

研究报告

老面中玉米赤霉烯酮消减乳酸菌的筛选、鉴定及机理解析

贺子元^{1,2}, 秦菲³, 郭宝元², 玉万国^{*1}, 汪洋^{*2}

1 广西科技大学生物与化学工程学院 广西糖资源绿色加工重点实验室, 广西 柳州 545006

2 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037

3 北京联合大学生物与化学工程学院, 北京 100023

贺子元, 秦菲, 郭宝元, 玉万国, 汪洋. 老面中玉米赤霉烯酮消减乳酸菌的筛选、鉴定及机理解析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2521-2533.

HE Ziyuan, QIN Fei, GUO Baoyuan, YU Wanguo, WANG Yang. Screening, identification, and mechanism elucidation of zearalenone-reducing lactic acid bacteria from Chinese sourdough[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2521-2533.

摘要: 【背景】玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种由镰刀菌属真菌产生的具有雌激素效应的真菌毒素, 是世界范围内严重危害人类健康和农业安全的污染物之一。乳酸菌作为一类被公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的食品级非致病微生物, 近年研究显示其具有良好的真菌毒素消减能力, 为其在保障食品安全方面带来潜在应用前景。【目的】以来自山东、河南和甘肃等7份老面样品作为研究对象, 从中筛选具有消减ZEN活性的乳酸菌, 探究该菌对ZEN的吸附机理。【方法】利用稀释平板涂布法获得菌株; 超高效液相色谱检测具有消减ZEN活性的菌株, 质谱(mass spectrometry)确定代谢产物; 16S rRNA基因序列分析比对确定菌株属种, 透射电镜(transmission electron microscopy, SEM)观察菌株形态; 分析不同初始毒素浓度及菌体浓度下的吸附效果, 对其进行动力学模型拟合; 定位吸附位点并通过傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析确定菌株中参与吸附ZEN的官能团, 阐明对ZEN的吸附机理。【结果】初步筛选获得63株乳酸菌, 从中复筛获得3株具有消减ZEN活性的乳酸菌, 经鉴定: 菌株6-8和菌株18-2为短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*), 菌株12-6为热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*)。两株短促生乳杆菌具有降解效果, 在ZEN浓度为10 mg/L的条件下, 48 h内降解率分别达到85.5%和87.3%, 质谱结果显示降解产物为 α -ZEL; 另一株具有吸附效果, 在菌株浓度为 4.26×10^{10} CFU/mL、ZEN浓度为10 mg/L条件下, 20 min内吸附率达到62.9%, 灭活后吸附率上升20%。吸附过程同时符合准一级(pseudo-first-order)动力学及准二级(pseudo-second-order)动力学模型。傅里叶变换红外光谱结果显示菌株12-6的主要吸附位点为细胞壁上的肽聚糖与磷壁酸分子, 羟基、次甲基、羧基和酰胺基等作

资助项目: 国家自然科学基金(32060205); 广西壮族自治区自然科学基金(2023JJA130155)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060205) and the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2023JJA130155).

*Corresponding authors. E-mail: YU Wanguo, yuwanguo@gxust.edu.cn; WANG Yang, wy@ags.ac.cn

Received: 2023-09-27; Accepted: 2023-11-16; Published online: 2024-01-08

为主要官能团参与吸附。【结论】菌株 6-8 和菌株 18-2 对 ZEN 有较强的降解能力; 菌株 12-6 对 ZEN 有较强的吸附能力。其吸附动力学符合准一级及准二级动力学模型, 吸附位点为细胞壁上的磷壁酸及肽聚糖分子。本研究为乳酸菌清除食品和饲料中有害物质的应用提供了理论基础。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 乳酸菌; 吸附; 官能团

Screening, identification, and mechanism elucidation of zearalenone-reducing lactic acid bacteria from Chinese sourdough

HE Ziyuan^{1,2}, QIN Fei³, GUO Baoyuan², YU Wanguo^{*1}, WANG Yang^{*2}

1 Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Collage of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, Guangxi, China

2 Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China

3 College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China

Abstract: [Background] Zearalenone (ZEN), a mycotoxin with estrogenic effects produced by *Fusarium*, is one of the pollutants that seriously jeopardize human health and agricultural safety worldwide. As a class of food-grade non-pathogenic microorganisms generally recognized as safe (GRAS), lactic acid bacteria have been proved to have good mycotoxin-reducing ability in recent years, demonstrating the application potential in safeguarding food safety. [Objective] To screen the lactic acid bacteria capable of reducing ZEN from seven Chinese sourdough samples collected from Shandong, Henan, and Gansu, and investigate the reducing mechanisms of ZEN by the bacteria. [Methods] The strains were isolated by the dilution-plate coating method. Ultra-high performance liquid chromatography was employed to screen the strains with ZEN-reducing activity, mass spectrometry (Q exactive) to identify the metabolites, and transmission electron microscopy (SEM) to observe the morphology of the strains. The adsorption effects were examined at different initial toxin concentrations and bacterial concentrations, and a kinetic model was fitted. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to identify the functional groups involved in the adsorption of ZEN and elucidate the adsorption mechanism of ZEN. [Results] A total of 63 strains of *Lactobacillus* were isolated from the preliminary screening, and then three strains with ZEN-reducing activity were obtained. Strains 6-8 and 18-2 were identified as *Levilactobacillus brevis*, and strain 12-6 as *Acetobacter tropicalis*. The two strains of *L. brevis* had ZEN-degrading effects, with the degradation rates of 85.5% and 87.3%, respectively, within 48 h at ZEN concentration of 10 mg/L. The mass spectrometry results showed that the degradation product was α -ZEL. The other strain had a ZEN-adsorbing effect, with the adsorption rate reaching 62.9% within 20 min at a bacterial concentration of 4.26×10^{10} CFU/mL and a ZEN concentration of 10 mg/L. Moreover, the adsorption rate increased by 20% after strain inactivation. The adsorption process was fitted with both pseudo-first-order and pseudo-second-order models. Fourier transform

infrared spectroscopy (FTIR) showed that the main adsorption sites of strain 12-6 were peptidoglycan and teichoic acid in the cell wall, involving hydroxyl, methenyl, carboxyl, and amide groups. **[Conclusion]** *L. brevis* 6-8 and 18-2 showed strong degradation capacity against ZEN, and *A. tropicalis* 12-6 had a strong adsorption capacity for ZEN. The adsorption kinetics conformed to pseudo-first-order and pseudo-second-order models, with the adsorption sites at teichoic acid and peptidoglycan in the cell wall. This study provides a theoretical basis for the application of lactic acid bacteria in the removal of harmful substances from food and feed.

