

# 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及降解酶初步提取

刘晨, 谢岩黎\*, 曹荣耀, 程思忠

(河南工业大学粮油食品学院, 河南省粮油食品安全检测与控制重点实验室, 河南郑州 450001)

**摘要:** 该实验采用富集培养的方法从土壤中筛选出有效降解玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)的菌株。初筛采用ZEN涂布至无机盐培养基作为唯一碳源,复筛是以菌株的发酵液对ZEN的降解率作为评价指标,得到一株菌株*A.lwoffii.Haut.1*,其发酵液在37℃下与5 μg/mL ZEN共培养48 h,降解率高达93.54%。经16S rDNA基因测序分析、生理生化实验和菌落形态观察初步对菌株进行鉴定,并对该菌株的降解活性物质进行初步定位,最终探究丹宁-聚乙二醇法和盐沉法对无细胞上清液进行粗降解酶的提取效果。结果表明,该菌株鉴定判断为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*);该菌株的无细胞上清液的降解率最高为82.31%,无细胞上清液经加热处理、蛋白酶K处理和蛋白酶K+SDS处理后,降解率分别为20.10%、41.67%和18.68%,说明降解活性物质主要为胞外酶;当单宁浓度为15 mg/mL,聚乙二醇溶液浓度为10 mg/mL,提出的酶液降解率为64.33%,而盐沉法加入60%硫酸铵提出的粗酶液降解率为20.30%,因此,单宁聚乙二醇法提取降解酶效果更好。该研究为菌株降解ZEN的作用机理提供了研究基础,也为生物降解ZEN提供了新的研究材料。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮; 鲁氏不动杆菌; 降解酶

文章编号: 1673-9078(2022)08-73-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1110

## Screening and Identification of Zearalenone-Degrading Bacteria and Preliminary Extraction of Zearalenone-Degrading Enzyme

LIU Chen, XIE Yanli\*, CAO Rongyao, CHENG Sizhong

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Henan Key Laboratory of Cereal and Oil Food Safety Inspection and Control of Henan Province, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** A zearalenone (ZEN)-degrading bacterial strain was screened from soil using the enrichment culture method. ZEN was coated onto an inorganic salt medium as the sole carbon source in the initial screening, and the degradation rate of ZEN in the fermentation broth of the strain was used as the evaluation index in the second screening. The strain with the highest degradation rate was named *A.lwoffii.Haut.1*, which showed a degradation rate of 93.54% after co-incubation with 5 μg/mL ZEN in the fermentation broth for 48 h at 37 °C. The strain was identified through 16S rDNA gene sequencing analysis, physiological and biochemical experiments, and observation of colony morphology, followed by the preliminary localization of its degradation active substances. Finally, the effectiveness of the tannic acid-polyethylene glycol and salt precipitation methods for crude ZEN-degrading enzyme extraction in cell-free supernatant was tested. *A.lwoffii.Haut.1* was identified as a strain of *Acinetobacter lwoffii*. The highest ZEN-degradation rate of *A.lwoffii.Haut.1* in cell-free supernatant was 82.31%, which decreased to 20.10%, 41.67%, and 18.68% after treatment with heat, protease K, and protease K+SDS, respectively, thus indicating that extracellular enzymes were the main degradation active substances. The degradation rate of the crude enzyme solution extracted using 15 mg/mL of tannic acid and 10 mg/mL of polyethylene glycol solution was 64.33%, and that using salt precipitation with 60% ammonium sulfate was only 20.30%. Therefore, the tannic acid-polyethylene glycol method was highly effective for the extraction of degradation enzymes. This study provides a

引文格式:

刘晨,谢岩黎,曹荣耀,等.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及降解酶初步提取[J].现代食品科技,2022,38(8):73-79

LIU Chen, XIE Yanli, CAO Rongyao, et al. Screening and identification of zearalenone-degrading bacteria and preliminary extraction of zearalenone-degrading enzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 73-79

收稿日期: 2021-10-06

基金项目: 河南省高校科技创新团队项目(2019RTSTHN023); 郑州市重大科技创新专项项目(2020CXZX0077)

作者简介: 刘晨(1997-),男,硕士研究生,研究方向:食品安全控制与检测分析,E-mail:707288802@qq.com

通讯作者: 谢岩黎(1971-),女,博士,教授,博导,研究方向:食品安全控制,E-mail:ylxie@haut.edu.cn

research basis for investigating the bacterial degradation mechanism of ZEN and a new research material for ZEN biodegradation.

