

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.03.002

# 纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 对小麦粉中 呕吐毒素的脱毒机制

Removal mechanisms of Deoxynivalenol by  
*Bacillus natto* 16-1 in wheat flour

张琛 许慧卿 崔桂友 丁香丽

ZHANG Chen XU Hui-qing CUI Gui-you DING Xiang-li

胡舰 李波 于小番

HU Jian LI Bo YU Xiao-fan

(扬州大学旅游烹饪·食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

(College of Tourism and Culinary science Food science and Engineering,  
Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

**摘要:**采用酶联免疫吸附法(ELISA)及高效液相色谱—质谱(HPLC-mass spectrometry, HPLC-MS)检测纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 各细胞成分对小麦粉中呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)的清除效果及降解产物,探讨纳豆芽孢杆菌清除呕吐毒素的效果及降解机制。结果显示,培养 5 h 后不同浓度的菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液以及细胞壁悬浮液,对 DON 清除率均在 53% 以上,其中不同浓度的菌悬液处理间存在显著差异,高浓度细胞壁悬浮液处理对 DON 清除率高达 62.85%; 培养 10 h 后不同菌体成分对 DON 的清除率在 57% 以上,其中不同浓度发酵上清液、菌体裂解液以及细胞壁悬浮液处理间存在显著差异。除细胞壁处理组外,其他各组均可将 DON 降解为分子质量较小的物质。结果表明,纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 各细胞成分对 DON 均有清除作用,且这种作用在一定程度上与细胞成分的浓度及作用时间有关;各细胞成分对 DON 的清除机制主要是生物降解作用,细胞壁可能是通过生物吸附作用来清除 DON。

**关键词:**纳豆芽孢杆菌;呕吐毒素;脱毒

**Abstract:** This research was to investigate the efficacy and mechanisms of removal of deoxynivalenol (DON) in wheat flour by *Bacillus natto* 16-1 by ELISA and high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry (HPLC-MS). The re-

sults show that, after 5 hours of culture, the DON removal rates were above 53% in different concentrations of bacterial suspension, fermentation supernatant, bacterial lysis liquid, crude enzyme liquid and cell wall suspension. And there were significant differences among different concentrations of bacterial suspension treatments, and high concentration of cell wall suspension treatment of DON removal rate was up to 62.85%. After 10 hours of culture, the DON removal rate of different bacterial components was above 57%, and there were significant differences among different concentrations of fermentation supernatant, bacterial lysis liquid and cell wall suspension treatment. Except for the cell wall treatment group, all other groups can degrade DON as a small molecule mass substance. The cell components of *Bacillus natto* 16-1 have a scavenging effect on DON, and this effect is somehow related to the concentration of the cell components and the treatment time. The mechanism of DON removal by each cell component is mainly biodegradation, and the cell wall may removal of DON by biosorption.

**Keywords:** *Bacillus natto*; deoxynivalenol (DON); removal

呕吐毒素又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON, 3, 7, 15-三羟基-12, 13-环氧单端孢霉-9 烯-8 酮),是由禾谷镰刀菌 *Fusariumgraminearum* 产生的重要真菌毒素<sup>[1-2]</sup>。呕吐毒素在小麦、玉米和大豆等常规粮食中普遍存在,是食品和饲料原料中仅次于黄曲霉毒素的最常见的真菌毒素之一,在全球范围内有着较高的污染率<sup>[3]</sup>。呕吐毒素可通过食物链对人畜造成很大的危害,能引起动物呕吐、腹泻、皮肤刺激、拒食、神经紊乱、流产、死胎等<sup>[4-6]</sup>。

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31701634)

**作者简介:**张琛,男,扬州大学在读硕士研究生。

**通信作者:**许慧卿(1972—),女,扬州大学教授,博士。

E-mail: yzuxhq@126.com

**收稿日期:**2018-10-07

目前常用的呕吐毒素脱毒方法有物理、化学和生物法。由于 DON 的结构十分稳定<sup>[7]</sup>,物理和化学方法脱毒效果不稳定,同时会破坏食物原料中的营养成分,还容易造成二次污染<sup>[8-11]</sup>,而微生物降解毒素的方法因其高效环保而受到广泛的关注,并且有较好的脱毒效果<sup>[12-13]</sup>。研究发现动物肠道的混合微生物菌团对 DON 的降解率可接近 50%<sup>[14-15]</sup>,霉菌属的某些菌株可达到 65%以上<sup>[16]</sup>,芽孢杆菌属中的某些菌株甚至可达 80%以上<sup>[17-18]</sup>。