Keywords: zearalenone; lactic acid bacteria; adsorption; functional groups

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种具有雌激素效应的真菌毒素^[1], 多见于玉米和小麦等农作物中, 可诱发一系列的生殖毒性和致畸作用^[2]。ZEN 的污染非常广泛, Pleadin 等^[3]对谷物调查研究中发现, 玉米样品中 ZEN 检出率为 87.5%, 最大浓度可达 5.11 mg/kg。如何有效处理并降低饲料原料中玉米赤霉烯酮的水平成为目前亟待解决的问题。

近年来, 对玉米赤霉烯酮的消减成为热点之一。目前主要的消减方法有物理法^[4]、化学法^[5]和生物法^[6]。其中生物法具有安全系数高且不会影响谷物营养价值等优点, 已被证明是 ZEN 脱毒的最佳方法^[7]。目前, 微生物在真菌毒素消减技术的研究方面受到高度重视, 其中乳酸菌作为吸附型真菌毒素脱毒剂的研究报道也日益增多。潘佳雯^[8]筛选出一株具有高效吸附 ZEN 能力的益生菌株, 为片球菌 XY46, 灭活条件下对 ZEN 的吸附率可达 94.4%。陈漪汶^[9]从猪粪中获得一株具有高效吸附 ZEN 作用的乳杆菌, 吸附率最高达 85.78%。VEGA 等^[10]考察了 5 株分离自猪直肠的乳杆菌属对玉米赤霉烯酮的吸附能力, 结果表明吸附量均在 40%以上。Król 等^[11]通过动力学研究发现, 双歧杆菌与玉米赤霉烯酮的结合是一个快速的过程, 在培养期间前 720 min 吸附效率迅速提高, 约 88%的 ZEN 被吸附到细胞壁上。在对真菌毒素的吸附作用中, 细胞壁及其表面官能团起主要作用^[12],

Zoghi 等^[13]研究表明酵母和细菌对毒素的吸附主要与细胞壁中特定的蛋白质和碳水化合物成分有关。真菌毒素与乳酸菌相互作用的强度受肽聚糖结构及其氨基酸组成的影响^[14]。然而, 目前对于 ZEN 消减菌株的资源 and 消减机理研究仍然较为匮乏。

老面(sourdough)是小麦粉由酵母或乳酸菌发酵后得到含有代谢产物的面团^[15]。本研究拟通过形态学观察、16S rRNA 基因测序等方法从老面中分离鉴定具有 ZEN 消减活性的乳酸菌, 并通过质谱、红外光谱等仪器分析菌株对 ZEN 的消减机理, 以期为乳酸菌在真菌毒素的消减研究方面奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

老面样品产自甘肃省武威市、河南省郑州市、河南省商丘市、山东省泰安市和山西省运城市, 通过网络平台于 2022 年 9 月购买。获得的样品密封后 4 °C 冷藏保存。

1.2 主要试剂和仪器

玉米赤霉烯酮, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; α -玉米赤霉烯醇和放线菌酮(抑制真菌生长), Selleck 公司; 乙腈、乙酸、甲醇和甲酸均为 HPLC 级, 默克公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。冷冻离心机, 艾本德股份公司; 傅里叶变

换红外光谱仪, 岛津有限公司; 超高效液相色谱仪(ultra performance liquid chromatography, UPLC)和四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪 Q-Exactive, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 培养基

MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉粉 5.00, 酵母粉 4.00, 葡萄糖 20.00, 吐温-80 1.00, 磷酸氢二钾(7H₂O) 2.00, 乙酸钠(3H₂O) 5.00, 柠檬酸三铵 2.00, 硫酸镁(7H₂O) 0.20, 硫酸锰(4H₂O) 0.05, pH 6.4。固体培养基在此基础上加入琼脂 15.0 g/L。

1.4 ZEN 消减菌株的筛选与鉴定

筛选参照文献[16]的方法并略加改进。分别称取 5 g 老面样品至 50 mL 生理盐水中, 37 °C、220 r/min 振荡混匀 30 min, 定义稀释梯度为 10⁻¹; 从中吸取 1 mL 样品液, 加入 9 mL MRS (pH 6.4)培养基中, 定义稀释梯度为 10⁻²。以此类推逐步稀释制成 10⁻³–10⁻⁷ 梯度浓度。取 10⁻³–10⁻⁷ 梯度浓度的样品进行涂布(MRS 固体培养基中添加碳酸钙及工作浓度为 100 mg/L 的放线菌酮), 37 °C恒温培养箱倒置培养 72 h。观察菌落形态及湿润度等特征, 记录并从中挑取生长良好、形态不一的菌株, 依次接种于液体 MRS 培养基中, 37 °C、260 r/min 培养 48 h。通过观察透明圈的产生筛选出乳酸菌, 平板划线进行分离纯化, 37 °C倒置培养 48 h 后得到单菌落。取单菌落涂片进行革兰氏染色, 显微镜下观察其细胞形态。透射电镜试验由中国工业微生物菌种保藏管理中心进行操作。

采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 DNA, 以目的菌种基因组 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GTAC CTTGTACGACT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 5×HiFi Amplification Mix (dye+) 5 μL,

引物 27F 和 1492R (10 μmol/L)各 0.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 甜菜碱(5 mol/L) 5 μL, Q5 酶(200 mg/mL) 0.1 μL, 基因组模板 1 μL, ddH₂O 12.4 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 2 min; 4 °C保存。扩增后的 PCR 产物纯化后交由北京博迈德基因技术有限公司测序, 于 2023 年 6 月 29 日将测序结果提交到 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)^[17]进行分析、比对, 得到菌株属种等详细信息。

1.5 消减方式的探究

降解作用与吸附作用分别进行探究。挑取单菌落接种至含 10 mg/L ZEN 的液体 MRS 培养基, 37 °C、220 r/min 培养 48 h 后吸取 200 μL 培养液加入等体积乙腈, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.2 μm 有机相滤膜后, 利用 UPLC 检测脱毒效果并按照公式(1)计算降解率。将有消减活性的样品进一步通过质谱检测代谢产物。

$$\text{降解率(\%)} = \frac{\text{对照} - \text{样品}}{\text{对照}} \times 100 \quad (1)$$

将培养至对数期(4.26×10¹⁰ CFU/mL)的菌液经 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入等体积含有 10 mg/L ZEN 的 PBS 缓冲液, 在 37 °C、220 r/min 条件下振荡混匀 48 h, 再次离心并弃上清, 菌体加入 70%乙腈振荡使其解吸附, UPLC 检测解吸附结果, 按照公式(2)计算吸附率。

$$\text{吸附率(\%)} = \frac{\text{样品解析附峰面积}}{\text{对照峰面积} \times 3.3} \times 100 \quad (2)$$