**Key words:** zearalenone; *Acinetobacter lwoffii*; degradation enzymes

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 是一种类雌激素类真菌毒素, 与动物内源性雌激素  $\beta$ -雌二醇结构相似, 又称 F-2 毒素, 是一种酚的二羟基苯酸的内酯结构<sup>[1,2]</sup>。ZEN 不仅能够污染玉米, 小麦和大豆等粮食作物, 而且能够污染饲料, 引发动物的中毒, 造成食品安全的问题。ZEN 会造成生殖毒性、遗传毒性和免疫毒性等毒性作用, 产生的毒性通过对机体的生殖功能和免疫机能等的抑制作用造成对动物与人类的健康的危害<sup>[3,4]</sup>。目前 ZEN 经常在食品和饲料中被检测出, 因此找到一个安全、高效去除该毒性的方法尤为重要。

粮食在农田中、运输期间以及作为食品和饲料成品加工和储藏期间, 都有可能出现被 ZEN 毒素污染的情况。在我国大部分地区农产品样品中, ZEN 污染情况严重, 检出率较高, 而且由于 ZEN 热稳定性极强, 不能通过常规处理完全清除<sup>[5]</sup>。因此 ZEN 可以在谷物类的成品食物中检测到, 比如面包或馒头。武亭亭等<sup>[6]</sup>对粮食加工过程中 ZEN 的污染情况进行调查, 检测结果显示玉米研磨加工中 ZEN 毒素检出率达 34%; 小麦粉中 ZEN 毒素检出率超出 74%。

迄今为止, 国内外对 ZEN 的脱毒方法主要包括物理法, 化学法和生物法三大类<sup>[7,8]</sup>。物理法主要包括辐射法, 特殊材料吸附法和色选法等, 化学法主要是让 ZEN 与碱, 氧化剂, 有机试剂等发生化学反应, 将 ZEN 转化成其他物质, 降低毒性。目前化学法主要包括双氧水处理法, 臭氧处理法, 碳酸钠浸泡法等。虽然物理法和化学法可以达到一定的脱毒效果, 但其仍然存在一些不足比如脱毒产物不确定, 脱毒效果不显著, 也可能脱毒过程中损失许多重要营养物质, 化学脱毒方法的缺点有脱毒不彻底, 成本较高等等。生物法可以解决上述理化脱毒中存在的问题, 生物法是在一种温和的环境下进行脱毒, 不仅不会造成食品和饲料营养物质的损失, 适口性的改变, 也不会带来有毒有害的化学物质。生物法脱毒机理有两种方式: 一种为微生物菌体吸附毒素, 达到脱毒目的, 其脱毒过程是微生物菌体可以吸附真菌毒素, 形成稳定复合物, 这一吸附方式的缺点是特异性较差, 且过程是可逆的, 受多种因素的影响; 第二种脱毒方式是微生物在发酵过程中分泌的代谢产物可以降解真菌毒素, 微生物产生的代谢产物为胞内酶、胞外酶或次级代谢产物, 可以使 ZEN 的毒性减弱甚至降解成为无毒的化合物。而且微生物生长速度很快, 种类繁多, 基因资源丰富, 降解真菌毒素潜力巨大<sup>[9-11]</sup>。目前国内外已发现可降

解 ZEN 的微生物主要有芽孢杆菌属<sup>[12-14]</sup>、酵母菌属<sup>[15]</sup>、乳酸菌属<sup>[16]</sup>和红球菌属<sup>[17]</sup>等菌株, 对不动杆菌属降解 ZEN 鲜有报道。

目前常见的对蛋白质粗提取的方法为盐沉法。盐沉法最常见是逐步提高溶液中硫酸铵的浓度, 使蛋白质的浓度逐步降低形成沉淀, 以达到对蛋白质粗分离的目的。盐沉法的缺点使盐用量较大, 容易造成蛋白失活。而单宁沉淀法是指单宁可以和蛋白质形成一种不溶于水的复合物, 1 mol 的单宁可以和 12 mol 的蛋白质结合<sup>[18]</sup>, 之后找到一种合适的解析剂将蛋白质从单宁-蛋白质的复合物中解析出来。通常会选择聚氧化乙烯、聚乙二醇和山梨糖醇作为解析剂实现蛋白质的解析。曲丽丽等<sup>[19]</sup>对微生物发酵液进行单宁沉淀后, 使用了聚乙二醇作为解析液, 成功的从沉淀中解析出了纤维素酶。

本研究旨在从微生物含量丰富的农田土壤中, 分离、筛选出可以有效降解 ZEN 的菌株, 初步探究降解机理, 并使用单宁-聚乙二醇法进行粗蛋白的提取。为生物降解 ZEN 提供理论依据, 为 ZEN 污染问题提供一种解决方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

#### 1.1.1 样品

采集河南省郑州市、濮阳市周边生长农作物的土壤, 共计 14 份样品。

#### 1.1.2 主要试剂和培养基

ZEN 标准品纯度 $\geq 98\%$ , 上海源叶生物公司; 单宁、聚乙二醇 6000, 上海生工生物工程股份有限公司; 甲醇、乙腈色谱纯级, 其余试剂均为国产分析纯; 细菌微量生化反应管, 杭州滨和微生物有限公司。

