

研究报告

玉米赤霉烯酮脱毒菌 PA26-7 的分离鉴定及其应用效果评价

邓凤如^{#1,2,3}, 陈嘉杭^{#1,2,3}, 贾淑卉^{1,2,3}, 姚楚莹^{1,2,3}, 李容洁^{1,2,3}, 邓诣群^{1,2,3}, 文继开^{*1,2,3}

1 华南农业大学生命科学学院 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642

2 华南农业大学岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642

3 华南农业大学农业农村部人畜共患病重点实验室, 广东 广州 510642

邓凤如, 陈嘉杭, 贾淑卉, 姚楚莹, 李容洁, 邓诣群, 文继开. 玉米赤霉烯酮脱毒菌 PA26-7 的分离鉴定及其应用效果评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3404-3416.

DENG Fengru, CHEN Jiahang, JIA Shuhui, YAO Chuying, LI Rongjie, DENG Yiqun, WEN Jikai. Screening and performance evaluation of a zearalenone-degrading bacterial isolate PA26-7[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3404-3416.

摘要: 【背景】玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是广泛污染粮谷类作物的一种雌激素类真菌毒素, 不仅给农业经济带来巨大损失, 还能通过食物链对人和动物健康造成危害。【目的】从微生物生态制剂中筛选获得能够高效降解玉米赤霉烯酮的菌株, 优化其脱毒条件, 测定其在饲料中的实际脱毒效果及对饲料中植酸、维生素含量变化的影响。【方法】从微生物生态制剂中分离出玉米赤霉烯酮降解菌, 通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)测定菌株降解玉米赤霉烯酮产物的细胞毒性和雌激素活性, 通过高效液相色谱法测定分离株在培养基和饲料中的解毒效果, 以及分离株在霉变的豆粕、麸皮和成品饲料中固态发酵前后维生素的含量变化, 通过三氯化铁比色法测定饲料脱毒前后植酸的含量变化。【结果】从微生物生态制剂中筛选出一株通过分泌胞外酶高效降解玉米赤霉烯酮的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) PA26-7, 该菌株在培养基起始 pH 4.0–8.0、培养温度 25–60 °C 条件下均可降解玉米赤霉烯酮, 产物的细胞毒性和雌激素活性均较 ZEN 弱。PA26-7 经固态发酵 72 h 后, 饲料原料(豆粕和麸皮)及霉变的成品鸡饲料中玉米赤霉烯酮含量下降 66.2%–96.8%, 植酸含量下降 8.40%–32.26%, 维生素 B₂、维生素 C 和叶酸的含量显著提高。【结论】*B. velezensis* PA26-7 可作为饲料中玉米赤霉烯酮的生物脱毒菌株, 其固态发酵有效清除了饲料中的植酸, 并产生了多种维生素, 有利于改善饲料的营养结构。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 贝莱斯芽孢杆菌; 饲料脱毒; 植酸; 维生素

资助项目: 广东省自然科学基金(2022A1515012291); 广东省教育厅重大基础科研项目(2018KZDXM015)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515012291) and the Major Basic Research Project of Department of Education of Guangdong Province (2018KZDXM015).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: jkwen@scau.edu.cn

Received: 2022-10-31; Accepted: 2023-01-05; Published online: 2023-02-14

Screening and performance evaluation of a zearalenone-degrading bacterial isolate PA26-7

DENG Fengru^{#1,2,3}, CHEN Jiahang^{#1,2,3}, JIA Shuhui^{1,2,3}, YAO Chuying^{1,2,3}, LI Rongjie^{1,2,3}, DENG Yiqun^{1,2,3}, WEN Jikai^{*1,2,3}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: [Background] Zearalenone (ZEN) is non-steroidal estrogenic mycotoxin contaminating a variety of grain crops. ZEN can cause serious health problems in livestock and humans through the food chain, leading to great economic losses in the food industry and livestock farming. [Objective] To optimize the conditions for ZEN degradation and evaluate the degradation performance of a ZEN-degrading bacterial strain isolated from microecological preparations, and then study the influence of the strain on the content of phytic acid and vitamins in feed. [Methods] A ZEN-degrading bacterial strain was isolated from microecological preparations. The cytotoxicity and estrogenic activity of ZEN-degrading products were determined by Cell Counting Kit-8 (CCK-8). The phytic acid content in feed before and after detoxification was determined by ferric chloride colorimetry. HPLC was employed to determine the detoxification effect of the isolate in culture medium and feed and the vitamin content in feed before and after solid state fermentation. [Results] One bacterial isolate, *Bacillus velezensis* PA26-7, was obtained from microecological preparations, which efficiently degraded ZEN by secreting extracellular enzymes. PA26-7 degraded ZEN at the initial pH 4.0–8.0 and the incubation temperature of 25–60 °C. The cytotoxicity and estrogenic activity of the degradation products were weaker than those of ZEN. The solid state fermentation with PA26-7 for 72 h decreased the content of ZEN by 66.2%–96.8%, decreased the content of phytic acid by 8.40%–32.26%, and increased the content of vitamin B₂, vitamin C, and folic acid in the feed samples including soybean meal, bran, and moldy finished feed for chicken. [Conclusion] *B. velezensis* PA26-7 can be used as a biodegradation strain for ZEN in feed. The solid-state fermentation with *B. velezensis* PA26-7 can effectively remove phytic acid in the feed and produce a variety of vitamins, which is conducive to improving the nutritional structure of feed.

Keywords: zearalenone; *Bacillus velezensis*; feed detoxification; phytic acid; vitamin

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是由镰孢属真菌产生的一种非甾体类雌激素真菌毒素(non-steroidal estrogenic mycotoxin), 多见于发霉的玉米、小麦等谷物中, 具有肝毒性、高雌

激素性、致癌致畸性等^[1]。ZEN 可溶于碱性溶液和各种有机溶剂, 其熔点达 164–165 °C^[2]。从农作物的种植到收获、运输、储存、碾磨加工, 甚至高温烹饪等过程中 ZEN 均可保持稳定^[1]。

因此,如何有效地清除 ZEN 成为目前饲料行业亟待解决的问题。

截至目前,许多策略已被开发用于谷物和饲料中 ZEN 的清除,包括物理法^[3]、化学法^[4]和生物法^[5]。生物脱毒法因其靶向性好、降解率高、不引发二次污染等优点,已被证明是 ZEN 脱毒的最佳方法^[5-7]。多种微生物具有降解 ZEN 的能力,如贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) A2 在培养 72 h 后可降解 7.45 $\mu\text{g/mL}$ 的 ZEN,减弱 ZEN 诱导的小鼠肾损伤作用^[5];黑曲霉(*Aspergillus niger*) ZEN-S-FS10 在孢子浓度为 10^4 CFU/mL 并培养 28 h 时对 1 $\mu\text{g/mL}$ ZEN 的降解率稳定在 95%以上^[8];粉红粘帚霉(*Gliocladium roseum*) 可分泌内酯降解酶(ZEN-degrading lactonase, ZENG)高效降解 ZEN^[9]。然而 ZEN 的减少并不意味着脱毒,ZEN 有可能被代谢为 α -玉米赤霉烯醇(α -zearalenol, α -ZAL)、 α -玉米赤霉醇(α -zearalanol, α -ZEL)等其他雌激素活性更强的产物,反而对哺乳动物造成更严重的威胁^[10]。为确保微生物对 ZEN 的脱毒作用,常通过人乳腺癌 MCF-7 细胞体外增殖法(简称 E-screen 法)进行产物雌激素活性的体外评估^[11-12]。