虽然上述微生物降解法对 DON 降解取得了较好的效果,但也存在诸多缺陷。早期研究<sup>[15,19-20]</sup>发现,能降解 DON 的微生物大多是源于动物肠道的混合菌群不能进行纯培养,混合物也不适合进行规模化发酵生产;虽然有部分菌株经纯化后可降解 DON,但大多数研究<sup>[16-17,21]</sup>都是用单株菌直接与 DON 标准品进行试验,没有验证其在食物环境中对 DON 的降解效果,甚至部分能降解 DON 的菌株本身就是致病菌、致敏源,存在安全隐患。这些问题直接影响微生物降解法在实践中的应用。

为探明真菌毒素生物降解的机制和安全有效的途径,本试验拟通过研究益生菌纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 的菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液及细胞壁悬浮液对小麦粉中的呕吐毒素降解效果,并利用高效液相色谱—质谱联用仪(LC-MS)对作用结果进行分析,来探讨纳豆芽孢杆菌不同处理方式对呕吐毒素的脱毒能力,为真菌毒素生物降解的实践应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1(*Bn16*):由本实验室选育保藏;

呕吐毒素(DON):美国 Sigma 公司;

甲醇、氯化钠:分析纯,国药化学试剂有限公司;

营养肉汤:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,蒸馏水定容至 1 L,pH 为 7.4,121 °C 高压灭菌 20 min;

电子天平:GL124-1SCN 型,德国 Sartorius 公司;

超净工作台:SW-CJ-1F 型,苏州净化有限公司;

全自动灭菌锅:JF-SX-500 型,日本 TOMY 公司;

超纯水仪系统:Millipore Direct 8 型,美国 Millipore 公司;

冷冻离心机:AllegraX-22R 型,美国 Beckman Coulter 公司;

大容量双层培养摇床:KYC-1102 型,新苗医疗器械制造有限公司;

超声破细胞破碎仪:JY920-IIID 型,新芝生物科技股份有限公司;

酶标分析仪:ZM-560 型,中德伯尔生物技术有限公司;

液相色谱—质谱联用仪:Agilent 1200-6460 QQQ 型,美国 Agilent 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 菌悬液及发酵上清液的制备 取稳定生长期(28~38 h) *Bn16* 发酵液,调节菌体浓度至  $1 \times 10^{12}$  CFU/mL,然后进行 10 倍梯度稀释,分别获得浓度为  $1 \times 10^{12}$  (高浓度), $1 \times 10^{11}$  (中浓度), $1 \times 10^{10}$  (低浓度) CFU/mL 3 组菌液。将各浓度 *Bn16* 发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min,分别收集菌体和上清液。菌体用无菌生理盐水洗涤 3 次后,再用生理盐水重悬至原菌体浓度,分别记为高、中、低浓度菌悬液。上清液分别用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜(Milipore)过滤,滤液即为高、中、低 3 个浓度组的发酵上清液。菌悬液和上清液分别于 4 °C 保存备用。

1.2.2 全菌裂解液及细胞壁悬浮液的制备 按 1.2.1 制备 *Bn16* 高、中、低浓度菌悬液,反复冻融后,用超声波细胞破碎仪(输出功率 400 W,间隔时间 10 s,每次裂解时间 10 s,裂解总时间 20 min,保护温度 0 °C)对菌悬液进行裂解并用显微镜检查裂解效果,再经过滤后收集滤液,然后 4 °C,10 000 r/min 离心 15 min,分别收集滤液,即为高、中、低浓度的全菌裂解液。对各组沉淀进行洗涤并重悬至原溶液体积,即为高、中、低浓度的细胞壁悬浮液。全菌裂解液和细胞壁悬浮液分别于 4 °C 保存备用。

1.2.3 酶液的粗提取 按 1.2.1 制备 *Bn16* 高、中、低浓度发酵液,于 4 °C,12 000 r/min 离心 20 min,上清液分别用 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤<sup>[22]</sup>,收集滤液,即为高、中、低浓度的粗提酶液,于 4 °C 保存备用。

1.2.4 小麦粉样品制备 取市售小麦粉,测定 DON 含量,面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇特征值为  $(2.366 \pm 0.187) \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[23]</sup>,根据测定结果适量添加 DON 标准样品,调节小麦粉中的 DON 含量[约为  $(2.6 \pm 0.1) \mu\text{g}/\text{g}$ ],使小麦粉样品中的 DON 含量大于特征值,灭菌,40 °C 干燥至恒重。