富集培养基: 蔗糖 10 g/L, 磷酸二氢钾 1.52 g/L, 磷酸氢二钠 2.44 g/L, 硫酸镁 0.20 g/L, 硫酸铵 0.50 g/L, 胰蛋白胍 5 g/L, 琼脂 20 g/L (固体培养基) pH 7.2。

初筛无机盐培养基: 磷酸二氢钾 1.52 g/L, 磷酸氢二钠 2.44 g/L, 硫酸镁 0.20 g/L, 硫酸铵 0.50 g/L, 琼脂 20 g/L (固体培养基) pH 7.2。

LB 培养基: 胰蛋白胍 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 琼脂 20 g/L (固体培养基) pH 7.2。

#### 1.1.3 主要仪器设备

高效液相色谱, 安捷伦科技有限公司; QL-861

漩涡振荡器, 海门市林贝尔仪器制造有限公司; LDZ 立式高压蒸汽灭菌器, 上海甲康医疗器械厂; 霉菌培养箱, 上海齐客科学仪器; 双功能气浴恒温振荡器, 上海莱特实业发展有限公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 氮吹浓缩装置, 天津奥特赛思仪器有限公司; 冷冻高速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 ZEN 的检测方法

样品中 ZEN 浓度经二氯甲烷提取回收后甲醇复溶, 使用高效液相色谱法测定, 色谱柱安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus 95A C18 (4.6×250 mm, 5 μm); 流动相: (水:甲醇=20:80); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 紫外检测器: 波长 236 nm。

$$D = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%$$

式中:

$D$ —ZEN 的降解率, %;

$C_0$ —空白对照组 ZEN 的浓度, μg/mL;

$C$ —降解后 ZEN 浓度, μg/mL。

### 1.2.2 ZEN 降解菌株的筛选

使用采集的土壤样品, 称取 10 g 样品于锥形瓶中, 加入 90 mL 无菌生理盐水, 37 °C 恒温振荡 3 h, 取出后静置 30 min。吸取 1 mL 上清液于 10 μg/mL ZEN 的液体富集培养基中, 放置于 37 °C、160 r/min 的恒温气浴振荡器培养 48 h。吸取 100 μL 10 μg/mL ZEN 涂布至无机盐培养基中, 待毒素晾干后, 吸取 100 μL 富集培养后菌液涂布至含毒素的无机盐培养基, 放置霉菌培养箱中 37 °C 恒温培养, 观察生长情况。将生长情况良好的菌落挑至 LB 固体培养基上, 划线传代得到单一菌株。

将分离纯化出的单一菌株挑至 LB 液体培养基中, 于 160 r/min、37 °C 恒温发酵培养 48 h, 得到纯培养物的发酵液。移取发酵液 950 μL 于离心管中, 加入 50 μL 100 μg/mL ZEN 毒素, 涡旋 30 s 混合均匀, 使降解体系中 ZEN 的终浓度定为 5 μg/mL, 以无菌培养基与 ZEN 混合作为空白对照。将离心管放置于恒温气浴摇床中培养, 条件设为 37 °C、150 r/min、48 h, 3 组平行实验。取 3 倍体积二氯甲烷萃取, 涡旋振荡 2 min, 弃去上层水相, 将剩余二氯甲烷层放置于氮吹浓缩装置中 37 °C 恒温缓慢吹干, 吸取 1 mL 甲醇复溶残余物, 涡旋振荡 1 min, 用 0.22 μm 有机相滤膜过滤, 打入进样瓶中, 使用高效液相紫外检测器检测。其中降解率最高的命名为 *A.lwoffii.Haut.1*。

### 1.2.3 ZEN 降解菌株的鉴定

形态及生化实验鉴定: 将 *A.lwoffii.Haut.1* 在 LB 固体平板上划线, 放置于 37 °C 下培养 24 h。观察其菌落的形态。沾取少量菌落, 涂至载玻片上, 对其进行革兰氏染色, 于光学显微镜下观察菌体颜色及特征。使用无菌针挑取 *A.lwoffii.Haut.1* 的纯培养物, 接种于不同种类的生化反应管中, 于 37 °C 培养 48 h, 测定糖、盐类、MR、VP、吡啶实验等 12 种生理生化指标, 观察并记录结果。

16S rDNA 鉴定: 将 *A.lwoffii.Haut.1* 菌株划线分离出单一菌落, 纯化培养后, 对菌株的 DNA 进行提取与扩增。将得到的产物进行测序, 测序得到的序列在 NCBI 数据库中进行比对分析, 将比对分析出的数据使用 Mega 软件构建系统发育进化树。

