

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2024.05.019

张璐瑶, 范志勇, 王永伟, 等. 复合益生菌固态发酵脱除小麦和玉米中呕吐毒素的效果研究[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(5): 151-159.

ZHANG L Y, FAN Z Y, WANG Y W, et al. Study on the effect of solid-state fermentation with compound probiotics on removing deoxynivalenol from wheat and corn[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(5): 151-159.

复合益生菌固态发酵脱除小麦和玉米中呕吐毒素的效果研究

张璐瑶^{1,2}, 范志勇¹, 王永伟², 王丽², 施晶晶², 李爱科², 何贝贝²✉

(1. 湖南农业大学 动物科学技术学院, 湖南 长沙 410125;

2. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮食品质营养研究所, 北京 100037)

摘要: 为获得高效脱除小麦和玉米中呕吐毒素 (DON) 的复合益生菌组合, 验证其固态发酵的脱毒效果, 用高效液相色谱法对筛选出的菌体脱除、吸附、降解 DON 的含量进行测定。结果表明, 在液态基质中, 戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌脱除 DON 效果最好, 且脱毒率随反应时间增加而增大, 24 h 单菌脱毒率最高分别达 79.62%、62.22% 和 82.75%。对不同处理液中 DON 含量测定, 可知 3 株菌对 DON 的脱除均以吸附作用为主, 且 DON 解吸附率低于 15%。在复合菌固态发酵体系中, 戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌的接种量分别为 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 CFU/g 时, 对 DON 污染小麦的脱毒率最高, 可达 79.49%; 当接种量分别为 1×10^6 、 1×10^8 和 1×10^7 CFU/g 时, 对 DON 和玉米赤霉烯酮联合污染玉米的脱毒率最高分别达 61.54% 和 78.15%。此外, 三株菌联合固态发酵可提高毒素污染小麦和玉米的粗蛋白质、降低粗纤维含量。在液态基质和固态发酵体系中确定了可高效脱除 DON 的益生菌组合并初步探明其脱毒机制, 为真菌毒素污染谷物固态发酵脱毒提供了一定理论及应用基础。

关键词: 呕吐毒素; 益生菌; 吸附; 固态发酵; 玉米; 小麦

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2024)05-0151-09

网络首发时间: 2024-05-13 16:27:02

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20240827.1507.016>

Study on the Effect of Solid-state Fermentation with Compound Probiotics on Removing Deoxynivalenol from Wheat and Corn

ZHANG Lu-yao^{1,2}, FAN Zhi-yong¹, WANG Yong-wei², WANG Li²,
SHI Jing-jing², LI Ai-ke², HE Bei-bei²✉

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410125, China; 2. Institute of Food Quality and Nutrition, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 国家重点研发计划专项 (2021YFD1300300)

Supported by: National Key Research and Development Project of China (No. 2021YFD1300300)

作者简介: 张璐瑶, 女, 1999 年出生, 在读硕士生, 研究方向为动物营养, E-mail: 545483011@qq.com

通信作者: 何贝贝, 女, 1990 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为粮油饲料资源开发与益生菌应用, E-mail: hbb@ags.ac.cn

Abstract: The study aimed to identify an effective probiotic combination for the removal of deoxynivalenol (DON) from wheat and corn, and to verify the detoxification effect of solid-state fermentation. The content of DON removed, adsorbed, and degraded by the selected strains was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that in the liquid matrix, the detoxification rate increased with the reaction time and was higher for *Streptococcus pentosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus plantarum* among all the bacteria. After 24 hours, the maximum detoxification rates of the individual strains reached 79.62%, 62.22%, and 82.75%, respectively. Measurement of DON content in different treatment solutions revealed that the removal of DON by the three strains was primarily due to adsorption, with a DON desorption rate of less than 15%. In the solid-state fermentation system, the highest detoxification rate of DON-contaminated wheat could reach 79.49%, when the inoculation amount of three strains were 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 CFU/mL. The highest detoxification rates for DON- and zearalenone-contaminated corn achieved 61.54% and 78.15%, respectively, when the inoculation amount of three strains were 1×10^6 , 1×10^8 and 1×10^7 CFU/mL. In addition, the combined solid-state fermentation of the three strains increased the crude protein and reduced the crude fibre content of toxin-contaminated wheat and corn. This study identified compound probiotics that can efficiently remove DON in liquid substrates and solid-state fermentation systems, and preliminarily explored their detoxification mechanisms, which could provide a theoretical and practical basis for the detoxification of grains contaminated with mycotoxins through solid-state fermentation.

Key words: DON; probiotics; adsorption; solid state fermentation; corn; wheat

呕吐毒素又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON), 分子式 $C_{15}H_{20}O_6$, 相对分子质量 296.3, 主要包括禾谷镰刀菌产生的 B 型单端孢霉和环氧-倍半萜类化合物。近年来我国饲料中 DON 污染日趋严重, 动物摄入 DON 污染的饲料后主要表现为腹泻、呕吐、采食量降低、体重减轻、免疫系统紊乱等症状, 并最终通过动物产品对人体健康产生严重危害^[1]。DON 性质稳定, 有很强的耐高温和耐酸碱性, 因此在一般的饲料加工生产过程中不易将其灭活^[2]。常见的 DON 脱毒方法有物理、化学和生物法等, 其中, 生物脱毒技术由于具有反应条件温和、特异性强及脱毒效率高等特性, 已经成为解决毒素污染的重要手段^[3]。