B. velezensis 是一类在自然界水体、土壤、空气中广泛分布的芽孢杆菌,可分泌蛋白酶、纤维素酶等多种活性成分,在动物病害防控、动物饲料、食品加工应用、水产养殖等方面发挥重要作用^[13]。通过有益微生物发酵可产生 VB₁、VB₂、VB₆ 等促生长因子^[14-16],消除植酸等抗营养因子^[17],提高饲料利用率从而促进畜禽生长^[6]。植物性饲料原料中普遍存在植酸(phytic acid),可螯合磷离子等金属离子形成不溶性化合物。在豆粕和麸皮中,分别有 60%–90%、74.7%–90.8%的有机磷以植酸磷的形式存在^[18]。高浓度植酸磷的存在不仅导致单胃动物出现厌食、生长迟缓等症状,未被消化吸收的植酸磷

还会进一步造成环境中的磷污染^[19-20]。许多家禽饲料通过外源添加微生物植酸酶使植酸盐去磷酸化^[21-22]。

目前对于 ZEN 生物脱毒的研究仍存在一些问題,尽管大量具有降解 ZEN 能力的微生物已被报道,但这些研究成果大都停留在实验室研究阶段,未能有效地投入实际的脱毒应用中^[23]。已报道的降解菌也存在一些不足,例如部分菌株的生长条件由于特殊难于推广应用^[24]、降解效率不高从而不足以满足饲料行业生产需要^[5,8,25]、产物雌激素活性不减反增带来安全隐患^[10,26]等,涉及饲料脱毒的研究也多局限于脱毒菌在清除饲料中的 ZEN 后对小鼠等靶动物的毒理变化,而鲜有文章报道脱毒菌在实现生物脱毒的同时是否对饲料营养成分造成影响^[5,27-28]。因此本研究从微生态制剂产品出发,通过 HPLC 法筛选可高效降解 ZEN 的菌株,通过 E-screen 法检测其降解产物有无雌激素活性,对脱毒菌进行全基因组测序、活性成分分析和脱毒条件优化,并研究其发酵后对饲料中抗营养因子和促生长因子的影响,为脱毒菌的应用服务。

1 材料与方 法

1.1 材 料

自 2018–2020 年从全国多省市购入微生态制剂共计 72 份,其中兽用 39 份、水产用 18 份、植物用 15 份。

玉米赤霉烯酮,中科瑞华(广州)生物工程有限公司;豆粕,厦门麦德旺农副产品有限公司;麸皮,徐州华升食品科技有限公司;鸡饲料,石家庄正大饲料有限公司;植酸、维生素及引物合成,生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA 抽提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;乙腈,上海安谱实验科技股份有限公司;三氯乙酸,上海麦克林生物科技有限公司;血

清、DMEM 培养基, 武汉塞维尔生物科技有限公司; 无酚红高糖 DMEM 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 活性炭处理胎牛血清, Sigma 公司; CCK-8 试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司。LB 肉汤培养基、BHI 肉汤培养基、TSB 肉汤培养基, 青岛海博生物有限公司; MSM 培养基(g/L): Na_2HPO_4 2.44, KH_2PO_4 1.52, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07; 去雌激素细胞培养液: 无酚红高糖 DMEM 培养基与活性炭处理胎牛血清按 9:1 比例配制。

生化培养箱, Memmert 公司; 台式恒温振荡器: 太仓市实验设备厂; 多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; pH 计, 赛多利斯科学仪器有限公司; 二氧化碳培养箱, Thermo 公司; 超声波细胞破碎仪, 舜玛仪器设备有限公司; 高效液相色谱联用质谱仪, Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 ZEN 降解菌的分离筛选、纯化与全基因组测序

参考文献[29]的方法制备微生态制剂产品菌液。将产品菌液按 1:100 接种至 ZEN 终浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 LB 培养基中, 37°C 、 180 r/min 培养 48 h 后测定培养基中残留 ZEN 浓度。经检测有降解效果的产品菌液接种到以 ZEN 为唯一碳源的 MSM 培养基中重复富集、驯化, 涂布平板, 挑单菌落进行复筛。将有降解效果的菌液在 LB 琼脂平板上划线, 37°C 培养过夜, 平板上生长的单菌落即为纯化的降解菌。

用 DNA 抽提试剂盒提取降解菌基因组 DNA, 委托北京赛默百合生物科技有限公司利用 Illumina NovaSeq 6000 平台完成基因组测序, 测序模式以 150 bp paired-end 进行。对原始测序数据使用 FastQC 进行碱基质量统计, 使用 Trimmomatic 对序列进行修剪和去除接头序列, 使用 Edena 进行基因组拼接, 通过 PubMLST

的 Identify species 功能鉴定降解菌的种属。

1.2.2 ZEN 的 HPLC 检测及降解率计算

发酵液的检测: 发酵液加入等体积的甲醇, 充分振荡混匀, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 取上清液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后 HPLC 检测 ZEN 含量, 同时设置未接种细菌的培养基或饲料作为对照。HPLC 具体检测条件: 安捷伦色谱柱 (ZorbaxSB-C18, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 进样量 $20 \mu\text{L}$; 流动相: 乙腈/水=40/60 (体积比); 流速 0.6 mL/min ; 柱温 30°C ; 检测器 HPLC-DAD; 检测波长 274 nm ; 等度洗脱 20 min。

ZEN 降解率(%)=

$$\frac{\text{空白对照组含量} - \text{样品残留量}}{\text{空白对照组含量}} \times 100。$$

ZEN 标准曲线的建立: 设置 ZEN 浓度为 0、5、10、15、20、25、 $30 \mu\text{g/mL}$, 按上述方法进行检测。以 ZEN 浓度为横坐标, 以测得的峰面积为纵坐标, 建立本法检测 ZEN 的标准曲线。

1.2.3 细胞毒性和雌激素活性的测定

以人肝癌细胞 HepG2 细胞测定菌株降解 ZEN 产物的细胞毒性^[30], 具体操作: HepG2 细胞从液氮罐中取出复苏, 传代至细胞生长状态良好, 用 0.25%胰酶-EDTA 消化成单个细胞。调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 96 孔板中每孔接种 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 待细胞贴壁后设置每孔为 ZEN 终浓度为 10、20、 $30 \mu\text{g/mL}$ 及对应浓度下的降解产物。于 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后每孔加 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 37°C 孵育适当时间后测定每孔的 $OD_{450\text{nm}}$, 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率(%)=} \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性}}}{OD_{\text{阴性}} - OD_{\text{空白}}} \times 100。$$