### 1.2.4 ZEN 降解菌株降解 ZEN 的动力曲线

取菌株发酵液 950 μL 与 50 μL 100 μg/mL 的 ZEN 混合, 反应体系为 1 mL, 毒素终浓度为 5 μg/mL。混合后于 160 r/min、37 °C 培养, 分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 测定 ZEN 降解率。

### 1.2.5 ZEN 降解菌株降解 ZEN 活性物质定位

将菌株发酵液在 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 移取离心后的上清液于 10 mL 离心管中, 放置 4 °C 冰箱中保存, 剩余沉淀菌体使用灭菌后的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗沉淀两次后, 再次使用 PBS 缓冲液重悬, 制成菌悬液。将菌悬液放置冰上, 置于超声波细胞破碎器内, 超声 3 s, 间隔 3 s, 持续 15 min, 然后 12000 r/min 冷冻离心 20 min, 取上清液用 0.22 μm 的抽滤器无菌抽滤得到滤液即为胞内提取物。分别取 5 mL 上清液进行 121 °C 高温加热处理 20 min, 制得处理组 1, 加入蛋白酶 K, 浓度定为 5 mg/mL, 制得处理组 2, 加入 5 mg 蛋白酶 K 和 0.05 g SDS 制得处理组 3, 并对分别取 950 μL 菌株上清液、菌悬液、胞内提取物和处理组 1、2、3 与 50 μL ZEN 毒素标准液置于灭菌的 10 mL 离心管中, 旋涡 30 s, 使 ZEN 终浓度为 5 μg/mL。气浴摇床置于暗处, 培养条件设置为 150 r/min、37 °C、48 h, 3 组平行实验。反应结束后, 测定降解率。

### 1.2.6 ZEN 降解菌株降解酶的初步分离提取

取上清液 100 mL 于烧杯中, 低温条件下缓慢加入研磨后的硫酸铵, 硫酸铵最终浓度为 60%, 放入 4 °C 冰箱过夜, 12000 r/min 冷冻离心 10 min 获得蛋白沉淀。沉淀重新溶解在 5 mL 磷酸 (PB) 缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.3) 中, 随后, 样品用 3 ku 的透析袋 4 °C 透析 24 h, 交换液为蒸馏水。取透析过的样品 950 μL 与 50 μL ZEN 毒素标准液置于灭菌的 10 mL 离心管中, 旋涡 30 s, 使 ZEN 终浓度为 5 μg/mL。反应 48 h

后,测定降解率。

分别吸取 20 mL 无细胞上清液于 50 mL 的离心管中,加入单宁使终浓度分别定为 2、5、10、15、20 mg/mL,涡旋振荡 2 min,静置提取 2 h,4000 r/min 冷冻离心 10 min。取上清液 950  $\mu$ L 与 50  $\mu$ L ZEN 毒素标准液置于灭菌的 10 mL 离心管中,旋涡 30 s,使 ZEN 终浓度为 5  $\mu$ g/mL。反应 48 h 后,测定降解率,确定出单宁沉淀的最佳浓度。选择最佳单宁浓度沉淀蛋白,然后分别加入 6、8、10、12、14 mg/mL 聚乙二醇溶液,涡旋振荡 2 min,静置提取 2 h,4000 r/min 冷冻离心 10 min。取上清液 950  $\mu$ L 与 50  $\mu$ L ZEN 毒素标准液置于灭菌的 10 mL 离心管中,旋涡 30 s,使 ZEN 终浓度为 5  $\mu$ g/mL。反应 48 h 后,测定降解率,确定聚乙二醇解析单宁-蛋白质复合物的最佳浓度。

### 1.2.7 数据处理

采用 Origin 2021 软件进行分析

## 2 结果与分析

### 2.1 ZEN 降解菌株的筛选

表 1 分离来自不同样品的降解 ZEN 的菌株

Table 1 Isolation of ZEN degrading strains from different samples

菌株名称	降解率/%
LC-2020-1	40.32±2.52
LC-2020-3	56.49±2.65
LC-2020-6	20.10±1.15
<i>A.lwoffii.Haut.1</i>	93.54±1.52
LC-2020-13	33.21±2.08
LC-2020-14	43.43±1.53

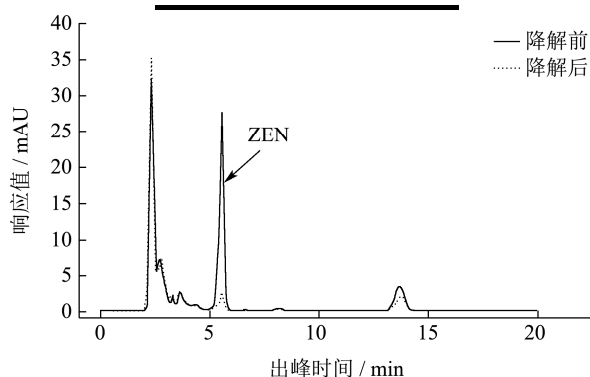


图 1 *A.lwoffii.Haut.1* 降解 ZEN 前后的 HPLC 色谱对比图

Fig.1 HPLC chromatographic contrast of *A.lwoffii.Haut.1* before and after degradation of ZEN