生物脱毒法按作用机制主要分为生物吸附和生物降解^[4-5]。其中, 生物吸附脱毒是利用生物材料的吸附作用将 DON 去除, 主要以酵母为主^[6-7]。部分乳酸菌对 DON 也起一定吸附作用, 如副干酪乳杆菌 LHZ-1 的细胞壁可与 DON 形成复合物, 在 24 h 内使反应液中 DON 的含量降低 40.7%^[6]。一些丝状真菌的菌丝体也可以吸附 DON, 如曲霉在反应 96 和 240 h 后对 DON 的吸附率最高可分别达到 74% 和 90%^[8]。生物降解主要是利用微生物

或其产生的酶对 DON 的主要毒性基团 C-12,13 环氧基和 C3-OH 基团进行结构的改变或破坏, 并将 DON 转化为无毒或低毒的物质。例如 Gao 等^[9]在鸡肠中发现了一株可以将 DON 去氧化成 DOM-1 的革兰氏阳性非芽孢杆 *Slackia* sp. D-G6, 在培养基中可将 25 mg/L DON 在 48 h 内完全转化为 DOM-1; He 等^[10]在麦田土壤中筛选得到了可将 DON 降解为 DOM-1 的混合菌群 PGC-3, 经过 16S rDNA 测序发现该菌群由 10 个属构成, 起主要作用的是脱亚硫酸杆菌属细菌。

我国农业农村部规定, 凡生产、经营和使用的营养性饲料添加剂及一般饲料添加剂均应符合《饲料添加剂品种目录》中规定的品种, 其中规定允许添加的与脱毒直接相关的微生物及酶的种类极为有限, 而常用粘土类吸附剂又存在着吸附营养物质、易解吸附等缺点。因此, 本研究在常见的饲用益生菌中筛选出高效脱除谷物中呕吐毒素的脱毒菌, 在液态基质中对其脱毒机理进行初步研究, 并在固态发酵体系中验证其对真菌毒素污染小麦和玉米中 DON 的脱毒效果, 从而为益生菌固态发酵脱除饲料中 DON 提供一定参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

DON 污染小麦 (DON 2 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、DON 和玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 联合污染玉米 (DON 3 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ZEN 1 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$): 牧原食品股份有限公司。

戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*): 国家和粮食物资储备局科学研究院粮食品质营养研究所保存。

德曼-罗戈萨-夏普 (MRS) 培养基; Luria-Bertani (LB) 培养基; 酵母培养基: 葡萄糖 1%、蛋白胨 1%、酵母提取物 0.5%。以上培养基均在使用前于 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

色谱纯乙腈、甲醇: Dikma 公司, DON、ZEN 标准品: 青岛普瑞邦有限公司。呕吐毒素和玉米赤霉烯酮免疫亲和柱: 北京华安麦科生物技术有限公司。

1.2 液态基质中单菌脱毒率的测定

将实验室保存的菌株活化后制备种子液, 并在培养至稳定期后分别按 2% 接种量接入 5 mL 新鲜培养基中 (植物乳杆菌和戊糖片球菌: MRS 培养基、37 $^{\circ}\text{C}$; 酿酒酵母: 酵母培养基、28 $^{\circ}\text{C}$; 嗜热链球菌、枯草芽孢杆菌: LB 培养基、32 $^{\circ}\text{C}$), 同时加入 DON 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对照组用等体积的培养基代替菌液, 280 r/min 摇瓶培养 4、8、12、16、20、24 和 48 h 后, 加入等体积乙腈浸提, 8 000 r/min 离心 3 min, 取 1 mL 上清待测 DON 含量。

将 DON 标准品溶解于乙腈溶液, 配制成 0.1、0.5、1.0、5.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液, 绘制毒素标准曲线。色谱柱: C18 柱, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 填料直径 5 μm ; 柱温: 室温; 流动相: 超纯水和 99.9% 色谱级乙腈 (超纯水: 乙腈=9:1); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 218 nm; 进样量: 20 μL 。待测样品过 0.22 μm 滤膜后取 1 mL 上机待测。

DON 标准曲线: $y=0.064\ 40x+101.070\ 59$, $R^2=0.999\ 97$, x 为峰面积 ($\text{mv}\cdot\text{S}$), y 为 DON 浓度 (ng/mL), 标准曲线在 (500~2 000) ng/mL 浓度范围内线性关系良好。

脱毒率 = (对照组 DON 含量 - 处理组 DON 含量) / 对照组 DON 含量 \times 100%。

1.3 呕吐毒素脱毒菌的脱毒机制研究

1.3.1 吸附作用

将培养至稳定期的 100 mL 菌液分为 2 份, 1 份于 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min, 另 1 份 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存。2 份样品离心后取细胞沉淀, 用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次后重悬, 加入 DON 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并分别于相应温度下 280 r/min 摇瓶培养, 反应 0、24、48 h 时取样, 生理盐水清洗 2~3 次后离心得细胞沉淀, 加入乙腈充分浸提残余细胞中 DON, HPLC 上机测定 DON 含量。每个样品 3 个重复。

1.3.2 降解作用

取培养至稳定期的菌液 50 mL, 9 000 r/min 离心 10 min, 上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 下层菌体用 Tris-HCL (pH=7.4) 洗涤 3 次后重悬, 菌体经细胞破碎机破碎 5~6 次, 于 12 000 r/min 离心 10 min 除去细胞碎片, 得到细胞内容物。将上清液与细胞内容物分别进行如下处理: (1) 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存; (2) 沸水浴处理 2 h。处理后的样品在无菌条件下过 0.22 μm 水系滤膜, 加入 DON 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别于相应温度下 280 r/min 摇瓶培养, 反应 0、24、48 和 72 h 时取样, HPLC 上机测定 DON 含量。同时将 Tris-HCL 缓冲液加入等量的 DON 作为空白对照。

