吴梦影, 叶永丽, 杨阳, 等. 枯草芽孢杆菌 23830 对玉米赤霉烯酮的体外生物转化研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 177−185. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010074

WU Mengying, YE Yongli, YANG Yang, et al. *In Vitro* Biotransformation of Zearalenone by *Bacillus subtilis* Strain 23830[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 177−185. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010074

· 生物工程 ·

枯草芽孢杆菌 23830 对玉米赤霉烯酮的体外生物转化研究

吴梦影[1,2,3], 叶永丽[1,2,3], 杨　阳[1,2,3], 纪　剑[1,2,3,*], 王　伟[4], 曹际娟[5], 孙秀兰[1,2,3]

（1.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;
2.国家市场监督管理总局重点实验室（食品安全风险物质甄别与防控）, 江苏 无锡 214122;
3.江苏集萃未来食品技术研究所有限公司, 江苏 宜兴 214200;
4.国家食品安全风险评估中心, 北京 100023;
5.大连民族大学生命科学学院, 辽宁 大连 116600）

摘　要: 为了探究益生菌对安全脱除饲料中玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）的应用潜力，本研究筛选并验证了一株来源于土壤的枯草芽孢杆菌 23830 对 ZEN 的转化能力。通过优化发酵条件，确定了最佳的 ZEN 脱除参数；借助 UHPLC/Q-TOF-MS 和 HepG2 细胞实验分析了转化产物的结构及体外毒性；最后将其投入玉米副产物中发酵以评估其在饲料发酵脱毒领域的应用潜力。结果显示，对 ZEN 具有转化作用的蛋白酶存在于细胞内容物中，在菌株添加量为 2%（1×10^7 CFU/mL），发酵温度 37 ℃，发酵时间 12 h，pH 为 7.0 的条件下对 ZEN 脱除率可达 60.47%±2.18%。ZEN 的主要转化产物为玉米赤霉烯酮-14-硫酸盐（ZEN-14-Sulf），其细胞毒性较 ZEN 明显减弱。此外，该菌株在玉米胚芽粕、喷浆玉米皮、玉米蛋白粉和玉米浆中对 ZEN 的脱除率分别达到 15.67%±0.64%、19.22%±2.35%、30.71%±0.79%、45.44%±2.73%，显示出实际应用于饲料脱毒的潜力。本研究筛选得到的枯草芽孢杆菌 23830 不仅能实现 ZEN 的低毒性转化，还能有效脱除饲料中的 ZEN，为饲料中 ZEN 的安全脱除提供了新的菌种资源。

关键词: 玉米赤霉烯酮, 枯草芽孢杆菌 23830, 生物转化, 转化产物, 饲料脱毒
中图分类号: TS207.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0177−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010074
本文网刊:

In Vitro Biotransformation of Zearalenone by *Bacillus subtilis* Strain 23830

WU Mengying[1,2,3], YE Yongli[1,2,3], YANG Yang[1,2,3], JI Jian[1,2,3,*], WANG Wei[4], CAO Jijuan[5], SUN Xiulan[1,2,3]

（1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2.Key Laboratory of Screening, Prevention, and Control of Food Safety Risks, State Administration for Market Regulation, Wuxi 214122, China;
3.Institute of Future Food Technology, Yixing 214200, China;
4.China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100023, China;
5.School of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China）

Abstract: This study aimed to explore the potential application of probiotics for the safe removal of zearalenone (ZEN) from feed by screening and validating the ZEN transformation capability of a soil-derived *Bacillus subtilis* strain 23830.

收稿日期: 2025−01−09
基金项目: 国家重点研发计划项目（2022YFF1100703）; 玉米产业技术体系科学家项目（CARS-02-40）。
作者简介: 吴梦影（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: 6220111116@stu.jiangnan.edu.cn。
*** 通信作者:** 纪剑（1988−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全检测与主动防控, E-mail: jijian@jiangnan.edu.cn。

Critical fermentation parameters were systematically optimized to maximize ZEN removal efficiency. The structural characterization and *in vitro* toxicity profile of biotransformation products were analyzed using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS) and HepG2 cytotoxicity assays. The strain was further evaluated for practical application through fermentation trials on corn by-products. Key findings revealed that ZEN-transforming proteases were predominantly localized in the intracellular fraction. Under optimal transformation conditions (2% inoculum [1×10^7 CFU/mL], 37 ℃, pH7.0, 12 h incubation), a ZEN removal rate of 60.47%±2.18% was achieved. Structural analysis identified zearalenone-14-sulfate (ZEN-14-Sulf) as the primary metabolite, which demonstrated significantly reduced cytotoxicity compared with the parent compound. In practical applications, the strain exhibited differential detoxification efficiencies across substrates: 15.67%±0.64% (corn germ meal), 19.22%±2.35% (corn gluten feed), 30.71%±0.79% (corn protein powder), and 45.44%±2.73% (corn slurry). The *Bacillus subtilis* strain 23830 characterized in this study represents a promising microbial candidate for feed detoxification, enabling both effective ZEN reduction and low-toxicity biotransformation. These findings advance the development of probiotic-based strategies for mycotoxin mitigation in agricultural systems.