以人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞测定菌株降解 ZEN 产物的雌激素活性^[11-12], 具体操作: MCF-7 细胞自液氮罐中取出复苏, 传代至细胞生长状态良好, 用 0.25%胰酶-EDTA 消化成单个细胞。

调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL, 96 孔板中每孔接种 100 μ L 细胞悬液, 待细胞贴壁后更换培养基为去雌激素细胞培养液, 并添加 10 μ L 各浓度 ZEN (10、20、30 μ g/mL) 及对应浓度下的降解产物。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 48 h 后每孔加 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育适当时间后测定每孔的 $OD_{450 \text{ nm}}$, 计算细胞增殖率。

1.2.4 脱毒菌脱毒条件的优化

为了获得降解菌对 ZEN 的最佳脱毒条件, 检测了降解菌在不同条件下对 ZEN 的降解率。选取的参数分别为: 培养基(TSB、LB、BHI); pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0); 培养温度(25、30、37、42、50、60 $^{\circ}$ C); 接种比例(1%、2%、3%、4%、5%)。以其中一个参数为变量, 其余参数为定量进行研究。

1.2.5 脱毒菌活性成分分析

取 10 mL 脱毒菌培养 24 h 后的发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 分离菌体和上清液, 取 2 mL 上清液加蛋白酶 K 处理(2 mg/mL, 58 $^{\circ}$ C 2 h)后保存备用, 2 mL 上清液加热处理(100 $^{\circ}$ C 30 min)后保存备用。取 2 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 菌体用 PBS 洗净并重悬, 制得菌体悬液。另取 2 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 菌体用 PBS 洗净并重悬后用超声仪破碎(400 W, 工作 10 s, 间歇 10 s, 共 1 h), 破碎后 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为菌体内含物。分别调整上清液、菌体悬液、菌体内含物、蛋白酶 K 处理的上清液、加热处理的上清液中 ZEN 浓度为 10 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后测定 ZEN 降解率。

1.2.6 菌株 PA26-7 在饲料中的脱毒效果

将脱毒菌按料水比(饲料质量:发酵液体积) 2:1 接种至 ZEN 污染的饲料原料(豆粕、麸皮)和成品鸡饲料中, 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。以未接种脱毒菌的污染饲料作为对照, 分别取 1 g 脱毒前后

的饲料及原料样品, 加入 5 倍体积的 80%乙腈水溶液, 超声 30 min 充分浸提 ZEN 后 12 000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液, N_2 吹干, 加 200 μ L 甲醇复溶, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后按 1.2.2 中的方法进行测定。

1.2.7 植酸含量测定

参考国标 GB 5009.153—2016 测定植酸的含量^[31]。分别称取 1 g 脱毒前后的豆粕和麸皮, 加入 8 mL 1.2% HCl-10% Na_2SO_4 振荡提取 2 h, 5 000 r/min 离心 30 min, 将上清液定容至 10 mL。取 500 μ L 提取液, 加入 500 μ L 15% TCA 振荡混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 后 5 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.75 mol/L NaOH 调节 pH 值为 6.0–6.5, 加水定容至 2 mL。取 400 μ L 稀释液加 200 μ L 0.3% 磺基水杨酸-0.03% FeCl_3 溶液, 充分混匀后测定其在 500 nm 处的吸光值。植酸含量的计算公式为:

$$X = \frac{m_2 \times 2 \times 1000}{m_1 \times 0.4 \times V \times 1000} \times 10$$

式中: X 为样品中植酸含量(mg/g); m_1 为供测样品的质量(g); m_2 为 0.4 mL 稀释液中植酸的质量(mg); 2 为稀释液定容体积(mL); 0.4 为供测稀释液的体积(mL); V 为供稀释的提取液体积(mL); 10 为提取液定容体积(mL)。

1.2.8 维生素的含量测定

分别称取 1 g 脱毒前后的饲料, 加入 5 mL 水, 超声提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μ L 上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 HPLC 检测。HPLC 具体检测条件为: 安捷伦色谱柱(C18, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 进样量 20 μ L; 流动相 A 为 0.05 mol/L KH_2PO_4 (以三乙胺调至 pH 6.0), 流动相 B 为甲醇; 流速 0.8 mL/min; 柱温室温, 检测器 HPLC-DAD; 检测波长 268 nm。洗脱程序: 流动相 A 在 0–8 min 从 90%递减至 80%, 8–13 min 从 80%递减至

40%, 13–16 min 从 40% 递增至 90%, 随后保持流动相比例 6 min, 流动相流速为 0.8 mL/min。

2 结果与分析

2.1 脱毒菌的分离、筛选、纯化与鉴定

从 72 份微生态制剂产品筛选出 1 份对 ZEN 具有降解效果的产品 PA26 (图 1A、1B)。通过对 PA26 产品中的 ZEN 降解菌的富集、驯化, 涂布平板后挑选出 8 个单菌落, 分别命名为 PA26-1–PA26-8, 8 个单菌落在含 ZEN 的培养基中都对 ZEN 有不同程度的降解效果(图 1C–1J)。

2.2 不同单菌落在培养基中的降解作用

经过 48 h 的发酵, PA26-1–PA26-8 均对

ZEN 具有较好的降解效果, 可降解培养基中 65.9%–86.3% 的 ZEN (图 2)。其中 PA26-7 清除 ZEN 的效果最显著, ZEN 降解率达 86.3%, 因此选择 PA26-7 进行后续研究。经鉴定, PA26-7 是一株 *B. velezensis* (已保藏至广东省微生物菌种保藏中心, 编号为 GDMCC 62926; 基因组已上传至 GenBank, 登录号为 JAPCIJ000000000)。

2.3 降解产物细胞毒性和雌激素活性的测定

与对照组相比, PA26-7 发酵后不同浓度 ZEN 的降解产物处理的 HepG2 细胞增殖率都显著升高, 即 PA26-7 发酵有效降低了 ZEN 的细胞毒性。PA26-7 发酵后, 降解产物显著抑制了 MCF-7 细胞的增殖, 即降解产物的雌激素活性