1.4 呕吐毒素脱毒菌的吸附和解吸附特性

1.4.1 吸附效果

用胃蛋白酶和磷酸钾缓冲液配置模拟胃液 (量取浓盐酸 3.84 mL 加入 800 mL 的超纯水中, 准确称取 20 g 的固体胃蛋白酶一起摇匀后移入 1 000 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度), 加入 DON 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、280 r/min 进行吸附实验, 并分别于 30、60、90、120 和 180 min 时离心取上清, HPLC 上机测定 DON 含量, 根据 DON 的标准曲线计算吸附率。

1.4.2 解吸附效果

向上述反应结束离心后的沉淀中加入人工肠

液（称取固体 KH_2PO_4 6.8 g 溶解于 500 mL 超纯水中，使用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 6，准确称取 10 g 胰酶使用适量水溶解，将两种溶液均匀移入 1 000 mL 容量瓶中用水定容至刻度），加入 DON 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，37 $^\circ\text{C}$ 、280 r/min 进行解吸实验，并分别于 60、120、180、240 和 300 min 时离心取上清，HPLC 上机测定 DON 含量。

1.5 小麦和玉米固态发酵脱毒效果评价

1.5.1 正交实验设计

将筛选出的益生菌菌株分别活化，280 r/min 震荡培养 24 h 制备发酵菌液。以戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌为单因素，在之前研究的基础上，确定接种量即各单菌接种量分别为 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU/mL 为接种水平，以 DON 脱除率为指标，设计 L9 (3^4) 正交实验（表 1~2）。

表 1 因素水平表
Table 1 Table of factor levels

水平	戊糖片球菌	酿酒酵母	植物乳杆菌
1	1×10^6	1×10^6	1×10^6
2	1×10^7	1×10^7	1×10^7
3	1×10^8	1×10^8	1×10^8

表 2 正交实验设计表
Table 2 Table of orthogonal experimental designs

编号	戊糖片球菌	酿酒酵母	植物乳杆菌
1	1	1	1
2	1	2	3
3	1	3	2
4	2	1	3
5	2	2	2
6	2	3	1
7	3	1	2
8	3	2	1
9	3	3	3

1.5.2 态发酵脱毒率测定

分别取粉碎后的毒素污染小麦或玉米 100 g 于烧杯中，设置发酵时间 48 h、发酵温度 32 $^\circ\text{C}$ 、料水比 1 : 0.6、总菌接种量 1×10^7 CFU/g，发酵后的样品 60 $^\circ\text{C}$ 烘干、粉碎后，参照 GB/T 30956—2014《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》和 GB/T 28716—2012《饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》测定 DON 和 ZEN 含量。

1.5.3 粗蛋白质和粗纤维的测定

参照 GB/T 6432—2018《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》测定粗蛋白质（Crude protein, CP）含量；参照 GB/T 6434—2022《饲料中粗纤维的含量测定》测定粗纤维（Crude fiber, CF）含量。

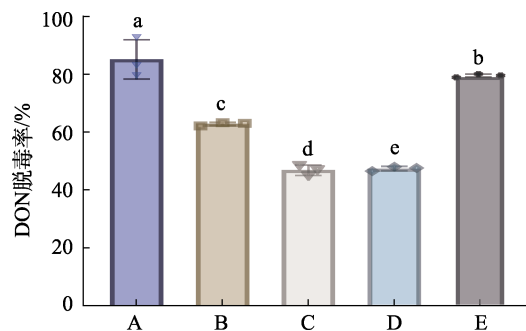
1.6 数据处理

实验结果用 SPSS 22.6 进行统计分析，结果用平均值 \pm 标准差表示，用 Turkey 法对数据进行差异性分析， $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与讨论

2.1 呕吐毒素脱毒菌的筛选及脱毒率的测定

将实验室保存的戊糖片球菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌按 1.2.1 的方法在含有 DON 的液态培养基中反应 24 h，由图 1 可知，植物乳杆菌脱毒率最高为 82.75%，戊糖片球菌脱毒率为 79.62%，酿酒酵母脱毒率为 62.22%，高于其他菌株的 DON 脱毒率。植物乳杆菌主要通过菌体细胞壁的疏水性及电子供体-受体和酸碱的相互作用脱除 DON。文献报道，多株乳酸菌和酵母菌也被证实具有脱除真菌毒素的作用^[11-13]。Nathanail 等^[14]实验结果表明，巴斯德酵母在发酵过程中通过与 DON 的 C3 位羟基糖基化后可生成 D3G（DON-3-O-glucoside, D3G），DON 和 D3G 均可被酵母细胞壁吸附。Niderkorn 等^[15]将包括乳酸杆菌、乳酸球菌、明串珠菌、丙



注：A：植物乳杆菌 B：酿酒酵母 C：嗜热链球菌 D：枯草芽孢杆菌 E：戊糖片球菌，不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

Note: A: *Lactobacillus plantarum* B: *Saccharomyces cerevisiae* C: *Streptococcus thermophilus* D: *Bacillus subtilis* E: *Pentosaccharomyces cerevisiae*, different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$), same as below.