1.2.5 菌体成分对小麦粉中 DON 的降解 分别取高、中、低浓度的菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液、细胞壁悬浮液,与上述含有 DON 的小麦粉样品按 5:1(mL/g)混合;以添加等体积生理盐水小麦粉作空白对照,于 35 °C,140 r/min 孵育发酵,分别在第 5,10 h(稳定期中期和稳定期末期)取样并测定样液中 DON 残留量。

1.2.6 小麦粉中 DON 残留浓度的检测 按 GB 5009.111—2016 进行操作。用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测样品中 DON 残留量,每组设置 3 个平行。

参照吴娉等<sup>[22]</sup>的研究方法,经甲醇粗提乙腈复提后,利用高效液相色谱—质谱联用仪(HPLC-MS)对降解产物进行分析。

### 1.3 统计分析

试验数据采用 Excel、ELISA Calc、SPSS 等软件进行

计算和统计分析。

*Bn16* 对 DON 的脱毒效果用清除率表示,按式(1)计算:

$$CL = \frac{\omega_0 - \omega_1}{\omega_0} \times 100\% , \quad (1)$$

式中:

*CL*——DON 清除率, %;

$\omega_0$ ——对照组样品中 DON 含量,  $\mu\text{g}/10\text{ g}$ ;

$\omega_1$ ——处理样中 DON 残留量,  $\mu\text{g}/10\text{ g}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 菌悬液对 DON 的脱毒效果

不同浓度的 *Bn16* 菌悬液对小麦粉样品中 DON 的脱毒效果如表 1 所示。

由表 1 可以看出,小麦粉与不同浓度的 *Bn16* 菌悬液孵育后,其中的 DON 浓度均有不同程度的下降,下降的幅度与菌悬液浓度、孵育时间有关。不同浓度处理组的 DON 清除率均达到 53% 以上,其中经过 10 h 孵育后各处理组的 DON 降解率均达到 57% 以上。处理 10 h 不同浓度处理组间清除率并无显著差异,但不同处理时间对各处理组的 DON 清除率存在显著差异,随处理时间的延长,尽管清除率有所提高,降解速率明显减缓。以上结果表明,*Bn16* 菌悬液对小麦粉中的 DON 毒素具有较好的清除作用,这种清除作用在一定时间内与菌浓度有关。

目前,呕吐毒素的生物脱毒已成为国内外研究的热点。许多微生物,如酵母菌等真菌和某些细菌均可用于

去除或减少食品中的呕吐毒素。Yu 等<sup>[19]</sup>从鸡的肠道内容物中分离到的芽孢杆菌(*Bacillus*)可在无氧条件下将 DON 转化为低毒性的去环氧化物 dE-DON, Li 等<sup>[24]</sup>通过动物试验证实芽孢杆菌对 DON 具有降解作用。本试验中不同浓度的纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 菌悬液对 DON 均具有一定的清除作用,说明纳豆芽孢杆菌功具有生物降解 DON 的能力。纳豆芽孢杆菌属革兰氏阳性菌,是枯草芽孢杆菌的一个亚种,自身无致病性,可降解一些复杂的碳水化合物。*Bn16* 对 DON 的清除机制有待进一步研究。

### 2.2 不同浓度纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 发酵上清液对 DON 的脱毒效果

不同浓度的 *Bn16* 发酵上清液对小麦粉样品中 DON 的脱毒效果如表 2 所示。

发酵上清液主要含有由 *Bn16* 产生的小分子代谢产物,不同浓度处理的发酵上清液中代谢产物浓度不同。由表 2 可以看出,小麦粉与不同浓度的 *Bn16* 发酵上清液经过 5 h 孵育后, DON 清除率达到 56% 以上,且清除率随发酵上清液浓度的增大和孵育作用时间的延长而提高。孵育 10 h 后, DON 清除率呈显著差异。结果表明, *Bn16* 的代谢产物中含有可清除 DON 的物质,清除作用与发酵上清液浓度和孵育时间呈正相关。

### 2.3 纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 全菌裂解液对 DON 的脱毒效果

不同浓度的 *Bn16* 裂解液对小麦粉样品中 DON 的脱毒效果如表 3 所示。

由表 3 可以看出,小麦粉与不同浓度的 *Bn16* 裂解液

表 1 不同浓度 *Bn16* 菌悬液对 DON 的脱毒效果<sup>†</sup>

Table 1 The removal efficiency of DON by different concentration *Bn16* suspension