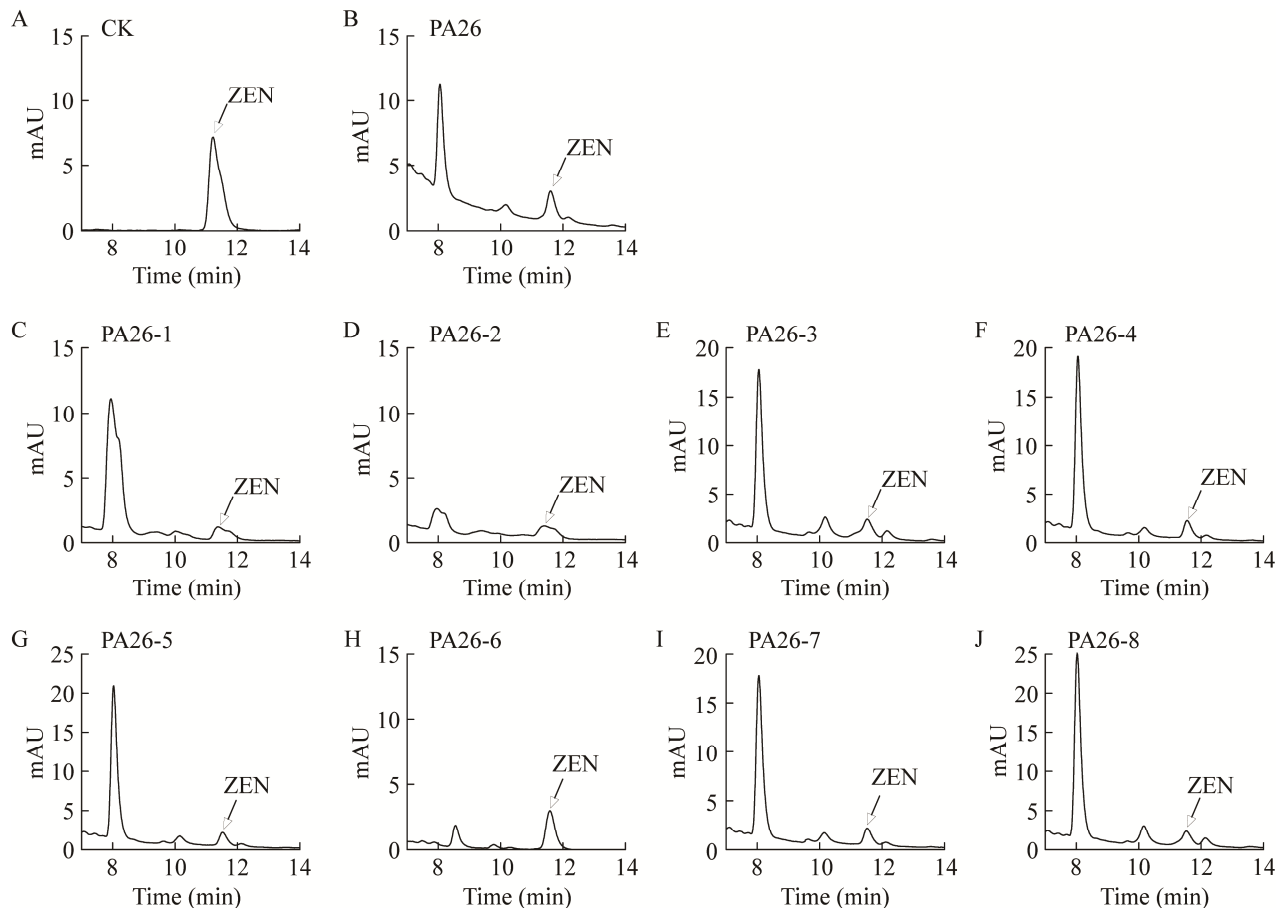


图 1 降解 ZEN 的菌株筛选

Figure 1 Screening of zearalenone-degrading bacterial isolate.

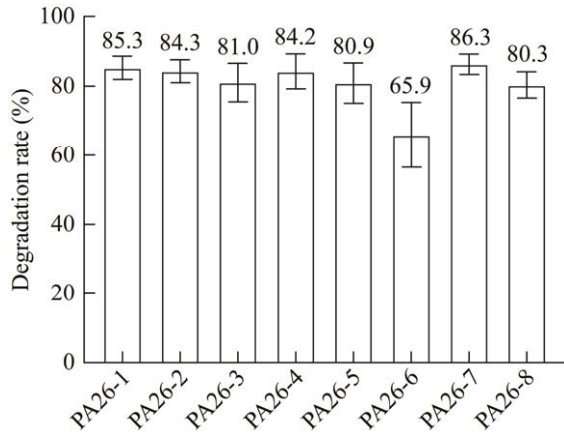


图2 八个单菌落对 ZEN 的降解效果

Figure 2 Degradation of ZEN by eight single bacterial colonies.

得到减弱。然而随着 ZEN 浓度的提高, 48 h 的发酵时间不足以使 PA26-7 完全降解 ZEN, 此时发酵液中存在部分降解产物与未被降解的 ZEN, 因此 PA26-7 降解高浓度 ZEN 后的物质在处理两种细胞时仍表现出部分细胞毒性和雌激素活性(图 3)。

2.4 脱毒条件的优化

通过控制单一变量的方法对 PA26-7 脱毒

的条件进行优化。PA26-7 在 LB 培养基中降解率较高, 达 86.7% (图 4A), 因此选择 LB 培养基进行后续的条件优化。在培养基起始 pH 值为 6.0 时具有最强的解毒能力, 可清除培养基中 90.7% 的 ZEN (图 4B)。PA26-7 脱毒的温度范围较广, 在 25–60 °C 范围对 ZEN 表现了不同程度的清除能力, 在 37 °C 时能清除培养基中 91.5% 以上的 ZEN (图 4C)。当 PA26-7 按 3% 的接种量接种至培养基中时, 对培养基中 ZEN 的脱毒效果最强, 可完全清除培养基中 5 μg/mL 的 ZEN, 对 10 μg/mL 的 ZEN 清除率达 94.7% (图 4D、4E)。

2.5 活性成分分析

当与 10 μg/mL 的 ZEN 共同孵育 48 h 后, PA26-7 的各组分对 ZEN 表现出不同的降解效果(图 5), 菌体及其内含物对 ZEN 的降解率较低, 分别为 5.2%、3.2%, 说明菌体和胞内酶并非 PA26-7 的主要脱毒成分。发酵上清液对 ZEN 的降解率为 89.2%, 上清液经蛋白酶 K 处理和加热处理后, 对 ZEN 的降解效果分别下降了 73.5% 和 79.4%, 因此 PA26-7 通过分泌胞外酶降解 ZEN。

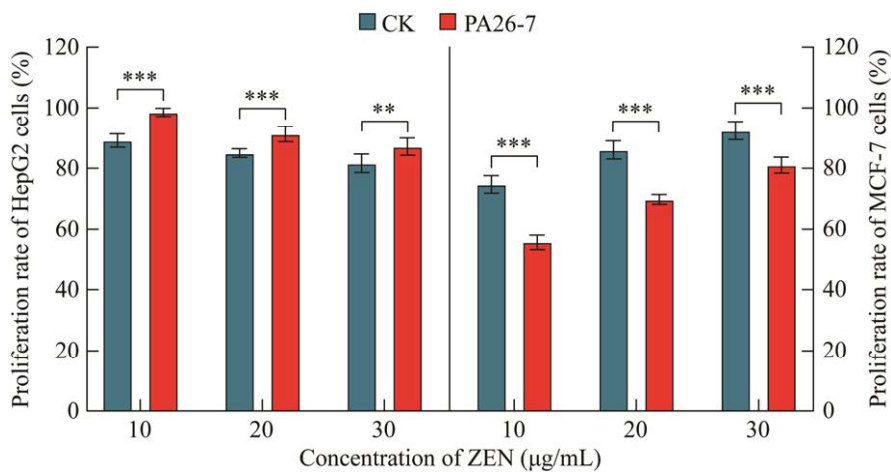


图3 PA26-7 降解 ZEN 产物的细胞毒性和雌激素活性

Figure 3 Cytotoxicity and estrogen activity of degradation products of ZEN by PA26-7. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