超高效液相色谱检测条件: 色谱柱 Acquity UPLC BEH C18 柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm); 流动相 A 为 0.02%甲酸水, B 为甲醇, C 为乙腈(46%:8%:46%); 流速(0.15 mL/min); 进样量 2 μL; 检测波长 220 nm; 激发波长 274 nm, 发射

波长 440 nm; 柱温箱 40 °C。洗脱条件: 0–7.5 min, 15%C; 7.0–10.5 min, 100%C; 10.5–18.0 min, 15%C。

质谱条件: 加热电喷雾离子源温度为 300 °C; 毛细管电压为 3.2 kV; 离子传输管温度为 320 °C; 鞘气为 35 unit, 辅助气为 10 unit。Full scan/ddms2 扫描模式: 采集范围为 200–800 Da, 正离子采集; 一级质谱分辨率为 70 000 FWHM, 二级质谱分辨率为 17 500 FWHM; 碰撞池能量为 35 eV。色谱柱 CORTECSTM UPLC C18 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 柱温 40 °C; 进样量 2 μL。流动相 D 为含 0.1% (体积分数) 的甲酸和 1 mmol/L 乙酸铵的水溶液, 流速: 0.3 mL/min。梯度洗脱条件: 0–6.0 min, 70%D; 6.0–8.0 min, 50%D; 8.0–10.1 min, 5%D; 10.1–13.0 min, 70%D^[18]。

1.6 吸附特性表征

1.6.1 毒素浓度、菌体量对吸附的影响

本试验在 MRS 培养基中以 ZEN 初始浓度和菌体量为单因素, 确定其对吸附的影响。设置条件: ZEN 初始浓度分别为 0、1、2、5 和 10 mg/L, 菌体浓度分别为 50、5、0.5 和 0.05 g/L, 吸附后按照 1.5 的方法检测吸附含量。

1.6.2 吸附动力学曲线的绘制

配制 ZEN 浓度为 10 mg/L 的溶液、在温度为 37 °C、220 r/min 的条件下振荡吸附。在时间分别为 0、1、2、5、10、20、30、60、45、90 和 120 min 时, 离心后检测上清液中 ZEN 含量, 试验数据采用准一级动力学(pseudo-first-order)模型和准二级动力学(pseudo-second-order)结果进行拟合^[19]。其公式为:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (4)$$

式中: k_1 为准一级生物吸附速率常数 $g/(mg \cdot min)$;

k_2 为准二级生物吸附平衡速率常数 $[g/(\mu g \cdot min)]$; q_e 和 q_t 分别为平衡和 t 时刻的生物吸附量 (mg/g) ^[20]。

1.7 吸附机理的探究

1.7.1 活菌与灭活菌对吸附的影响

菌株培养至对数生长期后, 其中一组通过 20 min、100 °C 的水浴加热, 加入 10 mg/L ZEN 脱毒 24 h 后进行检测; 另外一组收集菌体后直接加入 10 mg/L ZEN 进行脱毒。试验设置 3 次平行。

1.7.2 吸附位点的考察及吸附官能团探究结果

吸附活性位点的定位试验参照文献[21]。分别用 3% SDS、0.1 mol/L HCl、10% 三氯乙酸和 1 mol/L 氯化锂处理菌体, 使之暴露出细胞壁、磷壁酸、肽聚糖和 S 层蛋白。加入浓度为 10 mg/L 的 ZEN, 在 30 °C、220 r/min 的条件下吸附 2 h。活细胞组与不处理组作为对照。在此基础上进行红外光谱研究试验, 暴露出各组后的菌体放于 -80 °C 冰箱冷冻过夜, 冷冻干燥机抽真空至菌体呈粉末状。每 200 mg KBr 加 2 mg 菌体粉末混合, 压片并干燥。使用傅里叶变换红外光谱仪进行试验, 依据光谱中的特征吸收峰的变化程度, 判断样品中的官能团。采用 OriginPro 2021 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 ZEN 消减菌株的筛选与鉴定结果

2.1.1 ZEN 消减菌株的筛选

本试验共考察 7 份老面样品, 产地见表 1。通过观察透明圈的产生从中分离筛选得到 63 株乳酸菌, 复筛得到 3 株具有 ZEN 消减作用的乳酸菌。如图 1 所示, 其中两株具有降解活性; 另一株具有较强吸附活性。液相结果(UPLC)显示在保留时间为 5.0 min 处出现 ZEN 峰, 细菌组峰面积显著降低并在 3.8 min 处出现代谢产物峰, 降解率分别达到 85.5% 和 87.3%, 分别命

表 1 样品产地

Table 1 List of sample origins

编号 No.	来源 Source
1	甘肃省武威市 Wuwei, Gansu
2	河南省商丘市 Shangqiu, Henan
3	河南省郑州市 Zhengzhou, Henan
4	山东省泰安市 Tai'an, Shandong
5	山西省运城市 Yuncheng, Shanxi
6	河南省郑州市 Zhengzhou, Henan
7	山西省运城市 Yuncheng, Shanxi

名为菌株 6-8 和菌株 18-2。质谱结果与液相结果一致, LC-MS 检测结果如图 2 所示, 样品与 ZEN ($C_{18}H_{22}O_5$, $m/z=319.154 0 [H^+]$) 标准品保留时间一致 ($RT=17.87$)。分析二级质谱碎片, 40 eV 碰撞能量下产物裂解后的特征碎片离子的 m/z 为 321.169 7, 与目前已知的 ZEN 代谢产物中 α -玉米赤霉烯醇 ($C_{18}H_{24}O_5$, $m/z=321.17 [H^+]$) 相符。因此推断菌株 6-8 及 18-2 对 ZEN 的降解产物为 α -ZEL, 化学结构式如图 3 所示。 α -ZEL 的雌激素效价是 ZEN 本身毒性的 500 多倍^[22],

Eze 等测定其雌激素活性发现 α -ZEL 生殖毒性显著高于 ZEN^[23], 因此不作为后续研究。另外一株具有较强吸附活性, 经计算吸附率为 62.9%, 命名为菌株 12-6。后续试验主要以吸附菌株作为研究对象探究吸附机理。

2.1.2 ZEN 消减菌株的鉴定结果

电镜结果如图 4 所示, 菌株 6-8 及 18-2 呈杆状, 大小约 $(0.6-0.7) \mu m \times (1.1-2.5) \mu m$, 单个或成对排列。菌株 12-6 呈杆状, $(1.2-1.4) \mu m \times (1.5-2.3) \mu m$ 。