对 14 个土壤样品进行筛选,初筛得到 14 株菌株,可在 ZEN 为唯一碳源的培养基中生长,复筛得到 6 株菌株,可降解培养基中的 ZEN。其中从河南省荥阳

市小麦土壤中分离出的 *A.lwoffii.Haut.1* 降解率达到 93.54%,其他菌株降解率如表 1 所示。图 1 为 *A.lwoffii.Haut.1* 降解 ZEN 的 HPLC 色谱对比图,由图 1 可知,该菌株与 ZEN 共同培养 48 h 后,ZEN 峰(5.21 min)显著降低。因此,选择 *A.lwoffii.Haut.1* 进行后续的研究。

### 2.2 ZEN 降解菌株的鉴定

如图 2 所示, *A.lwoffii.Haut.1* 在 LB 培养基上涂布培养 24 h 的菌落形态:菌落形状呈褶皱、低凸起、边缘波浪状,菌落颜色为不透明灰白色。革兰氏染色结果为阴性菌,在显微镜下,呈短棒状,符合不动杆菌形态。采用各种细菌微量生化反应管结果显示, *A.lwoffii.Haut.1* 能够利用葡萄糖,其余葡萄糖酸盐、枸橼酸盐、甘露醇、木糖、山梨糖、蔗糖利用为阴性,过氧化氢酶实验、硝酸盐还原实验、VP 实验、MR 实验和吲哚实验为阴性。与鲁氏不动杆菌生理生化特征相似度很高<sup>[20]</sup>。

对 *A.lwoffii.Haut.1* 的 16S rDNA 基因序列进行扩增,序列如图 3 所示全长约为 1300 bp,测序后,将得出的结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析比对,结果显示,该菌株与鲁氏不动杆菌的 16S rDNA 基因序列相似度高达 99.90%。由图 4 所示,系统发育树中该菌株与鲁氏不动杆菌在同一分支上。通过生理生化特征和 16S rDNA 基因序列分析可初步鉴定 *A.lwoffii.Haut.1* 为鲁氏不动杆菌。

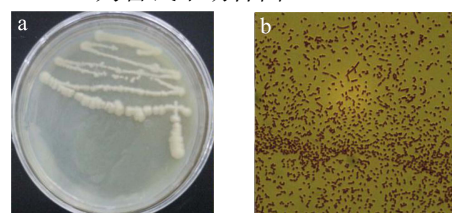


图 2 *A.lwoffii.Haut.1* 的菌落形态及革兰氏染色情况

Fig.2 Colony morphology and Gram staining of *A.lwoffii.Haut.1*

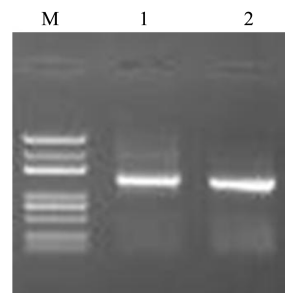


图 3 *A.lwoffii.Haut.1* 16S rDNA PCR 产物电泳

Fig.3 *A.lwoffii.Haut.1* strain 16S rDNA PCR product electrophoresis

注: M 从上到下依次为 5000、3000、2000、1000、750、500、250、100 bp。

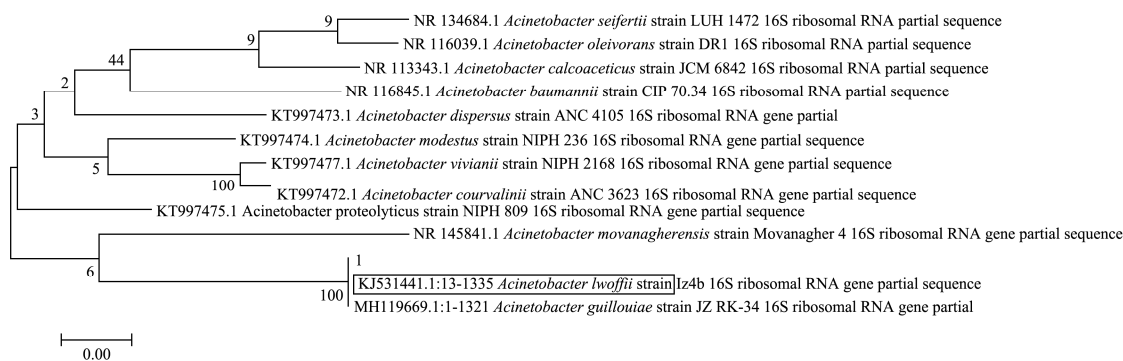


图4 *A. lwoffii. Haut. 1* 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *A.lwoffii.Haut.1*