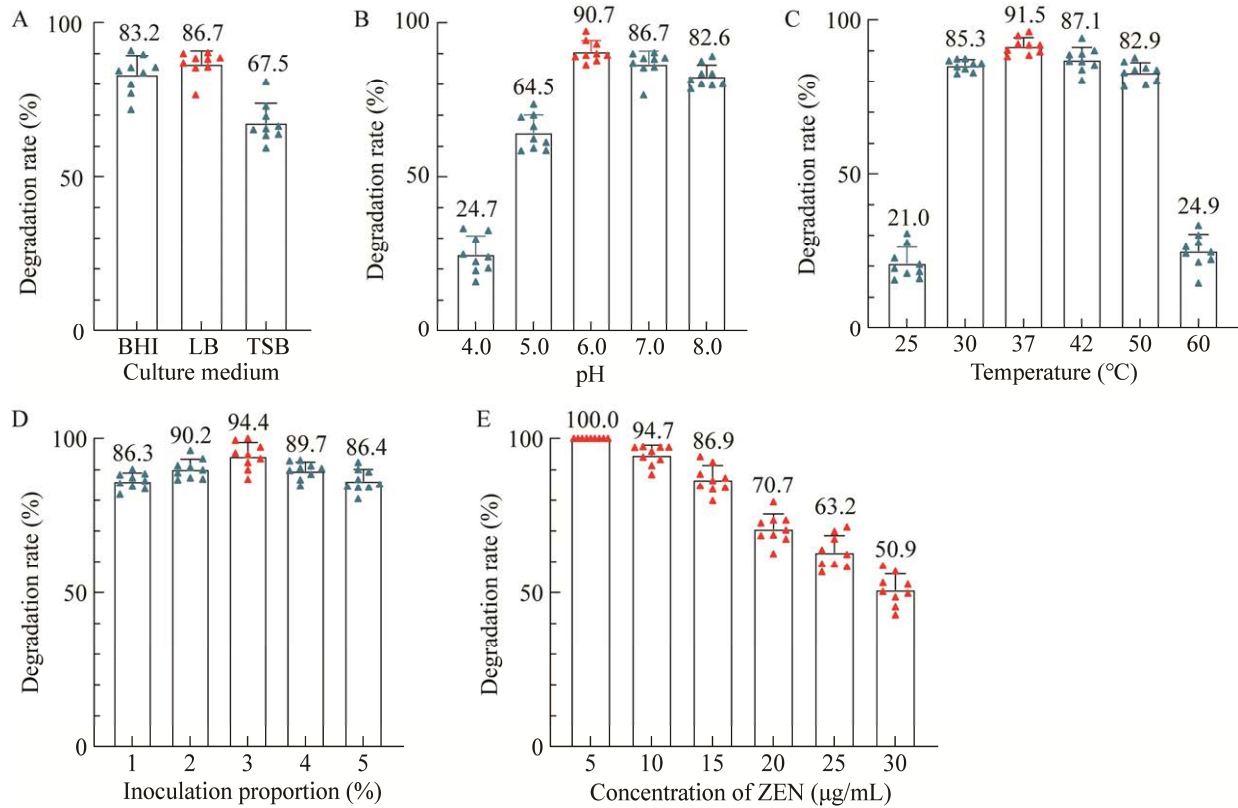


图 4 PA26-7 脱毒条件优化

Figure 4 Optimization of detoxification conditions of PA26-7.

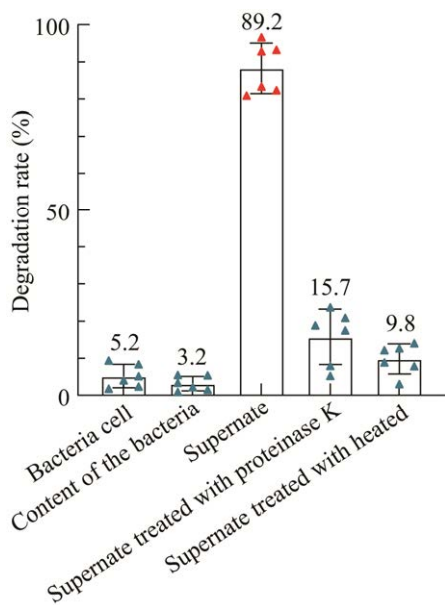


图 5 PA26-7 降解 ZEN 的活性物质分析

Figure 5 Analysis of ZEN-degrading active substances of PA26-7.

2.6 在饲料中的脱毒效果

本研究中 ZEN 检测的标准曲线为 $y=200.93x-12.536$, 相关系数 $R^2=0.9999$, 在 $0-30 \mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系(图 6A)。PA26-7 在 ZEN 污染的饲料原料及成品鸡饲料中发酵 72 h 后, 其胞外降解酶活性使各饲料样品中的 ZEN 含量显著降低, 饲料成品中 ZEN 的浓度由 $(61.05 \pm 10.90) \mu\text{g/g}$ 降至 $(20.69 \pm 5.37) \mu\text{g/g}$, 下降了 66.2%; 麸皮中 ZEN 浓度由 $(28.00 \pm 4.06) \mu\text{g/g}$ 降至 $(6.62 \pm 3.10) \mu\text{g/g}$, 下降了 79.4%; 豆粕中 ZEN 浓度由 $(19.78 \pm 3.30) \mu\text{g/g}$ 降至 $(0.69 \pm 0.94) \mu\text{g/g}$, 下降了 96.8% (图 6B)。PA26-7 在不同样品中的脱毒能力不同, 可能是由于受污染饲料中 ZEN 浓度不同, 高浓度 ZEN 污染的饲料需要延长发酵时间才能彻底清除样品中的 ZEN。

2.7 抗营养因子的消除

本研究中植酸测定的标准曲线为 $y = -1.9638x + 0.3691$, 相关系数 $R^2 = 0.9996$, 在 $0.001-0.1$ mg/mL 范围内线性关系良好(图 7A)。

PA26-7 在实现饲料脱毒的同时, 有效降低了各饲料样品中的植酸含量(图 7B)。豆粕中植酸含量从 (12.32 ± 1.72) mg/g 降至 (8.65 ± 1.58) mg/g, 平均下降 29.79%; 麸皮中植酸含量从 (18.38 ± 1.70) mg/g