将测序后得到的 16S rRNA 基因序列上传至 EzBioCloud 数据库, 分析结果如表 2 所示。两株降解菌 6-8 (登录号为 OR349487) 和 18-2 (登录号为 OR349488) 均为短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*), 吸附菌株 12-6 (登录号为 OR349489) 为热带醋杆菌 (*Acetobacter tropicalis*)。

2.2 吸附特性表征结果

2.2.1 毒素浓度、菌体量对吸附的影响结果

如图 5A 所示, 在 ZEN 浓度为 1-10 mg/L 范围内, 随着 ZEN 浓度的增大, 菌株 12-6 的吸

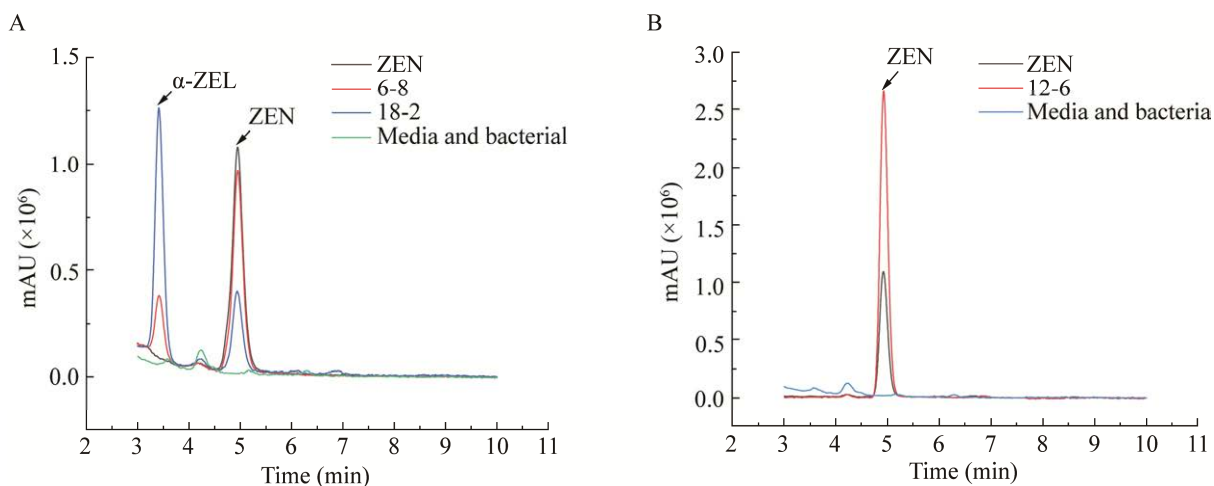


图 1 UPLC 检测 ZEN 的脱毒效果 A: 菌株 6-8、18-2 降解前后 ZEN 峰面积对比. B: 12-6 解吸附后 ZEN 峰面积对比. 3.8 min 处为代谢产物 α -ZEL 峰, 5.0 min 处为 ZEN 峰

Figure 1 Detection of detoxification of ZEN by UPLC. A: Comparison of ZEN peak area before and after degradation of strain 6-8 and strain 18-2. B: Comparison of ZEN peak area after desorption of 12-6. Metabolite peaks at 3.8 min, ZEN peak at 5.0 min.

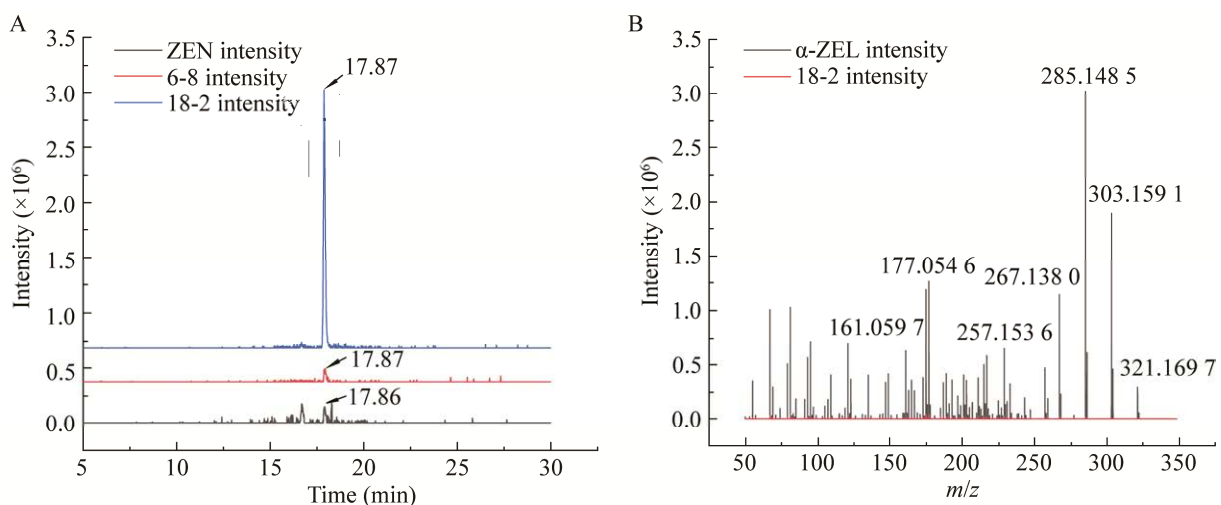


图 2 LC-MS 检测 ZEN 的降解产物 A: 两株降解菌的一级色谱图与 ZEN 标准品对比. B: 二级质谱图与 α -ZEL 标准品对比

Figure 2 Detection of ZEN degradation products by LC-MS. A: Comparison of primary chromatograms of two degrading strains with ZEN standard. B: Comparison of secondary mass spectra with α -ZEL standard.

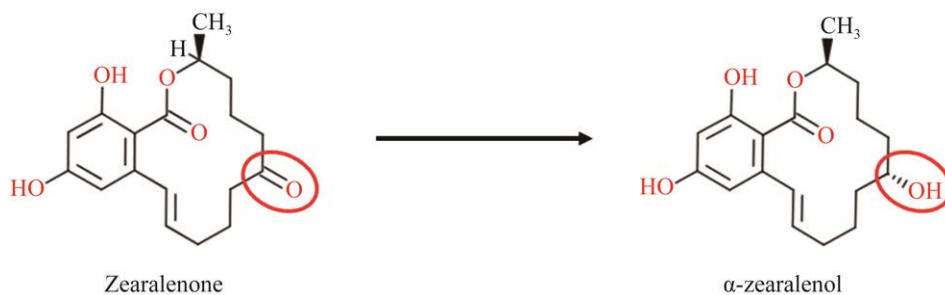


图 3 玉米赤霉烯酮及其代谢产物的化学结构式

Figure 3 Chemical structural formulae of zearalenone and its metabolite.