组别	小麦粉中 DON 残留浓度/( $10^{-1}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )			DON 清除率/%	
	0 h	5 h	10 h	5 h	10 h
高浓度组	26.01±0.17	11.31±0.01	10.98±0.01	56.16 <sup>a</sup>	57.42
中浓度组	26.01±0.15	11.71±0.01	10.94±0.01	54.59 <sup>b</sup>	57.58
低浓度组	26.01±0.17	11.91±0.01	11.05±0.01	53.85 <sup>c</sup>	57.17
对照	26.01±0.11	25.81±0.04	25.79±0.03	—	—

† 不同小写字母表示各试验组间差异显著( $P < 0.05$ );“—”表示 DON 清除率为 0%。

表 2 不同浓度 *Bn16* 发酵上清液对 DON 的脱毒效果<sup>†</sup>

Table 2 The removal efficiency of DON by different concentration *Bn16* fermentation supernatant

组别	小麦粉中 DON 残留浓度/( $10^{-1}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )			DON 清除率/%	
	0 h	5 h	10 h	5 h	10 h
高浓度组	26.01±0.17	11.23±0.02	9.83±0.01	56.49	61.88 <sup>a</sup>
中浓度组	26.01±0.15	11.16±0.01	10.71±0.02	56.76	58.47 <sup>b</sup>
低浓度组	26.01±0.17	11.18±0.01	11.06±0.02	56.68	57.12 <sup>c</sup>
对照	26.01±0.11	25.81±0.04	25.79±0.03	—	—

† 不同小写字母表示各试验组间差异显著( $P < 0.05$ );“—”表示 DON 清除率为 0%。

表 3 不同浓度 *Bn*16 全菌裂解液对 DON 的脱毒效果<sup>†</sup>Table 3 The removal efficiency of DON by different concentration *Bn*16 lysis liquid

组别	小麦粉中 DON 残留浓度/(10 <sup>-1</sup> μg · g <sup>-1</sup> )			DON 清除率/%	
	0 h	5 h	10 h	5 h	10 h
高浓度组	26.01±0.17	11.17±0.01	10.68±0.02	56.71	58.59
中浓度组	26.01±0.15	11.19±0.02	10.87±0.01	56.62	57.87
低浓度组	26.01±0.17	11.31±0.02	10.89±0.04	56.19	57.76
对照	26.01±0.11	25.81±0.04	25.79±0.03	—	—

† “—”表示 DON 清除率为 0%。

经过 5 h 孵育后, DON 的清除率达到 56% 以上, 经过 10 h 孵育后全菌裂解液对 DON 清除率最高可达 58.59%。10, 5 h 处理组之间存在显著差异, 但同一处理时间的不同浓度处理组之间差异不显著。以上结果表明, *Bn*16 的胞内可能含有可清除 DON 的物质, 但是在试验浓度下, 这些物质对 DON 的清除作用与时间有关, 而与菌裂解液浓度无关。

全菌裂解液主要成分是 *Bn*16 细胞器、胞内酶等大分子物质和细胞质中一些小分子物质的混合物, 各种物质对 DON 的清除作用可能处于一个相互制约的过程, 因此虽然 DON 的清除率随着裂解液浓度的增加而增加, 但增加的量并未达到显著水平。

#### 2.4 不同浓度纳豆芽孢杆菌 *Bn*16 粗提酶液对 DON 的脱毒效果

不同浓度的 *Bn*16 粗提酶液对小麦粉样品中 DON 的脱毒效果如表 4 所示。

由表 4 可以看出, 小麦粉与不同浓度的 *Bn*16 粗提酶

液孵育后, DON 的清除率均达到 62% 以上, 经过 10 h 孵育后不同浓度的粗提酶液对 DON 清除率均有所提高, 但增幅较小, 各浓度组之间均没有显著差异。以上结果表明, *Bn*16 胞外酶对小麦粉中的 DON 有清除作用, 作用效果与 DON 和酶的作用时间有关。

粗提酶液中主要成分为 *Bn*16 的胞外酶, 包括脂肪酶和蛋白酶等。研究<sup>[25-27]</sup>发现真菌中的蛋白酶和脂肪酶等胞外酶类能通过打开 DON 结构中的环氧键或水解 DON 来降解 DON。同时, 酶液中可能会有一些其他因子, 比如酶的抑制剂一起滤过, 在高浓度情况下, 酶的抑制剂浓度也高, 所以高浓度组在 10 h 时反而增加不明显。同时, 高浓度组由微生物的生长代谢导致的 pH 值的变化也更明显, 因此对酶活性的影响也比较大。