### 2.3 ZEN 降解菌株降解 ZEN 的动力曲线

由图 5 可知,随着时间的增加,菌株发酵液的 ZEN 降解率不断增大,在 24 h 时,降解率可达 83.99%,在 36、48、60 和 72 h 时,ZEN 降解率分别为 90.46%、93.54%、94.06%和 94.56%,在 36 h 之后,降解率稳定在 90%以上。因此,最佳反应时间为 36 h。

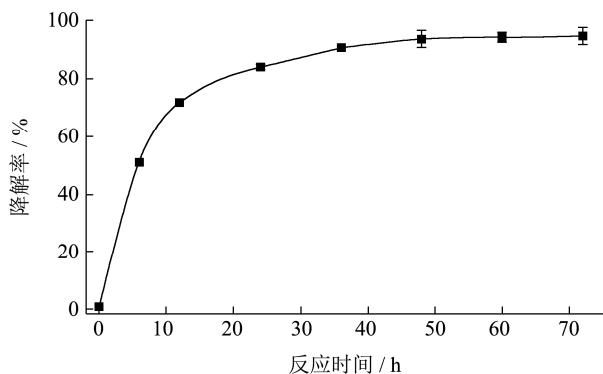


图 5 *A. lwoffii. Haut. 1* 降解 ZEN 的动力曲线

Fig.5 Kinetic curve of ZEN degradation by *A.lwoffii.Haut.1*

### 2.4 ZEN 降解菌株降解活性物质的定位

由图 5 可知,振荡培养 48 h 后, *A.lwoffii.Haut.1* 菌液的降解率为 93.54%,同批次菌液制备出的无细胞上清液、菌悬液和胞内提取物对 ZEN 的降解率分别为 82.31%、21.33%和 6.67%。对无细胞上清液进行加热(处理组 1)、蛋白酶 K(处理组 2)和蛋白酶 K+SDS 处理(处理组 3)。由图 5 可知,处理组 1、2 和 3 对 ZEN 降解率分别为 20.10%、41.67%和 18.68%。魏单平等<sup>[13]</sup>分离出一株解淀粉芽孢杆菌,菌株的发酵液和上清液对 ZEN 降解率为 95.60%和 68.93%,经加热、蛋白酶 K 和蛋白酶 K+SDS 处理后,上清液降解活性下降,推断降解活性物质主要为胞外酶。本研究结果说明, *A.lwoffii.Haut.1* 的降解活性物质主要集中在无细胞上清液中。将无细胞上清液进行不同处理后,降解率均出现明显下降。因此推断无细胞上清液中的降解

活性物质主要是菌体分泌到体外的某种蛋白,并具有一定的耐热能力。具体主要降解活性物质有待后续研究。

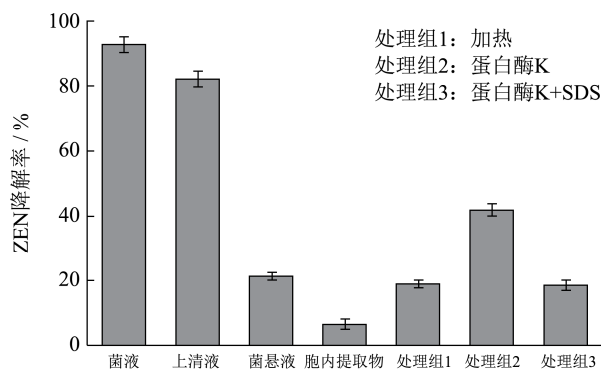


图 6 *A. lwoffii. Haut. 1* 的菌液、培养上清液、菌悬液、胞内提取物和处理组 1、2、3 对 ZEN 的降解率

Fig.6 *A. lwoffii.Haut.1*, culture supernatant, suspension, intracellular extract and treatment groups 1, 2 and 3 to the degradation rate of ZEN

### 2.5 ZEN 降解菌株降解酶的粗提取

盐沉法中使用 60%的硫酸铵沉淀得到的蛋白中 ZEN 降解酶含量较少或活性丧失比较严重,降解率为 20.30%。

由图 6 可知,随着单宁浓度的不断增加,单宁沉淀后的上清液对 ZEN 的降解率不断下降,当单宁浓度为 15 mg/mL 时,上清液降解率为 12.33%,并在此之后降解率下降变的缓慢。结果说明,单宁浓度为 15 mg/mL 时,单宁对降解酶的沉淀最为完全。

单宁沉淀时,选定最佳浓度 15 mg/mL,沉淀采用不同浓度的聚乙二醇溶液解析。由图 6 可知,当聚乙二醇溶液浓度为 10 mg/mL 时,解析出的上清液降解率为 64.33%,之后随着浓度增大,降解率出现了轻微下降的趋势。曲丽丽<sup>[19]</sup>使用硫酸铵沉淀法、单宁-聚乙二醇沉淀法和超滤法进行黑曲霉发酵液中纤维素酶的提取,对比结果显示,硫酸铵盐沉法容易导致酶失活,