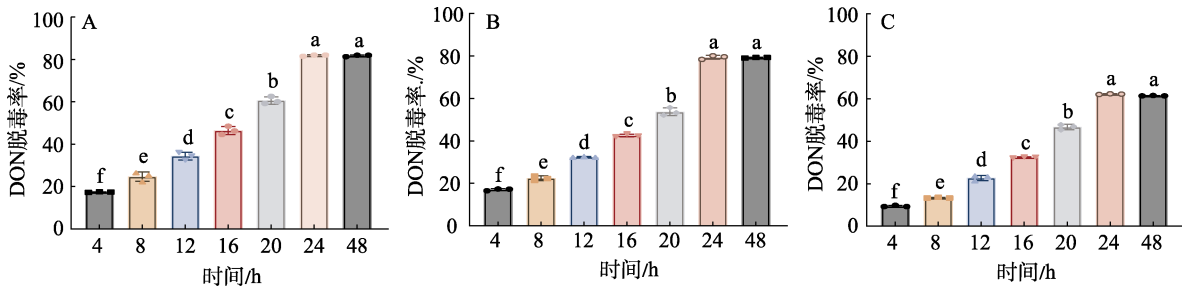
图 1 单菌液态发酵 DON 脱毒率

Fig.1 Single-bacteria liquid fermentation DON removal rate

酸杆菌、链球菌和肠球菌在内的 202 株菌株, 进行对 DON 生物转化和吸附能力测试, 实验结果表明: 以上这些菌株均不能生物代谢转化 DON, 但是大部分菌株能吸附 DON, 最高可吸附 33% 的 DON。

由图 2 可知, 在相同的条件下, 酿酒酵母的初始脱毒率较低, 4 h 时脱毒率仅为 9.47%, 12 h 后增幅变大, 脱毒率增高; 植物乳杆菌和戊糖片

球菌分别在反应 24 h 时脱毒率可达 82.75% 和 79.62%, 之后脱毒率则趋于稳定, 即本研究所筛选出的 3 株脱毒菌株在液态基质中对 DON 的脱除率在 24 h 内, 随反应时间增加而不断提高, 可能是因为菌体细胞对毒素的脱除作用随反应时间的增加而逐渐增强, 在 24 h 达到最高, 随后保持稳定状态^[2,16]。



注: A: 植物乳杆菌 B: 戊糖片球菌 C: 酿酒酵母。

Note: A: *Lactobacillus plantarum* B: *Pentosaccharomyces cerevisiae* C: *Saccharomyces cerevisiae*.

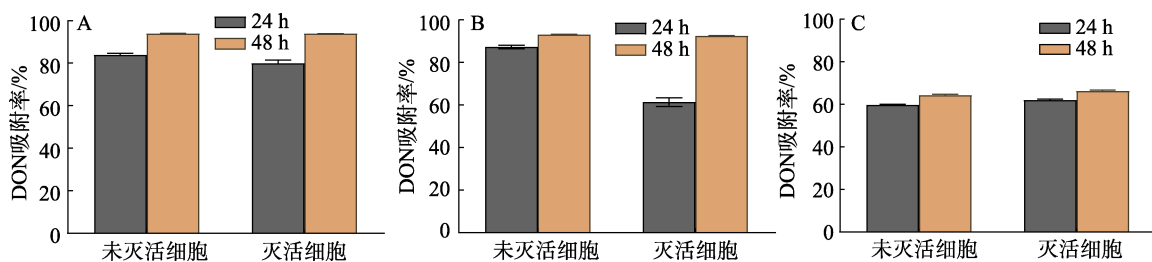
图 2 不同反应时间菌株脱毒率

Fig.2 Detoxification rate of the three strains over time

2.2 呕吐毒素脱毒菌的脱毒机制研究

通过对不同处理条件下菌株细胞壁对 DON 的吸附率, 图 3 可以看出, 在共培养一段时间后 3 株菌的活细胞和失活细胞中都含有 DON, 不同处理条件下对 DON 都能迅速吸附, 共培养 24~48 h 时吸附率可达到最大, 灭活细胞的吸附量略高于未灭活的细胞但并不显著 ($P>0.05$)。其中, 酿酒酵母和植物乳杆菌灭活细胞的吸附率约为 90%, 戊糖片球菌灭活细胞的吸附率约为 65%。

这可能是由于植物乳杆菌和戊糖片球菌均为革兰阳性菌, 肽聚糖层较厚, 其—OH、—NH 等基团空隙较大, 有利于 DON 的进入和结合; 酿酒酵母是一种单细胞微生物, 属于兼性厌氧菌, 其水解后, 细胞壁中的甘露低聚糖、葡聚糖等成分充分暴露, 能够与 DON 结合^[16]。此外, 热处理使得菌体细胞壁肽聚糖和多聚糖的肽键或者糖苷键断裂, 使肽聚糖结构边薄而孔径增大, 菌体对毒素的吸附能力增加^[17]。



注: A: 酿酒酵母 B: 植物乳杆菌 C: 戊糖片球菌。

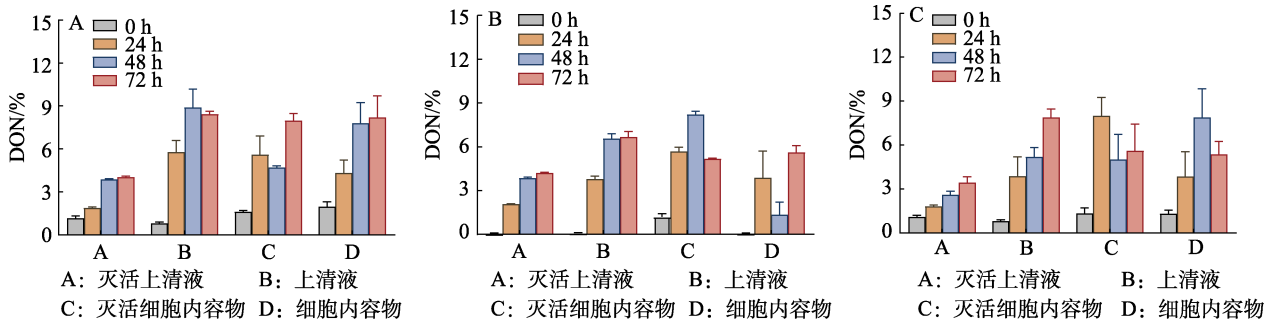
Note: A: *Saccharomyces cerevisiae* B: *Lactobacillus plantarum* C: *Pentosaccharomyces schizococcus*.