#### 2.5 不同浓度纳豆芽孢杆菌 *Bn*16 细胞壁悬液对 DON 的脱毒效果

不同浓度的 *Bn*16 细胞壁悬液对小麦粉样品中 DON 的脱毒效果如表 5 所示。

表 4 不同浓度 *Bn*16 粗提酶液对 DON 的降解效果<sup>†</sup>Table 4 The removal efficiency of DON by different concentration *Bn*16 crude enzyme liquid

组别	小麦粉中 DON 残留浓度/(10 <sup>-1</sup> μg · g <sup>-1</sup> )			DON 清除率/%	
	0 h	5 h	10 h	5 h	10 h
高浓度组	26.01±0.17	9.76±0.05	9.56±0.05	62.18	62.93
中浓度组	26.01±0.15	9.57±0.12	9.52±0.10	62.92	63.10
低浓度组	26.01±0.17	9.65±0.03	9.56±0.04	62.61	62.93
对照	26.01±0.11	25.81±0.04	25.79±0.03	—	—

† “—”表示 DON 清除率为 0%。

表 5 不同浓度 *Bn*16 细胞壁悬液对 DON 的脱毒效果<sup>†</sup>Table 5 The removal efficiency of DON by different concentration *Bn*16 Cell wall suspension

组别	小麦粉中 DON 残留浓度/(10 <sup>-1</sup> μg · g <sup>-1</sup> )			DON 清除率/%	
	0 h	5 h	10 h	5 h	10 h
高浓度组	26.01±0.17	9.59±0.08	9.61±0.05	62.85	62.73 <sup>b</sup>
中浓度组	26.01±0.15	9.88±0.01	9.55±0.05	61.72	62.97 <sup>a</sup>
低浓度组	26.01±0.17	9.83±0.01	9.64±0.02	61.91	62.62 <sup>b</sup>
对照	26.01±0.11	25.81±0.04	25.79±0.03	—	—

† “—”表示 DON 清除率为 0%。

由表 5 可以看出,小麦粉不同浓度的 *Bn16* 细胞壁悬液经过 5 h 孵育后, DON 清除率均达 61.7% 以上,且各组清除率无差异;处理 10 h 后的检测结果显示,中、低浓度的细胞壁悬液对 DON 清除率有所提高,但高浓度则略有下降;这可能与细胞壁悬液的浓度及细胞壁破碎程度有关。以上结果表明, *Bn16* 的细胞壁可降低小麦粉中的 DON 的含量,作用效果与细胞壁浓度关系不大,只在一定浓度下,清除效果会随着时间的延长而增加。

目前研究发现,真菌类和一些革兰氏阳性菌对 DON 均有吸附作用,这与本试验的结果基本一致。这种吸附作用是可逆的,因此对吸附时间,吸附剂浓度及稳定性有较高要求。

### 2.6 不同处理方式 DON 的脱毒效果比较

*Bn16* 不同细胞成分对小麦粉中的 DON 的清除效果如表 6 所示。

表 6 *Bn16* 不同细胞成分对 DON 的清除率<sup>†</sup>

Table 6 The removal efficiency of DON by different cellular components of *Bn16*

处理时间/h	处理浓度	DON 清除率/%				
		菌悬液	发酵上清液	全菌裂解液	粗提酶液	细胞壁悬液
5	高	56.16 <sup>bA</sup>	56.49 <sup>dA</sup>	56.71 <sup>bB</sup>	62.18 <sup>aC</sup>	62.85 <sup>bC</sup>
	中	54.59 <sup>cA</sup>	56.76 <sup>dB</sup>	56.62 <sup>bB</sup>	62.92 <sup>aC</sup>	61.72 <sup>bC</sup>
	低	53.85 <sup>dA</sup>	56.68 <sup>dB</sup>	56.19 <sup>bB</sup>	62.61 <sup>aC</sup>	61.91 <sup>bC</sup>
10	高	57.42 <sup>aA</sup>	61.88 <sup>aB</sup>	58.59 <sup>aA</sup>	62.93 <sup>aC</sup>	62.73 <sup>bC</sup>
	中	57.58 <sup>aA</sup>	58.47 <sup>bA</sup>	57.87 <sup>aA</sup>	63.10 <sup>aB</sup>	62.97 <sup>aC</sup>
	低	57.17 <sup>aA</sup>	57.12 <sup>cA</sup>	57.76 <sup>aA</sup>	62.93 <sup>aB</sup>	62.62 <sup>bB</sup>

† 不同小写字母表示同列处理组之间有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 不同大写字母表明同行处理组之间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

