%;但在液体培养基(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ZEN)中,菌株 B2 并不是 ZEN 解毒率最高的试验菌株,降解率仅有 35%。结合以上研究发现,细菌培养条件和饲料原料发酵过程之间的筛选结果存在差异,因此在以预处理 ZEN 污染饲料筛选目标微生物时,必须考虑细菌培养条件和饲料原料发酵过程的影响。在本研究基础上,后续将进一步研究 XJ-140 菌株降解 ZEN 的具体机制,并应用转录组学挖掘其降解酶的相关功能基因。

## 4 结 论

本研究从霉变饲料中分离筛选出 1 株安全高效的 ZEN 降解菌株——解淀粉芽孢杆菌 XJ-140。该菌株通过吸附和酶降解共同作用对 ZEN 进行清除,其中主要降解成分为胞外降解酶。对比探究 AS 沉淀法和单宁-聚乙二醇法对粗酶液的提取效果后发现,后者提取效果更优,并初步推断出目标活性蛋白的分子质量在 61 ku 或 28 ku。将菌株及其粗酶液应用于 ZEN 自然污染的玉米粉中,证实了均具有良好的解毒能力。

## 【参考文献】

[1] YANG D,JIANG X,SUN J. Toxic effects of zearalenone on gametogenesis and embryonic development: a molecular point of review [J]. Food and Chemical Toxicology,2018,119(1):24-30.

[2] 符浩东,张晨曦,李奕霏,等.玉米赤霉烯酮降解酶基因 zlhy-6 在枯草芽孢杆菌中的表达 [J].核农学报,2022,36(5):885-894.

FU H D,ZHANG C X,LI Y F,et al. Expression of zearalenone degrading enzyme gene zlhy-6 in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Nuclear Agriculture,2022,36(5):885-894.

[3] GONZÁLEZ PEREYRA M L,DI GIACOMO A L,LARA A L, et al. Aflatoxin-degrading *Bacillus* sp. strains degrade

zearalenone and produce proteases, amylases and cellulases of agro-industrial interest [J]. Toxicon,2020,180(6):43-48.

[4] 黄志伟,刘利晓,李洪波,等.2016—2018 年 12 种植物性饲料原料中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素污染调查分析 [J].粮食与饲料工业,2020(2):48-51.

HUANG Z W,LIU L X,LI H B,et al. Investigation and analysis of zearalenone and vomitoxin contamination in 12 plant-based feed ingredients from 2016—2018 [J]. Grain and Feed Industry,2020(2):48-51.

[5] 张勇,杨玉林,齐莎日娜,等.2021 年国内饲料和饲料原料中霉菌毒素污染状况调查 [J].饲料工业,2022,43(15):55-58.

ZHANG Y,YANG Y L,QI S R N,et al. Survey on mycotoxin contamination in domestic feed and feed ingredients in 2021 [J]. Feed Industry,2022,43(15):55-58.

[6] MURTAZA B,LI X Y,DONG L M,et al. Microbial and enzymatic battle with food contaminant zearalenone(ZEN) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4353-4365.

[7] 刘晓萌,张云鹏,仇磊,等.3 株降解玉米赤霉烯酮芽孢杆菌的快速鉴定 [J].中国粮油学报,2022,37(9):34-39.

LIU X M,ZHANG Y P,ZHANG L,et al. Rapid identification of three strains of zearalenone-degrading *Bacillus* [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils,2022,37(9):34-39.

[8] VEGA M F,DIEGUEZ S N,RICCIO B,et al. Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. Braz [J]. Journal of Hazardous Materials,2017,48(4):715-723.

[9] KRIFATON C,KRISZT B,RISA A,et al. Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes [J]. Journal of Hazardous Materials,2013,245(15):429-435.

[10] 郑文秀,赵倩如,江凌,等.酪丁酸梭菌清除饲料中玉米赤霉烯酮的能力 [J].生物加工过程,2019,17(5):490-496.

ZHENG W X,ZHAO Q R,JIANG L,et al. Ability of *Clostridium tybutyricum* to remove zearalenone from feed [J]. Bioprocessing,2019,17(5):490-496.

[11] WANG Y,ZHAO C X,ZHANG D D,et al. Microbial degradation of zearalenone by a novel microbial consortium,NZDC-6,and its application on contaminated corncob by semisolid fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2020,68(6):1634-1644.

[12] 文钧,熊东炜,龙森.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、培养条件优化及降解酶挖掘 [J/OL].动物营养学报:1-11[2023-09-26].  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5461.S.20230907.1321.015.html>.

WEN J,XIONG D W,LONG M. Screening of zearalenone-degrading bacteria,optimization of culture conditions and mining of degrading enzymes [J/OL]. Journal of Animal Nutrition:1-11[2023-09-26].  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5461.S.20230907.1321.015.html>.