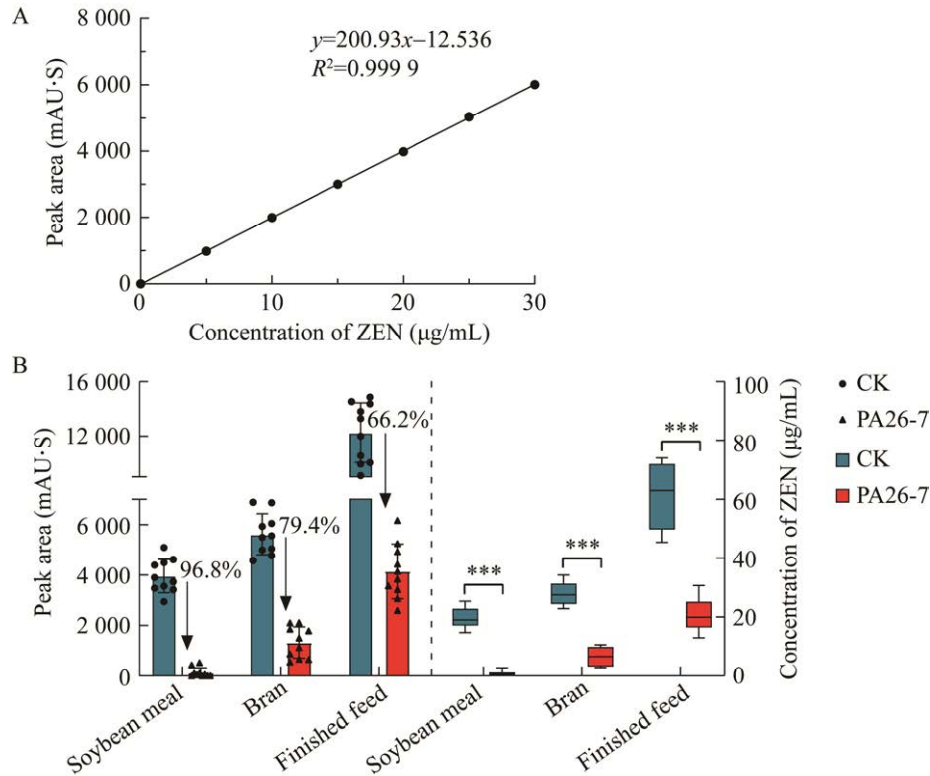


图 6 HPLC 检测 ZEN 的标准曲线(A)及 PA26-7 在饲料中的脱毒效果(B)

Figure 6 Standard curve for detecting ZEN by HPLC (A) and effect of PA26-7 on detoxification in feed (B). ***: $P < 0.001$.

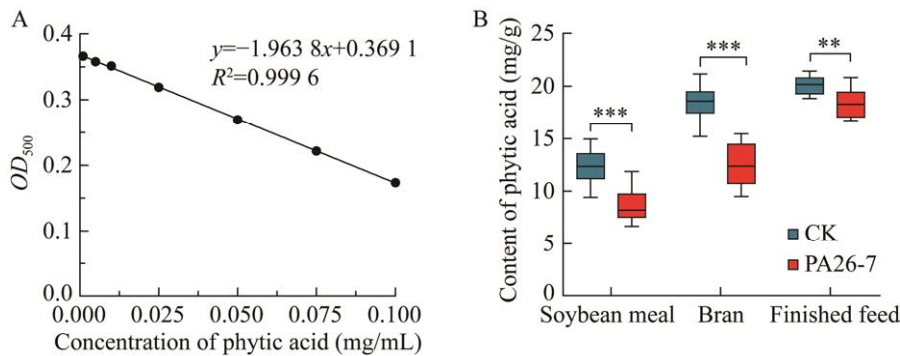


图 7 HPLC 检测植酸的标准曲线(A)及饲料脱毒前后植酸含量的变化(B)

Figure 7 Standard curve for detecting phytic acid by HPLC (A) and changes of phytic acid content in feed before and after detoxification (B). **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

降至(12.45±2.06) mg/g, 平均下降 32.26%; 饲料成品中植酸含量从(20.11±0.85) mg/g 降至(18.42±1.37) mg/g, 平均下降 8.40%。

2.8 促生长因子的产生

本研究中各维生素测定的标准曲线见表 1, 各维生素 HPLC 检测的峰面积和浓度在 0–30 μg/mL 内均呈良好的线性相关关系。经 PA26-7 发酵后, 各饲料样品中 VB₂、VC、VM 等促生长因子的含量显著增加, 其中 VC 含量提高了 0.47–18.19 倍, VB₂ 的含量提高了 0.63–0.94 倍(图 8, 表 2)。

3 讨论与结论

ZEN 作为动物饲料中检出率最高的真菌毒素之一, 常导致牲畜的异常繁殖, 并可在肉、蛋、奶等动物产品中沉积, 进而通过食物链危害人类健康。2018–2020 年中国 22 个省份的 3 507 份饲料中, 受 ZEN 污染的饲料检出率达 96.9%, 其中 0.5% 的饲料 ZEN 污染水平超过了我国的饲料卫生标准^[32]。为解决饲料中 ZEN 污染的问题, 大量学者开展了 ZEN 生物脱毒的研究。本研究从微生态制剂中筛选获得一株高效降解 ZEN 的 *B. velezensis* PA26-7, *B. velezensis* 已在农业、医药、食品和环境领域发挥作用, 对于农业可持续发展具有重要意义^[13]。此前已有研究报道从辽宁省霉菌污染的土壤中分离获得一株可降解 ZEN 的 *B. velezensis* A2, A2 发酵 72 h 仅清除 LB 培养基中 7.45 μg/mL 的

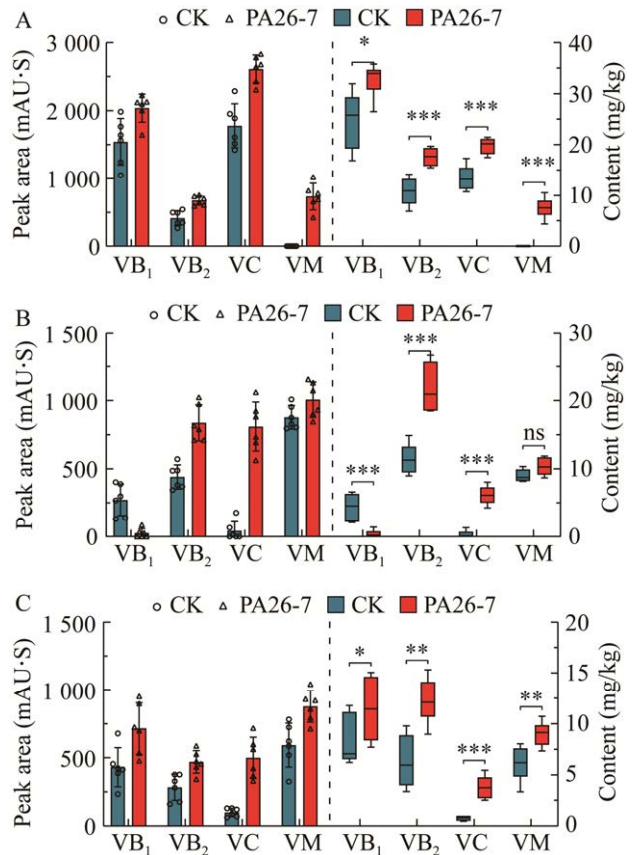


图 8 饲料脱毒前后维生素含量变化 A: 豆粕. B: 麸皮. C: 饲料成品

Figure 8 Changes of vitamin content in feed before and after detoxification. A: Soybean meal. B: Bran. C: Finished feed. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