以上结果表明,不管从处理成本还是处理效果来看,中浓度的粗提酶液或细胞壁悬浮液处理 10 h 对 DON 清除均能达到较好的效果。

### 2.7 不同处理方式对 DON 影响结果比较

采用 LC-MS 对不同处理组的作用底物进行检测,检测结果如图 1 所示。

由图 1 可知, DON 标准品的相对分子质量为 293.30, 经过 *Bn16* 菌悬液、全菌裂解液、粗提酶液的作用后均产生了相对分子质量为 277, 283 左右的新物质;经发酵上清液处理后的样品只有分子质量 283 左右的新物质产生,而细胞壁处理组并无新的物质产生。以上结果表明,纳豆芽孢杆菌清除 DON 的机制可能包括生物吸附和生物降解,酶等大分子物质通过生物降解产生 2 种不同的降解产物,而细胞壁对 DON 的清除可能只是通过细胞壁成分的吸附作用。本研究中所用的菌悬液并未灭活,因此在 5~10 h 的作用中, *Bn16* 有可能产生少量酶等胞外物质,因此菌悬液处理出现了 2 种降解产物。

研究<sup>[28-29]</sup>证明,微生物细胞壁对 DON 的清除作用

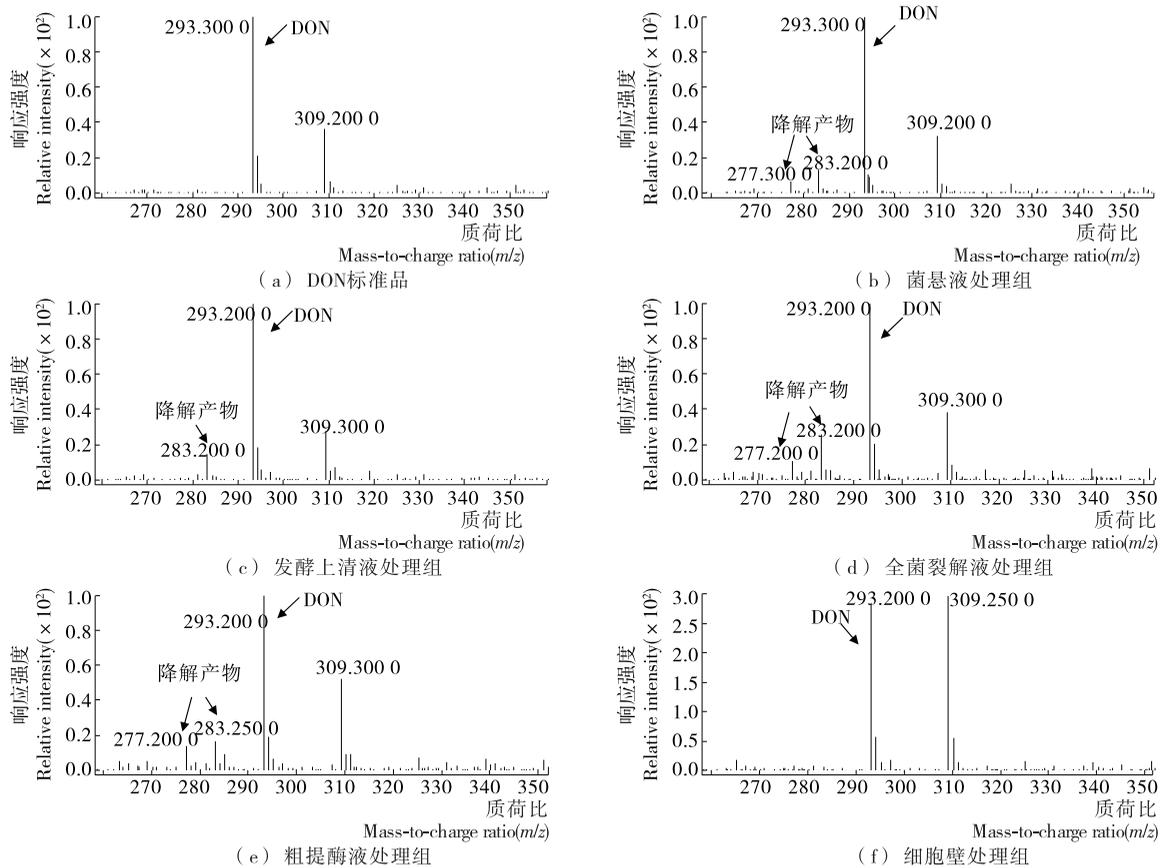
由表 6 可以看出,同一细胞成分与小麦粉混合后,作用 10 h 后 DON 的清除率均明显高于作用 5 h 的处理,而相同作用时间不同处理浓度之间的差异较小。比较处理 10 h 后各浓度组的 DON 清除率,除发酵上清液处理外,其他各组的高浓度组处理效果并不优于中浓度组,说明中浓度组清除 DON 的能力已接近饱和。比对不同处理的纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 对 DON 的清除率发现,不同细胞成分对小麦粉中 DON 的清除效果有明显的差异,其中粗提酶液与细胞壁悬浮液对 DON 的清除率显著高于其他细胞成分处理组,有可能这是 *Bn16* 清除 DON 的 2 个主要途径。菌悬液对 DON 的清除率与细胞壁悬浮液处理相比,存在着较为明显的差异。说明 *Bn16* 对 DON 的吸附作用并不完全存在于细胞外膜,可能细胞外膜内侧或内膜还存在着某些物质,它们对 DON 有一定的吸附作用。