图 3 脱毒菌株对 DON 的吸附率

Fig.3 Adsorption rate of DON by detoxified strains of bacteria

3 株菌 DON 脱毒活性物质定位研究结果见图 4。可以看出, 在含 DON 的液态基质中培养 72 h 后, 3 株菌的上清液和细胞内容物中 DON 含量略有下降, 但 DON 降解率不足 10%。据此

推测, 3 株菌对 DON 的降解作用较弱, 结合吸附研究结果, 说明 3 株菌对 DON 的脱除主要以吸附作用为主, 与尹鹏等^[18]、刘畅等^[19]的研究结果一致。



注：A：戊糖片球菌 B：植物乳杆菌 C：酿酒酵母。

Note: A: *Pentosaccharomyces cerevisiae* B: *Lactobacillus plantarum* C: *Saccharomyces cerevisiae*.

图 4 脱毒菌株对 DON 的降解率

Fig.4 Degradation rate of DON by detoxified strains of bacteria

2.3 呕吐毒素脱毒菌吸附和解吸附作用

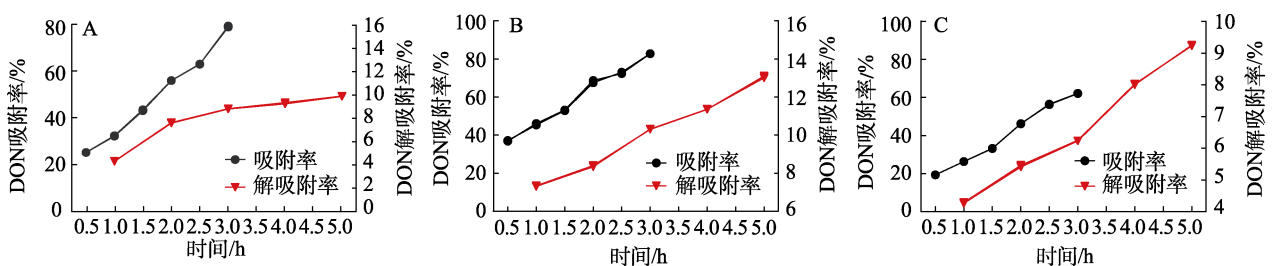
微生物对真菌毒素的吸附率与其细菌种类和浓度有关，且部分微生物的细胞壁结构对毒素的吸附作用具有可逆性^[20]。因此，本研究测定了在模拟胃肠液中所筛选的 3 株菌对 DON 的吸附及解吸附率，结果见图 5。可以看出，共培养一段时间后，3 株菌在模拟胃液中对 DON 的吸附率逐渐增高，在 3 h 时达到最高，戊糖片球菌和植物乳杆菌对 DON 脱除率可达到 80%左右，酿酒酵母对 DON 脱除率可达到 65%；而在模拟肠液中反应 300 min，3 株菌对 DON 的解吸附率不足 15%，表明 3 株菌在模拟胃肠液中可高效脱除 DON，同时对 DON 的解吸附率较低。

2.4 小麦和玉米固态发酵脱毒效果评价

将筛选出的 3 株菌株进行混菌发酵接种量及单菌比例实验，由表 3 可知，影响小麦 DON 含量的因素依次为酿酒酵母>戊糖片球菌>植物乳杆菌，综合极差分析结果，确定戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌单菌接种量分别为 1×10^7 、 1×10^8 、

1×10^6 CFU/g 时，对毒素小麦中的 DON 脱毒率最高，可达到 79.49%。梁含等^[21]用植物乳酸菌和枯草芽孢杆菌混合发酵可降解麸皮中 71% 的 DON，田祖光等^[22]用筛选到的一株枯草芽孢杆菌发酵对麸皮中 DON 的降解率为 73.25%，在本研究中 3 株益生菌复合发酵对小麦中 DON 脱毒率最高达 79.49%，说明所筛选的 3 株益生菌在谷物固态发酵脱除 DON 上取得了较好的效果。

饲料原料普遍存在多种真菌毒素共存污染的现象，本研究利用筛选出的 3 株菌对 DON 和 ZEN 联合污染的玉米进行固态发酵，由表 4~5 可知，戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌单菌接种时对 DON 的脱毒率分别为 33.45%、28.03% 和 25.73%；单菌接种量分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 CFU/g 时，对玉米中的 DON 脱毒率最高可达 61.54%；3 株菌单菌接种量均在 1×10^8 CFU/g 时，对毒素玉米中 ZEN 脱毒率最高可达 78.15%。郭瑞等^[23]筛选到一株蜡样芽孢杆菌 BL-17，对黄曲霉毒素、ZEN 和 DON 三种毒素降解率分别可达 74.38%、98.31% 和 39.66%。曹坤等^[24]筛选到一株



注：A 为戊糖片球菌，B 为植物乳杆菌，C 为酿酒酵母。

Note: A: *Pentosaccharomyces cerevisiae* B: *Lactobacillus plantarum* C: *Saccharomyces cerevisiae*.