且盐用量较大,超滤法中膜易受污染,单宁-聚乙二醇法有着方便和快捷的优点,并且提取酶活率高达93.50%。本研究结果说明,硫酸铵盐沉淀法很容易造成*A.lwoffii.Haut.1*降解酶的失活,因此采用单宁-聚乙二醇沉淀法提取降解酶,当单宁浓度为15 mg/mL,聚乙二醇溶液浓度为10 mg/mL时,解析出的降解酶活性较高,随着浓度增大,出现降解率下降的现象,初步推断为,聚乙二醇的浓度过大导致影响降解酶的降解效果。

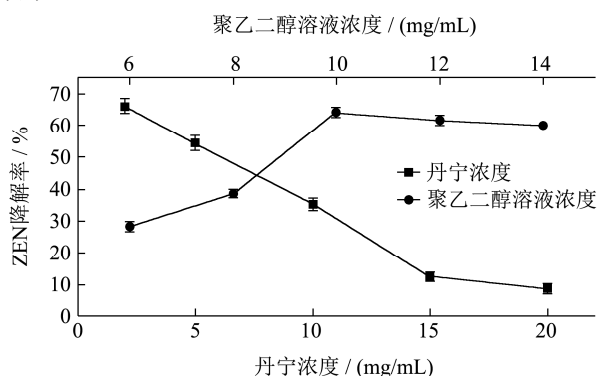


图7 不同单宁浓度沉淀后与不同聚乙二醇溶液浓度解析后上清液的降解率

Fig.7 Degradation rate of supernatant after precipitation with different tannin concentration and resolution with different polyethylene glycol solution concentration

### 3 讨论

相对比邓桃等<sup>[21]</sup>筛选出一株对ZEN降解率最高为85.77%的醋酸钙不动杆菌,魏单平等<sup>[13]</sup>分离出一株解淀粉芽孢杆菌,菌株的发酵液和上清液对ZEN降解率为95.60%和68.93%,本研究获得的菌株对ZEN降解率最高为93.54%,降解效果较好,并且该菌株的无细胞上清液降解率为82.31%,证明上清液中胞外酶活性较高。因此,该菌株有利于后期对降解酶的提取。有研究表明不动杆菌具有代谢多种有机化合物的能力,被认为具有巨大的生物技术潜力<sup>[22-24]</sup>,并且已知不动杆菌菌株通常容纳大量的可移动元素,包括不同大小的质粒<sup>[22]</sup>。质粒除了能够进行自我复制和传播编码模块外,还可以携带不同数量的基因,使宿主细胞能够在一种对生长具有致命性或限制性的环境中生存。

### 4 结论

本研究中所获得的鲁氏不动杆菌为玉米赤霉烯酮的生物脱毒提供了新的研究材料,在本研究的基础上,我们将进一步对降解产物进行结构鉴定和毒性研究,并且对降解粗蛋白进行分离纯化以及对降解基因进行

挖掘研究。

4.1 本研究中从河南郑州市、濮阳市周边耕地的土壤样品中筛选出一株能够高效降解ZEN的菌株*A.lwoffii.Haut.1*,经形态、生理生化鉴定和16S rDNA鉴定为鲁氏不动杆菌。

4.2 该菌株在pH 7.2的LB培养基中37℃、150 r/min培养48 h后,对初始浓度为5 μg/mL的ZEN降解率为93.54%。

4.3 菌株的降解活性定位实验结果表明,该菌株的上清液具有较强的降解效果,通过对无细胞上清液的加热、蛋白酶K和蛋白酶K+SDS,无细胞上清液降解ZEN能力下降明显,结果表明,上清液中降解ZEN的活性物质是某种或者多种未知的酶。

4.4 使用单宁-聚乙二醇法和盐沉淀法对无细胞上清液进行降解粗蛋白的提取,结果表明,60%硫酸铵沉淀得到的蛋白,ZEN降解率为20.30%,提取出有活性的降解酶较少。当单宁浓度为15 mg/mL,聚乙二醇溶液浓度为10 mg/mL时,提取效果最好,提取出的上清液降解率为64.33%。在蛋白提取中,可能损失一定量的降解活性物质,本研究证明提取出粗蛋白的上清液降解率与无细胞上清液降解率相比出现了一定的下降。