主要是生物吸附。它们是通过细胞壁的肽聚糖、甘露聚糖和葡聚糖等高分子物质对 DON 的吸附。这与本试验结果一致。

微生物酶可通过水解和异构化等方式作用于 DON 的 C-12, 13 环氧基团、C-3 羟基等位点进行生物降解<sup>[14, 25-27]</sup>。于大海<sup>[30]</sup>和 Palomo 等<sup>[31]</sup>发现真菌中的脂肪酶具有催化水解环氧化合物的功能,可以将 DON 转化为的 DOM-1。邓露芳等<sup>[32]</sup>和 Young 等<sup>[33]</sup>发现 DON 生物降解的另一条途径可能是微生物蛋白酶在碱性条件下 DON 结构中的 C12/C13 环氧基团发生去环氧化。本试验中,纳豆芽孢杆菌 *Bn16* 的粗提酶液处理降解 DON 后可产生 2 种产物,但其作用机制究竟是将 DON 结构中的环氧键被打开生成 2 个羟基,还是通过去环氧化达到水解 DON 的目的,有待于进一步研究。

## 3 结论

本试验通过研究纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 各细胞成分对小麦粉中 DON 的清除能力发现,菌悬液、

图 1 *Bn16* 不同细胞成分降解 DON 的 LC-MS 图谱Figure 1 LC-MS results for DON degradation by different cellular components of *Bn16*

发酵上清液、粗提酶液、全菌裂解液和细胞壁均有清除 DON 的能力,其中微生物酶和细胞壁是清除 DON 的主要细胞成分,用  $1 \times 10^{11}$  的菌悬液制得的粗提酶液或细胞壁悬浮液与小麦粉样品按 5:1(g/mL)混合后处理 10 h 对小麦粉中 DON 清除能达到较好的效果。同时,本试验证实了细胞壁和微生物酶类可通过不同的机制清除 DON,但对于不同微生物酶降解的 DON 机制、降解产物以及降解产物的毒性尚需进一步研究。

利用生物脱毒对粮食进行 DON 脱毒处理,相较物理、化学脱毒法,不但能避免脱毒处理过程中对食品原料的营养成分的影响,还可提高食品营养价值。通过研究菌体成分对 DON 的清除作用,可以克服全菌脱毒效果不稳定的局限,也可以突破因细菌特殊气味导致的接受程度低的限制,应用更加广泛。因此,研究微生物降解毒素的机制,寻找降解毒素的有效成分进行纯化分离以及进一步的改造,将是未来一段时间内真菌毒素生物降解的研究方向。

#### 参考文献

[1] BERGER U, OEHME M, KUHN F. Quantitative determination and structure elucidation of type A-and B-trichoth-

ecenes by HPLG/iontrap multiple mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10): 4 240-4 245.

[2] LARSEN J C, HUNT J, PERRIN I, et al. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report[J]. Toxicology Letters, 2004, 153(1): 1-22.

[3] PESTKA J J, ZHOU H R, MOON Y, et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox[J]. Toxicology Letters, 2004, 153(1): 61-73.

[4] KOUADIO J H, MOBIO T A, BAUDRIMONT I, et al. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2[J]. Toxicology, 2005, 213(1/2): 56-65.

[5] MURI S D, VAN D V H, BOON P E, et al. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food [J]. Food & Chemical Toxicology, 2009, 47(12): 2 963-2 974.

[6] PESTKA J J. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis[J]. Food Additives & Contaminants, 2008, 25(9): 1 128-1 140.