图 5 脱毒菌对 DON 的吸附情况

Fig.5 Adsorption of DON by detoxifying bacteria

表 3 小麦 DON 脱毒正交实验结果统计表
 Table 3 Statistical table of results of wheat DON detoxification orthogonal test

	戊糖片 球菌	酿酒 酵母	植物乳 杆菌	脱毒率 1	脱毒率 2	脱毒率 3
1	1	1	1	37.03	40.82	43.10
2	1	2	3	47.94	47.72	49.79
3	1	3	2	50.81	50.92	50.55
4	2	1	3	52.67	49.92	52.26
5	2	2	2	55.71	57.70	57.34
6	2	3	1	79.22	79.75	79.50
7	3	1	2	55.65	57.35	59.64
8	3	2	1	50.62	56.76	55.87
9	3	3	3	61.75	62.99	61.28
K1	418.68	448.44	522.67			
K2	564.07	479.45	495.67			
K3	521.91	576.77	486.32			
k1	46.52	49.83	58.07			
k2	62.67	53.27	55.07			
k3	57.99	64.09	54.04			
R	16.15	14.26	4.04			
最佳组合	戊糖片 球菌 2	酿酒 酵母 3	植物乳 杆菌 1			

注：表中“K”、“k”、“R”为正交实验直观分析参数，“K”为正交表中竖列中不同水平所对应的测定值的和；“k”为“K”值的平均值；“R”为因素列中最大值与最小值的差。实验结果为干物质基础。脱毒率 1、2、3 为 3 个平行实验结果。下表同。

Note: In the table, “K”, “k” and “R” are the intuitive analysis parameters of the orthogonal test, and “K” is the sum of the measured values corresponding to different levels in the vertical columns of the table; “k” is the mean value of “K”; “R” is the difference between the maximum and minimum values in the factor columns. “K” is the sum of the measured values corresponding to different levels in the vertical columns of the table; “k” is the mean value of “K”; “R” is the difference between the maximum and minimum values in the factor columns. The results of the experiment are on a dry matter basis. The orthogonal text 1, 2, 3 were the result of 3 parallel experiments. Same as below.

解淀粉芽孢杆菌,对 DON 的降解率可达 92.440%,但这些菌种均不在《饲料添加剂品种目录》中,而本研究筛选出的 3 株菌均为常见益生菌,可广泛应用于饲料真菌毒素的脱除。3 株菌对玉米中 DON 的脱除率低于小麦中 DON 的脱除率,可能是玉米被 DON 和 ZEN 联合污染,而多种毒素污染的原料比单一毒素污染的原料脱毒更难所致^[25-26]。

对发酵后小麦 CP 和 CF 含量进行测定,结果如图 6 所示,即毒素小麦经 3 株益生菌联合固态发酵后,其中 CP 含量略有提高,CF 含量降低,说明所选 3 菌株联合发酵在有效脱除小麦中毒素的同时,对其常规营养成分并无太大影响^[27-28]。

刘永清等^[29]选用地衣芽孢杆菌、产朊假丝酵母和植物乳杆菌 3 株益生菌,通过优化接种量、料液比、原料添加量等因素,对残次枣粉固态发酵工

表 4 玉米 DON 脱毒正交实验结果统计表
 Table 4 Statistical table of the results of the orthogonal test of corn DON detoxification

	戊糖 片球菌	酿酒 酵母菌	植物 乳杆菌	DON 脱毒率 1	DON 脱毒率 2	DON 脱毒率 3
1	1	1	1	22.88	22.31	23.10
2	1	2	3	32.31	32.91	32.77
3	1	3	2	35.02	34.46	33.36
4	2	1	3	33.65	34.82	33.70
5	2	2	2	33.02	32.83	33.60
6	2	3	1	31.14	30.23	31.47
7	3	1	2	37.91	39.19	40.98
8	3	2	1	61.63	61.33	61.67
9	3	3	3	42.32	43.33	43.99
K1	269.12	288.54	345.76			
K2	294.46	382.07	320.37			
K3	432.35	325.32	329.80			
k1	29.90	32.06	38.42			
k2	32.72	42.45	35.60			
k3	48.04	36.15	36.64			
R	18.14	10.39	2.82			
最佳 组合	戊糖片 球菌 3	酿酒酵 母菌 2	植物乳 杆菌 1			

表 5 玉米 ZEN 脱毒正交实验结果统计表
 Table 5 Statistical table of the results of the orthogonal test of corn ZEN detoxification

编号	戊糖 片球菌	酿酒 酵母菌	植物 乳杆菌	ZEN 脱毒率 1	ZEN 脱毒率 2	ZEN 脱毒率 3
1	1	1	1	33.62	33.98	36.21
2	1	2	3	42.65	43.16	44.98
3	1	3	2	43.68	46.23	43.21
4	2	1	3	51.13	53.58	53.69
5	2	2	2	56.48	55.16	52.32
6	2	3	1	66.97	65.56	67.01
7	3	1	2	74.94	74.56	74.32
8	3	2	1	67.61	66.72	65.32
9	3	3	3	79.68	74.61	80.17
K1	367.72	486.03	503.00			
K2	521.90	494.40	520.90			
K3	657.93	567.12	523.65			
k1	40.86	54.00	55.89			
k2	57.99	54.93	57.88			
k3	73.10	63.01	58.18			
R	32.25	9.01	2.29			
最佳 组合	戊糖片 球菌 3	酿酒酵 母菌 3	植物乳 杆菌 3			