ZEN^[5]。然而 PA26-7 在 ZEN 浓度为 10 μg/mL 的培养基中发酵 48 h 后, ZEN 降解率达 94.7%, 即 PA26-7 发酵 48h 可降解 9.47 μg/mL 的 ZEN。与 *B. velezensis* A2 相比, PA26-7 更具有应用潜力。首先, 菌株 A2 分离于土壤, 安全性未知, 其作为农用微生物进行规模化应用的可行性还有待考证, 而菌株 PA26-7 分离于微生态制剂产品, 菌株安全性有所保障。其次, 菌株 A2 通过胞外酶和胞内酶共同降解 ZEN, 但其发挥降解活性的条件范围未知^[33], 而菌株 PA26-7 通过分泌胞内酶实现高效脱毒, 脱毒条件范围明确,

表 1 HPLC 法检测维生素的标准曲线

Table 1 Standard curve for determination of vitamins by HPLC

维生素	标准曲线	相关系数
Vitamin	Standard curve	Correlation coefficient
VB ₁	$y=310.87x-0.025 0$	$R^2=0.999 8$
VB ₂	$y=191.91x-0.042 9$	$R^2=0.999 2$
VC	$y=660.04x-0.164 3$	$R^2=0.999 5$
VM	$y=487.06x-0.053 6$	$R^2=0.999 5$

表 2 PA26-7 发酵前后饲料中维生素含量的变化
Table 2 Changes of vitamin contents in the feed before and after fermentation of PA26-7

样品 Sample	维生素 Vitamin	发酵前含量 Contents before fermentation (mg/kg)	发酵后含量 Contents after fermentation (mg/kg)	平均含 量变化 Average content change (mg/kg)
豆粕 Soybean meal	VB ₁	24.81±5.52	32.77±3.31	+7.96
	VB ₂	10.82±2.90	17.61±1.76	+6.80
	VC	13.48±2.45	19.79±1.54	+6.32
	VM	0.00±0.00	7.56±2.03	+7.56
麸皮 Bran	VB ₁	4.38±1.91	0.40±0.55	-3.98
	VB ₂	11.47±2.31	21.84±3.46	+10.37
	VC	0.32±0.53	6.14±1.37	+5.82
	VM	9.01±0.89	10.35±1.34	+1.33
饲料成品 Finished feed	VB ₁	8.28±2.43	11.45±2.98	+3.18
	VB ₂	6.30±2.62	12.25±2.16	+5.95
	VC	0.76±0.23	3.79±1.14	+3.02
	VM	6.09±1.66	9.01±1.19	+2.92

具有用于酸性或碱性饲料脱毒的潜力。最后, A2 在饲料中的实际应用效果未知, 而 PA26-7 在霉变饲料中发酵后表现出良好的脱毒和改善饲料营养结构的能力, 使饲料中 ZEN 浓度下降 66.2%–96.8%, 植酸含量下降 8.40%–32.26%, 同时使 VB₂、VC 含量分别提高 63%–94% 和 47%–398%。

ZEN 与其他真菌毒素的一个显著不同之处就是 ZEN 能引发雌激素效应, 尽管已报道的 ZEN 降解菌很多, 但适合投入实际应用的菌株却很少, 相当一部分菌株未能对 ZEN 进行有效脱毒。例如, 分离自青贮饲料的 *Saccharomyces cerevisiae* strains LL18 可高效降解 ZEN, 该菌株将 ZEN 还原为 α -ZOL 和 β -ZOL^[34], 而 α -ZOL 的雌激素活性是 ZEN 的近 500 倍^[10]。乳酸菌培养 72 h 使培养基中 ZEN 含量减少了 68%, 但通过人类食管癌(oesophageal carcinoma, SNO) 细胞株试验得出产物毒性并未减弱^[26]。因此,

筛选可将 ZEN 降解成低雌激素活性甚至无雌激素活性的菌种至关重要, 这也是目前 ZEN 降解菌筛选的难点之一。

此外, 目前对于真菌毒素生物脱毒的研究侧重于单一毒素的生物降解, 但在自然条件下, 被污染的谷物中常出现两种或多种真菌毒素共存的情况。2008–2017 年在全球 100 个国家收集的 74 821 份混合饲料和饲料原料(如玉米、小麦、大豆等)样品中, 64% 的样品存在两种毒素共存的情况, 混合饲料中 ZEN 和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)共存的样品检出率达 48%, ZEN 和伏马毒素(fumonisin, FB)共存的样品检出率达 43%^[35]。不同毒素共存有时会产生协同作用。日粮中 ZEN 和 DON 共存会干扰母猪卵巢中卵母细胞的正常成熟, 抑制母猪的脾细胞增殖能力, 引起如含铁黄素沉着症等脾脏疾病^[36]。因此针对饲料和谷物污染中多种毒素共存的实际状况, 应开展可同时降解多种毒素菌种的筛选和研究。

综上所述, 本研究从微生态制剂中筛选获得一株可高效降解 ZEN 的 *B. velezensis* PA26-7, PA26-7 在饲料脱毒、饲料营养结构改善等方面均有发挥作用的潜力。本研究尚存在一些需要深入系统化研究的问题, 在未来的研究中, 我们将对 PA26-7 所分泌的胞外降解酶进行分离、纯化, 对该降解酶的蛋白结构进行研究; 模拟胃肠道环境探究 PA26-7 对 ZEN 的降解产物是否会发生水解, 评估降解产物的稳定性, 并通过降解酶基因克隆等实现饲料及粮谷类作物中多种毒素的共同降解。

REFERENCES

- [1] YAZAR S, OMURTAG GZ. Fumonisin, trichothecenes and Zearalenone in cereals[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(11): 2062-2090.
- [2] LIU JD, APPLGATE T. Zearalenone (ZEN) in