[13] TAKAHASHI N,OHSATO S,SHIBATA T,et al. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea* [J]. Applied

- and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3239-3245.
- [14] ZHANG Z X, XU W, WU H, et al. Identification of a potent enzyme for the detoxification of zearalenone [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 8(1): 376-383.
- [15] WANG N, WU W W, PAN J W, et al. Detoxification strategies for zearalenone using microorganisms: a review [J]. Microorganisms, 2019, 7(7): 208.
- [16] YU Y, WU H, TANG Y, et al. Cloning, expression of a peroxidase gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification [J]. Microbiological Research, 2012, 167(3): 121-126.
- [17] AZAM M S, YU D Z, LIU N, et al. Degrading ochratoxin A and zearalenone mycotoxins using a multifunctional recombinant enzyme [J]. Toxins, 2019, 11(5): 301.
- [18] PRINGELS L, BROECKX V, BOONEN, et al. Abundant plasma protein depletion using ammonium sulfate precipitation and protein A affinity chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1089: 43-59.
- [19] 刘晨, 谢岩黎, 曹荣耀, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及降解酶初步提取 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 73-79.
- LIU C, XIE Y L, CAO R Y, et al. Screening and characterization of zearalenone-degrading bacteria and preliminary extraction of degrading enzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 73-79.
- [20] NASCIMENTO J M D, LEÃO T E H, NASCIMENTO T P, et al. Evaluation of the influence of temperature on the protein-tannic acid complex [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182(3): 2056-2065.
- [21] 曲丽丽. 海洋黑曲霉固态发酵耐盐纤维素酶的培养条件优化及粗酶制剂的制备 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- QU L L. Optimization of culture conditions and preparation of crude enzyme preparation of salt-tolerant cellulase from solid-state fermentation of *Aspergillus niger* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [22] 景思源. 玉米赤霉烯酮降解菌株的筛选及其降解效果研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- JING S Y. Screening and degradation effect study of zearalenone-degrading bacteria [D]. Changchun: Jilin University, 2021.
- [23] 吴宗芮, 丁轲, 余祖华, 等. 降解玉米赤霉烯酮菌株的筛选、降解机制及特性研究 [J]. 中国粮油学报, 2022, 37(9): 27-33.
- WU Z R, DING K, YU Z H, et al. Screening, degradation mechanism and characterization of zearalenone-degrading bacteria [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2022, 37(9): 27-33.
- [24] IMADE F N, HUMZA M, DADA O A, et al. Isolation and characterization of novel soil bacterium, *Klebsiella pneumoniae* strain GS7-1 for the degradation of zearalenone in major cereals [J]. Food Control, 2023, 143: 109287.
- [25] 杨凡, 张俊楠, 王金全, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选与鉴定 [J]. 中国粮油学报, 2020, 35(7): 104-108, 116.
- YANG F, ZHANG J N, WANG J Q, et al. Screening and characterization of zearalenone-degrading bacteria [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2020, 35(7): 104-108, 116.
- [26] LEE A, CHENG K C, LIU J R. Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential [J]. PLoS One, 2017, 12(8): 0182220.
- [27] 田玉虎, 李凤华. 霉菌毒素降解菌株和吸附剂的体外效果评估和筛选 [J]. 饲料研究, 2020, 43(5): 61-64.
- TIAN Y H, LI F H. *In vitro* evaluation and screening of mycotoxin-degrading strains and adsorbents [J]. Feed Research, 2020, 43(5): 61-64.
- [28] 曹艳子, 王效禹, 顾艳丽, 等. 贝莱斯芽孢杆菌生物学特性及体外降解霉菌毒素研究 [J/OL]. 饲料工业: 1-13[2023-10-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1169.S.20230821.1145.011.html>.
- CAO Y Z, WANG X Y, GU Y L, et al. Studies on the biological properties and *in vitro* degradation of mycotoxins by *Bacillus cereus* [J/OL]. Feed Industry: 1-13[2023-10-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1169.S.20230821.1145.011.html>.
- [29] 石楠, 张桂杰. 不同蜡样芽孢杆菌对玉米籽粒中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮和呕吐毒素脱毒效果及营养成分评价 [J]. 饲料工业, 2022, 43(23): 38-43.
- SHI N, ZHANG G J. Evaluation of the detoxification effect of different *Bacillus cereus* on aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and vomitoxin in maize seeds and their nutritional composition [J]. Feed Industry, 2022, 43(23): 38-43.
- [30] 赵程程, 孙长坡, 孙晶, 等. 一株新型降解玉米赤霉烯酮的沙福芽孢杆菌及其关键酶分析 [J/OL]. 食品科学: 1-11[2023-10-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230316.1228.014.html>.
- ZHAO C C, SUN C P, SUN J, et al. Analysis of a novel strain of *Bacillus cereus* degrading zearalenone and its key enzymes [J/OL]. Food Science: 1-11[2023-10-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230316.1228.014.html>.
- [31] EI-NEZAMI H, POLYCHRONAKI N, LEE Y K, et al. Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(14): 4577-4581.
- [32] YANG X, LI F, NING H, et al. Screening of pig-derived zearalenone-degrading bacteria through the zearalenone challenge model, and their degradation characteristics [J]. Toxins, 2022, 14(3): 224.
- [33] 毕可, 马成, 王文博, 等. 重组玉米赤霉烯酮酶 ZENC 降解麸皮毒素的条件优化 [J]. 中国饲料, 2019(5): 90-93.
- BI K, MA C, WANG W B, et al. Optimization of conditions for gluten toxin degradation by recombinant zearalenone enzyme ZENC [J]. China Feed, 2019(5): 90-93.
- [34] CHEN S W, WANG H T, SHIH W Y, et al. Application of zearalenone (ZEN)-detoxifying *Bacillus* in animal feed decontamination through fermentation [J]. Toxins, 2019, 11(6): 330.