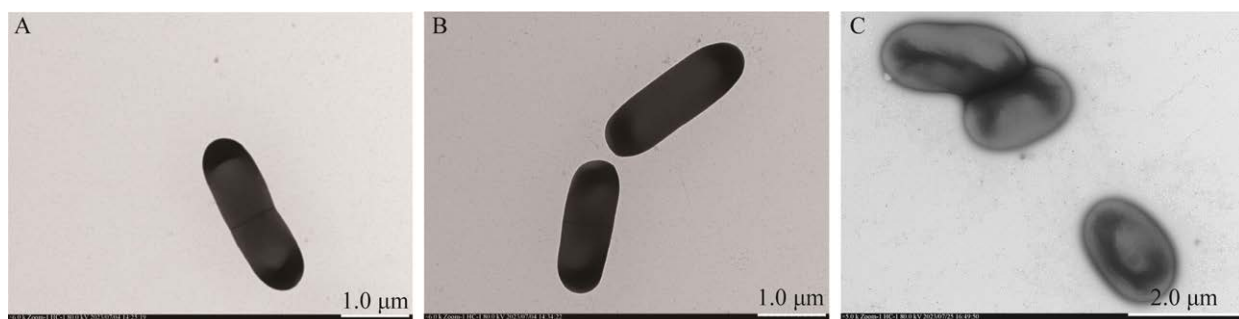


图 4 透射电镜下菌株形态图 A: 菌株 6-8. B: 菌株 18-2. C: 菌株 12-6

Figure 4 Morphology of the strains under transmission electron microscope. A: Strain 6-8. B: Strain 18-2. C: Strain 12-6.

表 2 分离菌株的 16S rRNA 基因序列分析

Table 2 16S rRNA gene sequence analysis of the isolated strains

Name	Strain 6-8	Strain 18-2	Strain 12-6
Top-hit taxon	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i>
Top-hit strain	ATCC 14869	ATCC 14869	NBRC 16470
Similarity (%)	99.93	99.79	99.70
Top-hit taxonomy	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Levilactobacillus</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Levilactobacillus</i>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Acetobacter</i>
GenBank accession number	OR349487	OR349488	OR349489

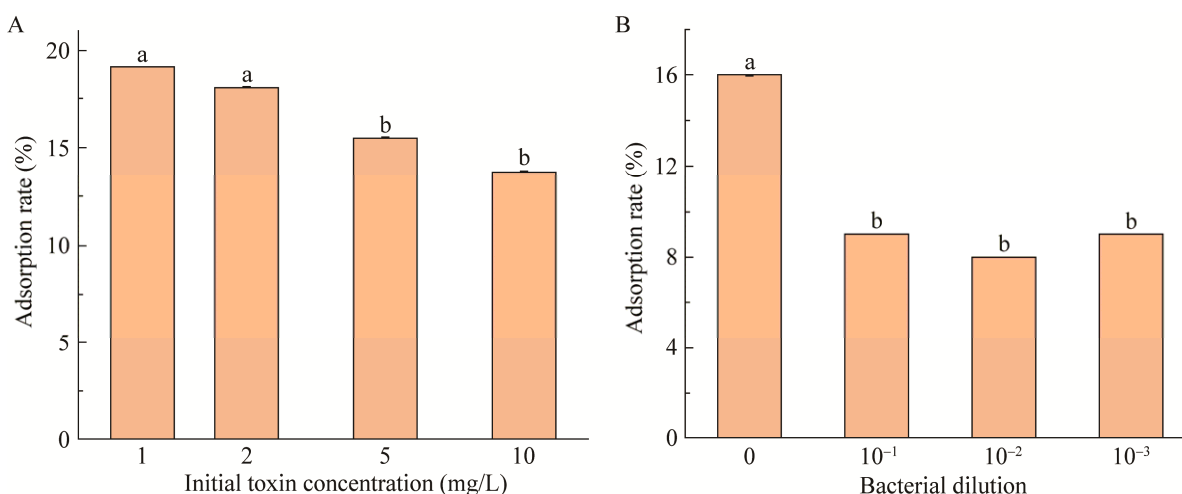


图 5 单因素下菌株吸附率对比图 A: 不同毒素浓度下菌株吸附率. B: 不同菌体浓度下菌株吸附率. a、b 表示各组间差异程度

Figure 5 Comparison of adsorption rate of strains under single factor. A: Adsorption rate of strains under different toxin concentrations. B: Adsorption rate of strains under different bacteriophage concentrations. a, b: The degree of difference between groups.

附率呈现下降的趋势。这可能是由于菌体浓度一定时可用吸附位点数量有限,若 ZEN 浓度高于某一数值时则有大量的 ZEN 无法与吸附位点结合,导致吸附率下降^[24]。不同稀释浓度的菌体对 ZEN 的吸附率见图 5B。在 ZEN 浓度一定的条件下,随菌体浓度的降低吸附率呈下降趋势($P<0.05$)且趋于稳定。这可能是由于在一定范围内,降低菌体浓度,可用于吸附 ZEN 的活性位点随之减少,菌体对 ZEN 的吸附量减少,从而使吸附率降低。

2.2.2 吸附动力学探究

图 6 显示了菌株 12-6 在不同接触时间下对 ZEN 的吸附容量。结果表明 ZEN 的吸附在前 20 min 内迅速增加,20 min 之后发生了解吸且吸附量略有下降,这可能由吸附的可逆性造成,之后吸附率趋于平衡,吸附量不随时间变化。这种快速的生物吸附可以用生物吸附过程开始时在生物吸附表面上更多的可用活性部位来解释,这减少了接触时间。对于实际的 ZEN 生物吸附应用来说,短的平衡时间也是一个相当大的优势^[25]。

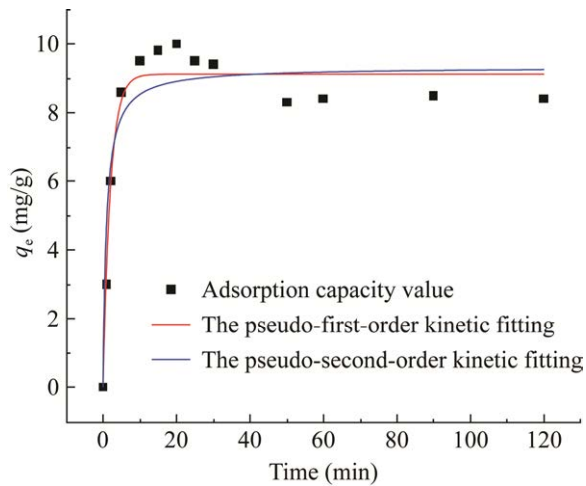


图 6 菌株 12-6 吸附 ZEN 的准一级、准二级动力学模型图

Figure 6 The pseudo-first-order and second-order modeling plots for ZEN adsorption by strain 12-6.