- livestock and poultry: dose, toxicokinetics, toxicity and estrogenicity[J]. *Toxins*, 2020, 12(6): 377.
- [3] WANG GF, LIAN C, XI YF, SUN ZM, ZHENG SL. Evaluation of nonionic surfactant modified montmorillonite as mycotoxins adsorbent for aflatoxin B₁ and Zearalenone[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018, 518: 48-56.
- [4] LOI M, FANELLI F, LIUZZI VC, LOGRIECO AF, MULÈ G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives[J]. *Toxins*, 2017, 9(4): 111.
- [5] WANG N, LI P, PAN JW, WANG MY, LONG M, ZANG J, YANG SH. *Bacillus velezensis* A2 fermentation exerts a protective effect on renal injury induced by Zearalenone in mice[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13646.
- [6] WANG N, WU WW, PAN JW, LONG M. Detoxification strategies for Zearalenone using microorganisms: a review[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(7): 208.
- [7] YANG SB, ZHENG HC, XU JY, ZHAO XY, SHU WJ, LI XM, SONG H, MA YH. New biotransformation mode of Zearalenone identified in *Bacillus subtilis* Y816 revealing a novel ZEN conjugate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(26): 7409-7419.
- [8] JI J, YU J, YANG Y, YUAN X, YANG J, ZHANG YZ, SUN JD, SUN XL. Exploration on the enhancement of detoxification ability of Zearalenone and its degradation products of *Aspergillus niger* FS10 under directional stress of Zearalenone[J]. *Toxins*, 2021, 13(10): 720.
- [9] ZHANG ZX, XU W, WU H, ZHANG WL, MU WM. Identification of a potent enzyme for the detoxification of Zearalenone[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(1): 376-383.
- [10] WU KT, REN CX, GONG YF, GAO X, ALI RAJPUT S, QI DS, WANG S. The insensitive mechanism of poultry to Zearalenone: a review[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(3): 587-594.
- [11] MINERVINI F, GIANNOCCARO A, CAVALLINI A, VISCONTI A. Investigations on cellular proliferation induced by Zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters[J]. *Toxicology Letters*, 2005, 159(3): 272-283.
- [12] TATAY E, ESPÍN S, GARCÍA-FERNÁNDEZ AJ, RUIZ MJ. Estrogenic activity of Zearalenone, α -Zearalenol and β -Zearalenol assessed using the E-screen assay in MCF-7 cells[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2018, 28(4): 239-242.
- [13] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [14] CANIBE N, JENSEN BB. Fermented liquid feed—Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 173(1/2): 17-40.
- [15] 吴逸飞, 孙宏, 李园成, 王新, 柳永, 姚晓红, 汤江武. 微生物固态发酵对饲料营养特性的影响[J]. *浙江农业学报*, 2016, 28(12): 2014-2020.
- WU YF, SUN H, LI YC, WANG X, LIU Y, YAO XH, TANG JW. Effects of microbial solid-state fermentation on nutritional value of feeds[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(12): 2014-2020 (in Chinese).
- [16] 林标声, 罗建, 李益明, 杨小燕. 微生物发酵饲料生产关键因素的优化及发酵过程成分变化分析[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(32): 1-6.
- LIN BS, LUO J, LI YM, YANG XY. Optimization of key factors influencing microbial fermented feed production and analysis of composition variation during fermentation process[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(32): 1-6 (in Chinese).
- [17] 陈娟, 刘军, 张云鹏, 王娟娟. 微生物降解菜籽粕中抗营养因子的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2010(7): 40-42.
- CHEN J, LIU J, ZHANG YP, WANG JJ. Microbial degradation of anti-nutrition factors contained in rapeseed meal[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2010(7): 40-42 (in Chinese).
- [18] ALKANDARI S, BHATTI ME, ALDUGHPASSI A, AL-HASSAWI F, AL-FOUDARI M, SIDHU JS. Development of functional foods using psyllium husk and wheat bran fractions: Phytic acid contents[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(6): 3602-3606.
- [19] ZHAO T, YONG XH, ZHAO ZM, DOLCE V, LI Y, CURCIO R. Research status of *Bacillus* phytase[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(9): 415.
- [20] SPARVOLI F, COMINELLI E. Seed biofortification and phytic acid reduction: a conflict of interest for the plant?[J]. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2015, 4(4):

- 728-755.
- [21] TAHIR M, SHIM MY, WARD NE, SMITH C, FOSTER E, GUNEY AC, PESTI GM. Phytate and other nutrient components of feed ingredients for poultry[J]. Poultry Science, 2012, 91(4): 928-935.
- [22] RAPP C, LANTZSCH HJ, DROCHNER W. Hydrolysis of phytic acid by intrinsic plant and supplemented microbial phytase (*Aspergillus niger*) in the stomach and small intestine of minipigs fitted with re-entrant cannulas. 2. Phytase activity[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2001, 85(11/12): 414-419.
- [23] 张晓琳, 汪洋, 李爱科. 饲料中真菌毒素生物脱毒的研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 2971-2978. ZHANG XL, WANG Y, LI AK. Progress on biological detoxification of mycotoxins in feeds[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(10): 2971-2978 (in Chinese).
- [24] VEKIRU E, HAMETNER C, MITTERBAUER R, RECHTHALER J, ADAM G, SCHATZMAYR G, KRŠKA R, SCHUHMACHER R. Cleavage of Zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2353-2359.
- [25] CHEN SW, WANG HT, SHIH WY, CIOU YN, CHANG YY, ANANDA L, WANG SY, HSU JT. Application of Zearalenone (ZEN)-detoxifying *Bacillus* in animal feed decontamination through fermentation[J]. Toxins, 2019, 11(6): 330.
- [26] MOKOENA MP, CHELULE PK, GQALENI N. Reduction of fumonisin B₁ and Zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(10): 2095-2099.
- [27] ZHANG JN, ZHENG YD, TAO H, LIU J, ZHAO P, YANG F, LV ZH, WANG JQ. Effects of *Bacillus subtilis* ZJ-2019-1 on Zearalenone toxicosis in female gilts[J]. Toxins, 2021, 13(11): 788.
- [28] GRUBER-DORNINGER C, FAAS J, DOUPOVEC B, ALESCHKO M, STOIBER C, HÖBARTNER-GUßL A, SCHÖNDORFER K, KILLINGER M, ZEBELI Q, SCHATZMAYR D. Metabolism of Zearalenone in the rumen of dairy cows with and without application of a Zearalenone-degrading enzyme[J]. Toxins, 2021, 13(2): 84.
- [29] DENG FR, CHEN YS, SUN TY, WU YT, SU YT, LIU CY, ZHOU JY, DENG YQ, WEN JK. Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. from probiotic products of diverse origins[J]. Food Research International, 2021, 139: 109949.
- [30] SKRZYDLEWSKI P, TWARUŻEK M, GRAJEWSKI J. Cytotoxicity of mycotoxins and their combinations on different cell lines: a review[J]. Toxins, 2022, 14(4): 244.
- [31] 温舒元, 范杰英, 魏春雁, 蔡玉红, 马虹. 分光光度法测定大豆中植酸含量的不确定度评估[J]. 东北农业科学, 2019, 44(3): 92-96. WEN SY, FAN JY, WEI CY, CAI YH, MA H. Evaluation of uncertainty of the determination of phytic acid content in soybean by spectrophotometry[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2019, 44(3): 92-96 (in Chinese).
- [32] ZHAO L, ZHANG L, XU ZJ, LIU XD, CHEN LY, DAI JF, KARROW NA, SUN LH. Occurrence of aflatoxin B₁, deoxynivalenol and Zearalenone in feeds in China during 2018-2020[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12(1): 74.
- [33] 王楠. 贝莱斯芽孢杆菌 A2 对玉米赤霉烯酮降解机制及其安全性评估[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2019. WANG N. Degradation Mechanism and Safety Evaluation of zearalenone detoxification by *Bacillus velezensis* A2[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [34] KELLER L, ABRUNHOSA L, KELLER K, ROSA C, CAVAGLIERI L, VENÂNCIO A. Zearalenone and its derivatives α -Zearalenol and β -Zearalenol decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from bovine forage[J]. Toxins, 2015, 7(8): 3297-3308.
- [35] GRUBER-DORNINGER C, JENKINS T, SCHATZMAYR G. Global mycotoxin occurrence in feed: a ten-year survey[J]. Toxins, 2019, 11(7): 375.
- [36] YANG C, SONG G, LIM W. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 389: 122087.