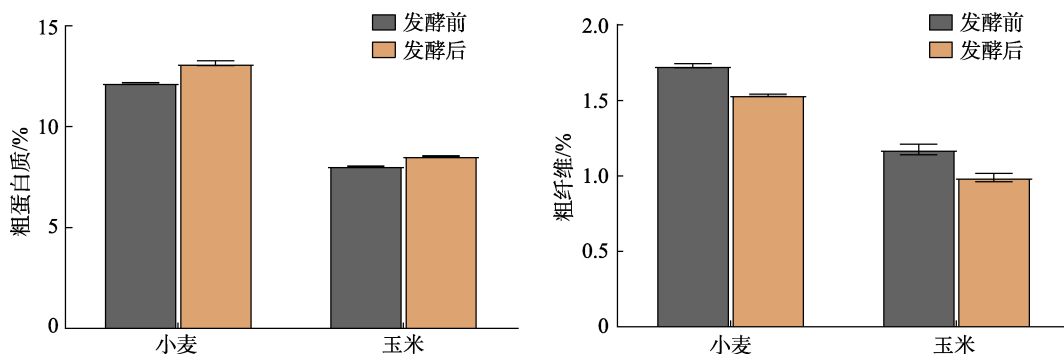


图 6 小麦和玉米发酵前后 CP 和 CF 含量变化

Fig.6 Changes in CP and CF content of wheat and corn before and after fermentation

艺进行优化，发现发酵后枣粉的营养品质和抗氧化性能得到有效提升，且黄曲霉毒素 B₁ 的含量显著降低。此外，张春吉^[30]研究了不同发酵时间对饲料真菌毒素含量（包括黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)、ZEN 和 DON）和营养价值的影响，结果证明全价饲料用呼吸膜袋发酵 3 d 为宜，且发酵时间越长毒素含量越高。郭瑞等^[23]将蜡样芽孢杆菌和两株乳酸菌混合对饲料原料进行发酵，结果表明可显著降低饲料中的毒素含量，对 AFB₁、ZEN 和 DON 的降解率分别达 86.72%、100%和 43.19%。因此，在适宜的菌种筛选和工艺优化下，固态发酵可在脱除饲料原料真菌毒素含量的同时进一步提升其营养价值。


3 结论

本研究筛选出了 3 株可高效脱除小麦和玉米中 DON 的益生菌，即戊糖片球菌、酿酒酵母和植物乳杆菌，24 h 单菌脱毒率分别为 79.62%、62.22%和 82.75%。且 3 株菌对 DON 的脱除以吸附作用为主，解吸附率均低于 15%。在优化后的固态发酵工艺下，3 株菌对小麦 DON 的脱毒率最高达 79.49%，对玉米 DON 和 ZEN 的脱毒率最高分别达 61.54%和 78.15%。此外，3 株菌联合固态发酵可提高毒素污染谷物的粗蛋白质，降低其粗纤维含量。

参考文献:

[1] WÉBER A, MERY L, NAGY P, et al. Evaluation of data quality at the Hungarian National Cancer Registry, 2000—2019[J]. *Cancer Epidemiology*, 2023, 82:102306.
[2] MISHRA S, SRIVASTAVA S, DEWANGAN J, et al. Global

occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(8): 1346-1374.
[3] HAO G, MCCORMICK S, TILEY H, et al. Detoxification and excretion of trichothecenes in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing *Fusarium graminearum* trichothecene 3-O-acetyltransferase [J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(5): 320.
[4] HOLANDA D M, KIM S W. Investigation of the efficacy of mycotoxin-detoxifying additive on health and growth of newly-weaned pigs under deoxynivalenol challenges[J]. *Anim Biosci*, 2021, 34(3): 405-416.
[5] LI Y, GAO H, WANG R, et al. Deoxynivalenol in food and feed: Recent advances in decontamination strategies[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1141378.
[6] ZHAI Y, HU S, ZHONG L, et al. Characterization of deoxynivalenol detoxification by *Lactobacillus paracasei* LHZ-1 isolated from yogurt[J]. *J Food Prot*, 2019, 82(8): 1292-1299.
[7] XU R, YIANNIKOURIS A, SHANDILYA U K, et al. Comparative assessment of different yeast cell wall-based mycotoxin adsorbents using a model- and bioassay-based *in vitro* approach[J]. *Toxins (Basel)*, 2023, 15(2): 104.
[8] PIERRON A, MIMOUN S, MURATE L S, et al. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 29105.
[9] GAO X J, MAO P Q, ZHANG X H, et al. Dual function of a novel bacterium, *Slackia* sp. d-g6: detoxifying deoxynivalenol and producing the natural estrogen analogue, equol[J]. *Toxins*, 2020, 12(2): 85.
[10] HE W J, YUAN Q S, ZHANG Y B, et al. Aerobic de-epoxydation of trichothecene mycotoxins by a soil bacterial consortium isolated using in situ soil enrichment[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(10): 277.
[11] 尹清强, 刘洋, 高天增, 等. 一种降解呕吐毒素的酵母菌及其应用: CN201810556975.0[P]. 河南省, 2021-11-26.
YIN Q Q, LIU Y, GAO T Z, et al. A yeast degrading vomitoxin and its application: CN201810556975.0[P]. Henan Province, 2021-11-26.
[12] LAHTINEN S J, HASKARD C A, OUWEHAND A C, et al. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus*