- [7] ROTTER B A, PRELUSKY D B, PESTKA J J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)[J]. *Journal of Toxicology & Environmental Health*, 1996, 48(1): 1-34.
- [8] 邵慧丽. 臭氧处理对呕吐毒素污染小麦品质及安全性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 5-6.
- [9] BRETZ M, BEYER M, CRAMER B, et al. Thermal Degradation of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(17): 6 445-6 451.
- [10] MORGAVI D P, BOUDRA H, JOUANY J P, et al. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(23): 6 906-6 910.
- [11] 王守经, 胡鹏, 汝医, 等. 谷物真菌毒素污染及其控制技术[J]. *中国食物与营养*, 2012, 18(3): 13-16.
- [12] 计成, 赵丽红, 李笑樱, 等. 呕吐毒素生物降解研究进展[J]. *饲料工业*, 2015, 36(10): 1-5.
- [13] YOUNG J C, ZHOU Ting, YU Hai, et al. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2007, 45(1): 136-143.
- [14] SHIMA J, TAKASE S, TAKAHASHI Y, et al. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 3 825-3 830.
- [15] HE P, YOUNG L G, FORSBERG C. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin)[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 3 857-3 863.
- [16] 王开萍. 呕吐毒素降解菌的筛选鉴定、降解酶的纯化及其特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015: 20-21.
- [17] 余祖华, 丁轲, 刘赛宝, 等. 一株降解呕吐毒素蜡样芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. *食品科学*, 2016, 37(5): 121-125.
- [18] 中国农业大学. 一株高效降解呕吐毒素的枯草芽孢杆菌及其应用: 中国, 201310169636.4[P]. 2013-08-14.
- [19] YU Hai, ZHOU Ting, GONG Jian-hua, et al. Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection[J]. *Bmc Microbiology*, 2010, 10(1): 182.
- [20] WESTLAKE K, MACKIE R I, DUTTON M F. T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1987, 53(3): 587
- [21] 李亚菲, 余祖华, 刘赛宝, 等. 一株降解呕吐毒素的青霉菌的分离与鉴定[J]. *饲料工业*, 2015(15): 42-45.
- [22] 吴娱, 王开萍, 唐正江, 等. 米曲霉 *Aspergillus oryzae* Asw. 6 对脱氧雪腐镰刀菌烯醇的降解效果[J]. *食品科学*, 2016, 37(17): 185-189.
- [23] 许娇娇, 黄百芬, 蔡增轩, 等. 面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质的研制[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(3): 291-294.
- [24] LI X Z, ZHU C, CFMD L, et al. Efficacy of detoxification of deoxynivalenol-contaminated corn by *Bacillus* sp. LS100 in reducing the adverse effects of the mycotoxin on swine growth performance[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2011, 28(7): 894-901.
- [25] BINDER J, HORVATH E M, SCHATZMAYR G, et al. Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms[J]. *Cereal Research Communications*, 1997, 25(3): 343-346.
- [26] FUCHS E, BINDER E M, HEIDLER D, et al. Characterisation of metabolites after the microbial degradation of A- and B-trichothecenes by BBSH 797[J]. *Mycotoxin Research*, 2000, 16(1): 66-69.
- [27] FUCHS E, BINDER E M, HEIDLER D, et al. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2002, 19(4): 379-386.
- [28] RAJU M, DEVEGOWDA G. Esterified-Glucomannan in Broiler Chicken Diets-Contaminated with Aflatoxin, Ochratoxin and T-2 Toxin; Evaluation of its Binding Ability (in vitro) and Efficacy as Immunomodulator[J]. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2002, 15(7): 1 051-1 056.
- [29] 薛金文, 顾惠敏, 施盛山. 小麦中呕吐毒素降解的研究进展[J]. *粮油加工: 电子版*, 2014(1): 61-64, 68.
- [30] 于大海. 脂肪酶拆分环氧丙醇和 2-辛醇[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 42-71.
- [31] PALOMO J M, MUÑOZ G, FERNÁNDEZ-LORENTE G, et al. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (*R*, *S*)-2-butyryl-2-phenylacetic acid[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2003, 21(4): 201-210.
- [32] 邓露芳, 王加启, 姜艳美, 等. 纳豆芽孢杆菌对瘤胃微生物发酵的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 38(8): 1 062-1 068.
- [33] YOUNG J C, BLACKWELL B A, APSIMON J W. Alkaline degradation of the mycotoxin 4-deoxynivalenol[J]. *Tetrahedron Letters*, 1986, 27(9): 1 019-1 022.