### 参考文献

- [1] Yang D, Jiang X, Sun J. Toxic effects of zearalenone on gametogenesis and embryonic development: a molecular point of review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119(1): 24-30
- [2] Kim S H, Vujanovic V. Biodegradation and biotransformation of *Fusarium* mycotoxins by *Sphaerodes mycoparasitica* [J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 1-9
- [3] 吕俊美,王文哲,王得州.玉米赤霉烯酮的毒性作用及检测方法研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2020,9:38-41
- [4] LYU Junmei, WANG Wenzhe, WANG Dezhou. Research progress on toxicity and detection methods of zearalenone [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinarian*, 2020, 9: 38-41
- [5] Hueza I M, Raspantini P C, Raspantini L E. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound [J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(3): 1080-1095
- [6] 付少伟,孙淑敏,谢岩黎.基于酶联适体竞争法检测谷物制品中真菌毒素的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2021,42(1):56-62
- [7] FU Shaowei, SUN Shumin, XIE Yanli. Determination of mycotoxins in cereal products by enzyme - linked aptamer competition method [J]. *Journal of Henan University of*

- Technology (Natural Science edition), 2021, 42(1): 56-62
- [6] 武亭亭,杨丹.粮食加工品中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素污染情况调查[J].食品安全质量检测学报,2019,10(12):3674-3678  
WU Tingting, YANG Dan. Investigation on contamination of zearalenone and emesis toxin in processed grain products [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(12): 3674-3678
- [7] 赵仁勇,宋斌.玉米赤霉烯酮生物脱毒研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(2):113-121  
ZHAO Renyong, SONG Bin. Progress in biological detoxification of zearalenone [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science edition), 2018, 39(2): 113-121
- [8] Karlovsky P, Suman M, Berthiller F. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination [J]. Mycotoxin Res, 2016, 32(4): 179-205
- [9] Sun J, Xia Y, Ming D. Whole-Genome sequencing and bioinformatics analysis of *Apiotrichum mycotoxinivorans*: predicting putative zearalenone-degradation enzymes [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1866
- [10] Xu L, Sun X, Wan X. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* H6 thioesterase involved in zearalenone detoxification by transcriptomic analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(37): 10071-10080
- [11] De Oliveira Garcia S, Sibaja K V M, Nogueira W V. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer [J]. Food Res Int, 2020, 131: 109039
- [12] Yi P-J, Pai C-K, Liu J-R. Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 27(5): 1035-1043
- [13] Cho K J, Kang J S, Cho W T. *In vitro* degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis* [J]. 2010, 32(12): 1921
- [14] 魏单平,刘玉洁,孙向丽.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选及其活性检测[J].畜牧兽医学报,2017,48(4):761-768  
WEI Danping, LIU Yujie, SUN Xiangli. Screening and activity detection of zearalenone degrading bacteria [J]. Chinese Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 48(4): 761-768
- [15] Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E. A new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins [J]. Syst Appl Microbiol, 2004, 27(6): 661-671
- [16] Zhao L, Jin H, Lan J. Detoxification of zearalenone by three strains of *Lactobacillus plantarum* from fermented food *in vitro* [J]. Food Control, 2015, 54: 158-164
- [17] Kriszt R, Krifaton C, Szoboszlai S. A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e43608
- [18] J M D Nascimento, Leo T, Nascimento T P, et al. Evaluation of the influence of temperature on the protein-tannic acid complex [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182(3): 2056-2065
- [19] 曲丽丽.海洋黑曲霉固态发酵耐盐纤维素酶的培养条件优化及粗酶制剂的制备[D].杭州:浙江大学,2017  
QU Lili. Optimization of culture conditions for salt-tolerant cellulase in solid state fermentation of marine *Aspergillus Niger* and preparation of crude enzyme preparation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017
- [20] 王文华,李秀婷,徐友强.不动杆菌来源酯键水解酶生物信息学分析及 PAEs 降解机理[J].中国食品学报,2021,21(3): 31-42  
WANG Wenhua, LI Xiuting, XU Youqiang. Bioinformatics analysis of ester bond hydrolase from *Acinetobacter* and PAEs degradation mechanism [J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 21(3): 31-42
- [21] 邓桃,袁青松,周涛,等.一株玉米赤霉烯酮高效降解细菌的筛选与降解条件研究[J].中国中药杂志,2021,46(20):5240-5246  
DENG Tao, YUAN Qingsong, ZHOU Tao, et al. Screening and degradation conditions of a zearalenone degrading bacterium [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(20): 5240-5246
- [22] Walter T, Klim J, Jurkowski M. Plasmidome of an environmental *Acinetobacter lwoffii* strain originating from a former gold and arsenic mine [J]. Plasmid, 2020, 110: 102505
- [23] Veress A, Nagy T, Wilk T. Abundance of mobile genetic elements in an *Acinetobacter lwoffii* strain isolated from Transylvanian honey sample [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 29-69
- [24] Xu N, Qiu C, Yang Q, et al. Analysis of phenol biodegradation in antibiotic and heavy metal resistant *Acinetobacter lwoffii* NLI [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 725755-725755