- rhamnosus* strain GG[J]. *Food Addit Contam*, 2004, 21(2): 158-164.
- [13] 谭剑, 杨硕, 苏会波, 等. 一株降解呕吐毒素枯草芽孢杆菌的鉴定与降解效果研究[J]. *当代化工*, 2018, 47(3): 548-551.
TAN J, YANG S, SU H B, et al. Identification of a *Bacillus subtilis* strain with deoxynivalenol degradation ability[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2018, 47(3): 548-551.
- [14] NATHANAIL A V, GIBSON B, HAN L, et al. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 448-455.
- [15] NIDERKORN V, MORGAVI D P, PUJOS E, et al. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model[J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(4): 406-415.
- [16] 向雨珂, 熊捷, 张晓琳, 等. T-2 毒素脱毒菌株的筛选及脱毒机制初探[J]. *食品科技*, 2017, 42(11): 27-33.
XIANG Y K, XIONG J, ZHANG X L, et al. Screening of T-2 toxin detoxification strains and the mechanism of detoxification [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(11): 27-33.
- [17] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 等. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(5): 968-974.
CAO F M, YANG X H, MA M C, et al. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(5): 968-974.
- [18] 尹鹏, 杨芸芸, 赵一凡, 等. 基于 BP 人工神经网络的酿酒酵母发酵培养基优化及其水解物对真菌毒素吸附研究[J]. *中国粮油学报*, 2023, 38(8): 206-212.
YIN P, YANG Y Y, ZHAO Y F, et al. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture medium based on BP artificial neural network and mycotoxin adsorption studies by its hydrolysate [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2023, 38(8): 206-212.
- [19] 刘畅, 刘阳, 邢福国, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 吸附菌株的筛选及吸附机理研究[J]. *核农学报*, 2010, 24(4): 766-771.
LIU C, LIU Y, XING F G, et al. Screening of aflatoxin B₁ binding strains and binding mechanism of yeast strain Y1[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(4): 766-771.
- [20] LEE Y K, EL-NEZAMI H, HASKARD C A, et al. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria[J]. *J Food Prot*, 2003, 66(3): 426-430.
- [21] 梁含, 马召稳, 于思颖, 等. 呕吐毒素降解菌的筛选、鉴定及应用[J]. *中国畜牧杂志*, 2019, 55(12): 115-119.
LIANG H, MA Z W, YU S Y, et al. Screening, identification and application of vomitoxin-degrading bacteria[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2019, 55(12): 115-119.
- [22] 田祖光, 高恺玥, 周蕾, 等. 降解呕吐毒素益生菌的筛选及在发酵麸皮中的应用[J]. *饲料研究*, 2021, 44(6): 84-87.
TIAN Z G, GAO K Y, ZHOU L, et al. Screening of vomitoxin-degrading probiotics and their application in fermenting bran[J]. *Feed Research*, 2021, 44(6): 84-87.
- [23] 郭瑞, 张香香, 董维璇, 等. 降解多种真菌毒素的芽孢杆菌的筛选鉴定及其发酵饲料应用[J]. *饲料工业*, 2024, 45(2): 125-131.
GUO R, ZHANG X X, DONG W X, et al. Screening and identification of *Bacillus sphaericus* for degradation of various mycotoxins and its fermented feed application[J]. *Feed Industry*, 2024, 45(2): 125-131.
- [24] 曹坤, 管明, 陈康, 等. 一株拮抗禾谷镰刀菌和降解呕吐毒素解淀粉芽孢杆菌的筛选及在饲料贮存中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(8): 179-183.
CAO K, GUAN M, CHEN K, et al. Screening of a strain of antagonistic *Fusarium graminearum* and vomitoxin-degrading *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in feed storage[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2019, 47(8): 179-183.
- [25] 彭馨, 姜夏雨, 杨焯, 等. 霉菌毒素对家禽的致毒机制及互作效应研究进展[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(2): 700-707.
PENG X, JIANG X Y, YANG Y, et al. Progress in the study of mycotoxin toxicity and interaction effects on poultry[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(2): 700-707.
- [26] VALERIA P, ALEJANDRA M, ANALÍA F, et al. A *Saccharomyces cerevisiae* RC016-based feed additive reduces liver toxicity, residual aflatoxin B₁ levels and positively influences intestinal morphology in broiler chickens fed chronic aflatoxin B₁-contaminated diets[J]. *Animal Nutrition*, 2020, 6(1): 31-38.
- [27] 张娅妮, 解修超, 王昌钊, 等. 大球盖菇固态发酵对小麦营养成分影响的研究[J]. *食品科技*, 2023, 48(8): 121-126.
ZHANG Y N, XIE X C, WANG C Z, et al. Effects of solid-state fermentation of *Agaricus blazei* on the nutrient composition of wheat[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(8): 121-126.
- [28] 张守梅, 翟胜男, 郭玉秋, 等. 芽孢杆菌固态发酵对麦麸改性和呕吐毒素的影响[J]. *食品科技*, 2022, 47(9): 1-7.
ZHANG S M, ZHAI S N, GUO Y Q, et al. Effect of solid-state fermentation of *Bacillus sphaericus* on the modification of wheat bran and vomitoxin[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(9): 1-7.
- [29] 刘永青, 李锦连, 张凯. 复合益生菌发酵对残次枣粉营养成分、毒素含量和抗氧化性的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(9): 276-282.
LIU Y Q, LI J L, ZHANG K. Effects of probiotic complex fermentation on the nutrient composition, toxin content and antioxidant property of residual date powder[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2023, 59(9): 276-282.
- [30] 张春吉. 不同发酵时间对全价饲料营养成分、霉菌毒素含量和能量体外消化率的影响[J]. *中国饲料*, 2023(2): 33-36.
ZHANG C J. Effects of different fermentation times on the nutrient composition, mycotoxin content and *in vitro* digestibility of energy of complete feeds[J]. *China Feed*, 2023(2): 33-36. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。