根据菌株 12-6 对 ZEN 吸附时间的数据结果, 利用 q_e 与 t 作图可得到准一级及准二级动力学方程。相关参数通过 q_e 对 t 的拟合线计算得出, R^2 分别为 0.96 和 0.93。说明菌株 12-6 对 ZEN 的吸附过程同时符合准一级动力学方程及准二级动力学方程, 吸附速率常数 k_1 为 $0.49 \text{ g}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 、 k_2 为 $0.11 \text{ g}/(\mu\text{g}\cdot\text{min})$ 。此结果证明吸附过程既存在物理吸附, 又存在化学吸附。同时该现象进一步证明了物理吸附和化学吸附是两种基本不同的吸附形式, 但它们可以在同一表面上同时发生。

2.2.3 吸附机理的探究结果

由图 7 可知, 灭活后的菌株吸附率高于活菌吸附率, 吸附率增加 20%。此结果也进一步证明了菌株消减 ZEN 是通过吸附作用来实现的。

如图 8A 所示, 菌株 12-6 在暴露出磷壁酸组分和肽聚糖组分后吸附率显著增加, 吸附率达到 90%。说明菌株 12-6 热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*) 在吸附 ZEN 的过程中磷壁酸组分和肽聚糖组分发挥主要作用。红外光谱进一步进

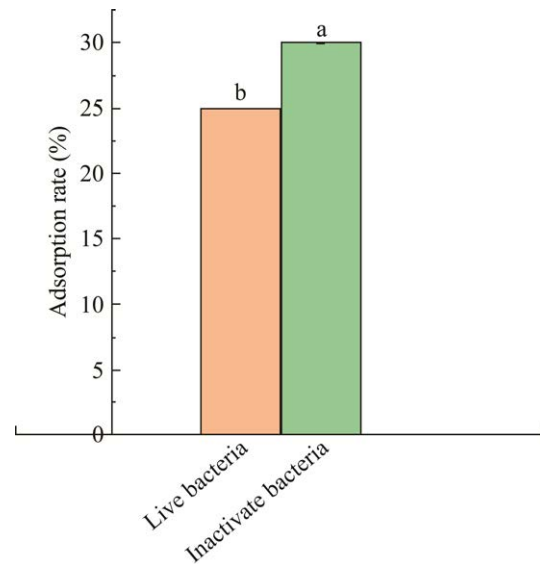


图 7 活菌与灭活菌吸附率对比图

Figure 7 Comparison of adsorption rate of live and inactivated bacteria.

行佐证。根据文献[26-27]的方法将谱带进行归属, 3284.77 cm^{-1} 处宽而强的吸收峰为缔合 O-H 伸缩振动峰和 N-H 的伸缩振动峰共同作用的结果; 2927.94 cm^{-1} 为脂肪族 CH_2 的 C-H 键的伸缩振动峰; 1652.99 cm^{-1} 为酰胺 I 带的 C=O 引起的伸缩振动峰, 1541.12 cm^{-1} 为酰胺 II 带 N-H 面内弯曲振动峰, 这两个峰为蛋白质的特征吸收峰; 1458.18 cm^{-1} 处为羧酸 COOH 中 C-O 的伸缩振动, 是糖类的特征峰; 1236.37 cm^{-1} 为 C-N 的伸缩振动峰; 1037.70 cm^{-1} 为脂类的 C-O 伸缩振动和硫羰基的 C=S 伸缩振动峰共同作用的结果。由此可以推断, 菌株 12-6 存在 O-H、C-H、C=O、N-H、C-O 和 C=S 等基团, 这些基团大部分是蛋白质和糖类的特征基团。

对比暴露出磷壁酸组分(图 8B, 红线)和肽聚糖组分(图 8B, 蓝线)前后的红外光谱图可以看出, 菌株 12-6 暴露出磷壁酸组分后, O-H 的伸缩振动均红移 2.07 cm^{-1} , 峰形有明显变化, 说明部分羟基参与吸附, 使得形成的氢键部分

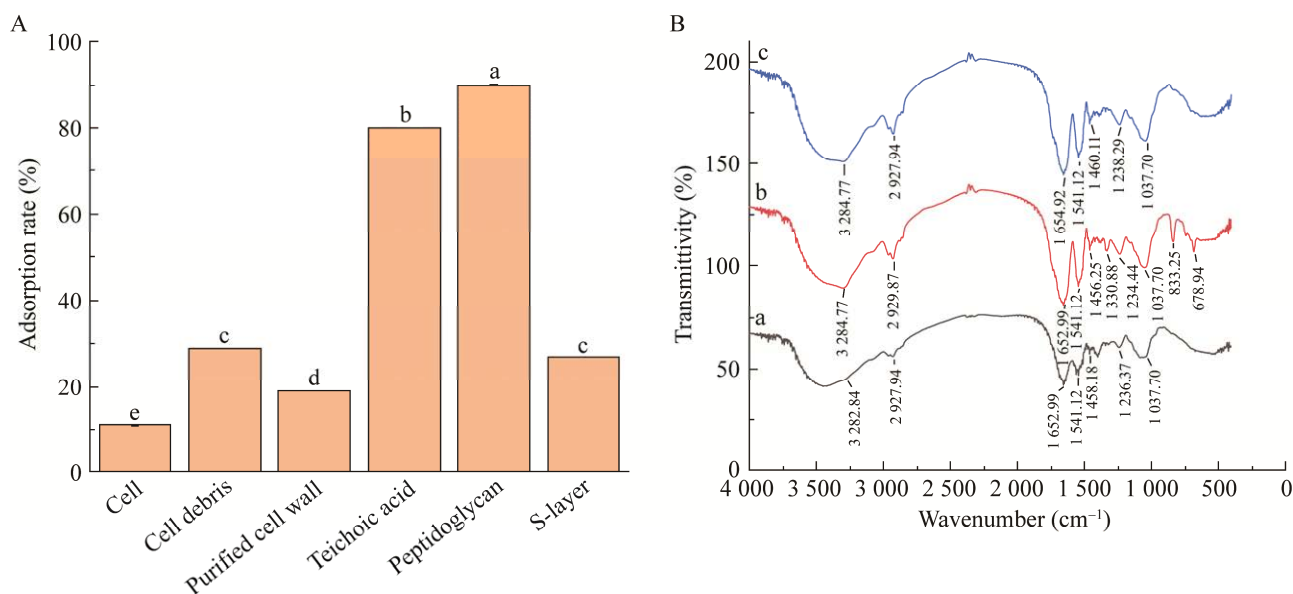


图 8 不同处理方式下菌体对 ZEN 的吸附率(A)及红外光谱图(B) 黑线: 活细胞. 红线: 磷壁酸. 蓝线: 肽聚糖

Figure 8 Adsorption rate of ZEN by bacteria under different treatments (A) and infrared spectroscopy (B). Black line: Living cell. Red line: Teichoic acid. Blue line: Peptidoglycan.

断开,引起羟基的伸缩振动最大峰位置红移;脂肪族 CH₂ 的 C-H 键伸缩振动红移 1.93 cm⁻¹;酰胺 I 带的 C=O 的伸缩振动无变化;羧酸 COOH 中 C-O 的伸缩振动分别发生蓝移和红移,这种位移归属于与羧基阴离子抗衡阳离子的改变;C-N 的伸缩振动分别蓝移 1.93 cm⁻¹、红移 1.92 cm⁻¹;硫羰基的 C=S 键伸缩振动无变化。值得注意的是,用 0.1 mol/L HCl 暴露出磷壁酸组分后,在 500–1 000 nm 波长内出现新增谱带(833.25 cm⁻¹),表明 HCl 破坏了菌体,暴露出菌体细胞壁表面结构,进一步证实菌株 12-6 对 ZEN 的吸附作用是在细胞壁内进行。

3 讨论

玉米赤霉烯酮作为真菌毒素的一种,是动物饲料中检出率最高的毒素。本试验首先以老面作为分离来源筛选获得 63 株乳酸菌,复筛得

到 3 株具有消减作用的菌株。其中两株具有降解活性,为短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*),分别命名为 6-8 和 18-2,降解率分别达到 85.5%和 87.3%。由于其代谢产物为雌激素毒性更强的 α -ZEL,因此不做深入探究。另外一株具有吸附活性,为热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*) 12-6。醋杆菌是好氧型细菌,其次生代谢产物可调节肠道菌群,具有益生作用^[28],近年来多用于工业和畜牧业等方面的研究,目前鲜见消减真菌毒素方面的研究报道。因此,醋杆菌在未来粮食作物中的脱毒应用也是一个极具潜力的研究方向。本试验筛选的菌株种属与 Cuamatzin-garcía 等^[29]的发现一致,在亚洲发酵食品中最常见的微生物主要为植物乳酸菌、短乳酸杆菌、醋酸杆菌和肠杆菌。

热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*) 12-6 在 pH 6.4 的 MRS 培养基中,30 °C、220 r/min 共

脱毒培养 24 h, 20 min 内吸附率达到 62.9%。吸附初始阶段吸附速度快的主要原因是菌体表面有足够的可吸附位点, 并且此时溶液与细胞表面的离子浓度梯度较高, 有利于离子向细胞表面迁移。随着时间的增加, 菌体表面的吸附位点逐渐达到饱和状态, 从而吸附速率降低^[30]。在菌体量一致的情况下, ZEN 浓度在 1–10 mg/L 范围内, 菌体吸附率随着浓度的增大呈现下降的趋势; 在 ZEN 浓度一定的条件下, 随菌体浓度的降低, 吸附率呈下降趋势, 且趋于稳定。这种变化趋势与 Fuchs 等^[31]研究结果一致。在试验时间内, 菌株 12-6 对 ZEN 的吸附动力学同时符合准一级及准二级动力学模型, R^2 分别达到 0.96 和 0.93。准一级动力学模型与物理吸附假设有关, 准二级动力学模型与化学吸附假设有关^[32], 因此菌株 12-6 吸附 ZEN 是物理与化学同时作用的过程, ZEN 可以与菌株 12-6 菌体细胞壁内官能团相互作用而被吸附在表面, 也可以通过与细菌间的静电引力被吸附在细菌表面^[33]。灭活后吸附率升高 20%, 进一步证明吸附作用。暴露出各细胞组分后发现, 菌株 12-6 主要依靠细胞壁中的磷壁酸和肽聚糖组分进行吸附。通过暴露吸附位点前后的红外光谱分析进一步证明, 菌株 12-6 存在 O–H、C–H、C=O、N–H、C–O 和 C=S 等官能团, 即热带醋杆菌 (*Acetobacter tropicalis*) 12-6 在对 ZEN 的吸附过程中, 羟基、次甲基、羧基、酰胺基作为主要官能团参与吸附。

4 结论

本试验分离筛选出 3 株具有优秀消减能力的乳酸菌。其中菌株 6-8 和 18-2 为短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*), 对玉米赤霉烯酮具有较强降解作用; 菌株 12-6 为热带醋杆菌 (*Acetobacter tropicalis*), 该菌株对玉米赤霉烯酮

的吸附率达到 62.9%。吸附动力学符合准一级及准二级动力学模型, 吸附位点为细胞壁上的磷壁酸及肽聚糖分子。本研究为乳酸菌清除食品和饲料中有害物质的应用提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] 隋凯, 李军, 郑江. 多功能柱净化-高效液相色谱法检测谷物中的玉米赤霉烯酮[J]. 分析实验室, 2006, 25(1): 99-102.
SUI K, LI J, ZHENG J. Determination of zearalenone in cereal grains by high performance liquid chromatography with multifunction cleanup column[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2006, 25(1): 99-102 (in Chinese).
- [2] 马传国, 王英丹. 玉米赤霉烯酮污染状况及毒性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 122-128.
MA CG, WANG YD. Research progress on pollution status and toxicity of zearalenone[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2017, 38(1): 122-128 (in Chinese).
- [3] PLEADIN J, SOKOLOVIĆ M, PERŠI N, ZADRAVEC M, JAKI V, VULIĆ A. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia[J]. Food Control, 2012, 28(1): 94-98.
- [4] 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.
- [5] LOI M, FANELLI F, LIUZZI V, LOGRIECO A, MULÈ G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives[J]. Toxins, 2017, 9(4): 111.
- [6] 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.
- [7] 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 FR, CHEN JH, JIA SH, YAO CY, LI RJ, DENG YQ, WEN JK. Screening and performance evaluation of a zearalenone-degrading bacterial isolate PA26-7[J].

- Microbiology China, 2023, 50(8): 3404-3416 (in Chinese).
- [8] 潘佳雯. 戊糖片球菌 XY46 对玉米赤霉烯酮脱毒效果的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2019. PAN JW. Study on detoxification effect of *Pediococcus pentosaceus* XY46 on zearalenone[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [9] 陈漪汶. 吸附玉米赤霉烯酮乳酸菌的筛选和黑水虻对呕吐毒素的耐受及积累量[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2022. CHEN YW. Screening of a lactic acid bacteria to the adsorption of zearalenone and the tolerance and accumulation of deoxynivalenol in Black Soldier Fly[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [10] VEGA MF, DIEGUEZ SN, RICCIO B, ARANGUREN S, GIORDANO A, DENZOIN L, SORACI AL, TAPIA MO, ROSS R, APÁS A, GONZÁLEZ SN. Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(4): 715-723.
- [11] KRÓL A, POMASTOWSKI P, RAFIŃSKA K, RAILEAN-PLUGARU V, WALCZAK J, BUSZEWSKI B. Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* sp.[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(3): 943-952.
- [12] SANGSILA A, FAUCET-MARQUIS V, PFOHL-LESZKOWICZ A, ITSARANUWAT P. Detoxification of zearalenone by *Lactobacillus pentosus* strains[J]. Food Control, 2016, 62: 187-192.
- [13] ZOGHI A, KHOSRAVI-DARANI K, SOHRABVANDI S. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics[J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2014, 14(1): 84-98.
- [14] NIDERKORN V, MORGAVI DP, ABOAB B, LEMAIRE M, BOUDRA H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(3): 977-985.
- [15] KATINA K, MAINA NH, JUVONEN R, FLANDER L, JOHANSSON L, VIRKKI L, TENKANEN M, LAITILA A. *In situ* production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough[J]. Food Microbiology, 2009, 26(7): 734-743.
- [16] IMADE FN, HUMZA M, DADA OA, ULLAH S, JAHAN I, ESEIGBE D, GENG HR, ZHENG YQ, XING FG, LIU Y. 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.
- [17] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [18] 叶金, 吴宇, 辛媛媛, 周明慧, 谢刚, 王松雪. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速精准测定粮食中多种真菌毒素[J]. 分析测试学报, 2017, 36(4): 449-456. YE J, WU Y, XIN YY, ZHOU MH, XIE G, WANG SX. Determination of mycotoxins in cereals by UPLC-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(4): 449-456 (in Chinese).
- [19] 葛娜. 失活微生物细胞去除橙汁中链格孢霉素 TeA 的分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018. GE N. Molecular mechanism of alternaria toxin tenuazonic acid from citrus juice by inactivated microbial cells[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [20] 丽丽. 粘质红酵母菌 WT6-5 对水中 Pb²⁺ 的耐受性及吸附作用研究[D]. 沈阳: 东北大学硕士学位论文, 2016. LI L. Study on heavy metal resistance and biosorption of lead (II) ions from aqueous solution by WT6-5[D]. Shenyang: Master's Thesis of Northeastern University, 2016 (in Chinese).
- [21] ADÁCSI C, KOVÁCS S, PÓCSI I, PUSZTAHELYI T. Elimination of deoxynivalenol, aflatoxin B₁, and zearalenone by Gram-positive microbes (firmicutes)[J]. Toxins, 2022, 14(9): 591.
- [22] MOLINA-MOLINA JM, REAL M, JIMENEZ-DIAZ I, BELHASSEN H, HEDHILI A, TORNÉ P, FERNÁNDEZ MF, OLEA N. Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using *in vitro* receptor-specific bioassays[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2014, 74: 233-239.
- [23] EZE UA, HUNTRISS J, ROUTLEDGE MN, GONG YY, Connolly L. The effect of individual and mixtures of

- mycotoxins and persistent organochloride pesticides on oestrogen receptor transcriptional activation using *in vitro* reporter gene assays[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 130: 68-78.
- [24] 张梦梅. 益生菌吸附氯氰菊酯特性及机理的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG MM. Study on the adsorption characteristics and mechanisms of cypermethrin by probiotics[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [25] AKAR T, GÜRAY T, YILMAZER DT, TUNALI AKAR S. Biosorptive detoxification of zearalenone biotoxin by surface-modified renewable biomass: process dynamics and application[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(4): 1850-1861.
- [26] KRISTOFFERSEN KA, MÅGE I, WUBSHET SG, BÖCKER U, RIISER DANKEL K, LISLELID A, RØNNINGEN MA, AFSETH NK. FTIR-based prediction of collagen content in hydrolyzed protein samples[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 301: 122919.
- [27] GE N, XU JJ, PENG BZ, PAN SY. Adsorption mechanism of tenuazonic acid using inactivated lactic acid bacteria[J]. *Food Control*, 2017, 82: 274-282.
- [28] 陈霏瑶, 郑钢, 童雨翠, 刘梦瑶, 程强, 张日俊. 醋杆菌研究进展及其应用前景[J]. *饲料工业*, 2021, 42(24): 13-17.
CHEN PY, ZHENG G, TONG YC, LIU MY, CHENG Q, ZHANG RJ. Research progress and application prospect of *Acetobacter*[J]. *Feed Industry*, 2021, 42(24): 13-17 (in Chinese).
- [29] CUAMATZIN-GARCÍA L, RODRÍGUEZ-RUGARCÍA P, EL-KASSIS EG, GALICIA G, de LOURDES MEZA-JIMÉNEZ M, del ROCÍO BAÑOS-LARA M, ZARAGOZA-MALDONADO DS, PÉREZ-ARMENDÁRIZ B. Traditional fermented foods and beverages from around the world and their health benefits[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6): 1151.
- [30] 张楠, 杨洁秋, 蔡思恒, 陈欣欣, 彭堂见, 杨飞. *Sphingopyxis* sp. YF1 吸附镉的特性及其机制[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(8): 3330-3344.
ZHANG N, YANG JQ, CAI SH, CHEN XX, PENG TJ, YANG F. Characteristics and mechanisms of cadmium adsorption by *Sphingopyxis* sp. YF1[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(8): 3330-3344 (in Chinese).
- [31] FUCHS S, SONTAG G, STIDL R, EHRLICH V, KUNDI M, KNASMÜLLER S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria[J]. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2008, 46(4): 1398-1407.
- [32] 张蓉蓉. 三种典型土壤胶体与耐性细菌对镉铅的吸附解吸特性研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG RR. Study on adsorption and desorption characteristics of cadmium and lead by three typical soil colloids and tolerant bacteria[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2020 (in Chinese).
- [33] 李兰松. 重金属吸附菌的选育、吸附特性和机理研究[D]. 太原: 太原理工大学博士学位论文, 2016.
LI LS. Breeding, adsorption characteristics and mechanism of heavy metal adsorption bacteria[D]. Taiyuan: Doctoral Dissertation of Taiyuan University of Technology, 2016 (in Chinese).