Key words: zearalenone; *Bacillus subtilis* strain 23830; biotransformation; transformation product; feed detoxification

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是已知的 400 多种真菌毒素中危害性较大的种类(图 1), 主要由镰刀菌属产生, 被广泛检出于全球谷物及其副产物中, 对农业生产构成严重威胁[1−3]。2022 年全国各类原料及饲料中真菌毒素污染情况较为严重[4], 各类原料及饲料中 ZEN 的检出率均较高, 其中玉米副产物中 ZEN 超标率最高, 达到了 22.50%, 检出值最高达 15976.50 μg/kg。ZEN 能够激活雌激素相关基因活性, 从而造成对生殖系统的毒性作用[5−6]。其次肝脏是 ZEN 代谢的主要器官[7], ZEN 会诱导肝脏组织病理学变化[8], 因此 ZEN 还具有明显的肝毒性。若 ZEN 在粮食加工过程中持续存在不加以去除, 人们可能会直接通过食用受污染的食品接触到这种真菌毒素, 或者间接地通过接触那些曾暴露于 ZEN 的动物源性产品而受到影响。

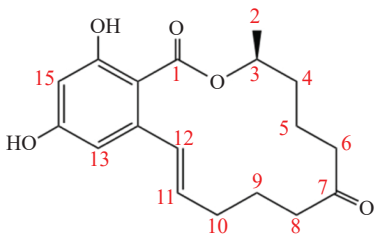


图 1 玉米赤霉烯酮(ZEN)的化学结构式

Fig.1 Chemical structure formula of zearalenone (ZEN)

物理、化学和生物法是去除食品及饲料中 ZEN 的主要方式[9]。但物化法在实际应用上存在许多局限性, 如高成本和破坏产品的营养价值等[10]。生物法已被证明可有效将 ZEN 转化为毒性较小的产物, 且更具效率、特异性及环保性[11−12]。多种微生物已被研究证实可以有效解除 ZEN 的毒性, 包括真菌、酵母和细菌[13−15]。然而, 由于涉及解毒产品自身的毒性和副作用, 绝大多数微生物是不被允许添加进饲料或食品发酵体系中的[16]。基于微生物使用安全性的问题, 大大制约了微生物法脱毒技术在实践中的应用推广。

益生菌因其安全性而受到关注。一些芽孢杆菌属以及乳酸菌属于益生菌的范畴, 它们中的一些已被证实能有效去除 ZEN, 去除方式主要分为菌体吸附作用和生物分泌酶降解或转化作用[10,17]。Vega 等[18]评估了 5 株乳酸菌吸附 ZEN 的能力, 发现吸附能力都高于 40%, 其中一株植物乳杆菌 L4 对 ZEN 的吸附率最高可达 68.2%。Guo 等[19] 分离出一株贝莱斯芽孢杆菌 ANSB01E, 孵育 48 h, 对 LB 培养基中 ZEN 的降解率可达 95%, 可将发霉玉米中 ZEN 含量由 0.69 μg/mL 降至 0.17 μg/mL。Yang 等[20] 发现一株枯草芽孢杆菌 Y816 可在 7 h 内转化 40 mg/L 的 ZEN。Chen 等[16] 筛选到一株枯草芽孢杆菌 B2, 能对高 ZEN 污染玉米样品(5 mg/kg)实现 56% 的脱毒率, 并且处理后的样品表现出了更好的发酵特性。总体来说, 乳酸菌对 ZEN 的脱除大多基于细胞壁中肽聚糖等成分的吸附作用, 并且不同菌株的吸附类型和能力各不相同。对于芽孢杆菌而言, 大多数对 ZEN 的去除作用是由其分泌酶引起的, 通过裂解或偶联的方式降低 ZEN 自身的毒性作用, 以吸附作用进行解毒的占比较小[21]。由于 ZEN 的裂解或转化能从根源上解除 ZEN 的毒性, 而吸附只是将 ZEN 分离出体系, 所以芽孢杆菌在饲料发酵体系中有着更好的脱毒优势。益生菌相比于其他安全性未知的菌株而言, 其在饲料中的发酵安全性能够得到保障, 因此以益生菌为目标开展脱除 ZEN 的研究, 对解决食品和饲料中 ZEN 污染问题具有实际意义。

综上所述, 本研究旨在探究益生菌对脱除饲料中 ZEN 的应用潜力。为此, 本研究选取了 9 株在饲料发酵领域应用广泛的益生菌进行筛选, 发现其中一株枯草芽孢杆菌 23830 表现良好。然后进一步研究了该菌株转化 ZEN 的活性部位, 并分析了主要转化产物的分子质量、可能的结构和细胞毒性。为了验证其应用价值, 本研究还将该菌株应用于玉米加工副产物的脱毒发酵, 以探索其在阳性样品中去除 ZEN 的潜力。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

植物乳植杆菌（保藏号：CGMCC 1.16089）、德氏乳杆菌保加利亚亚种（保藏号：CGMCC 1.3970）、嗜热链球菌（保藏号：CGMCC 1.1864）、干酪乳酪杆菌（保藏号：CGMCC 1.575）　中国普通微生物菌种保藏管理中心；枯草芽孢杆菌　中国典型培养物保藏中心（保藏号：CCTCC WB 20081006）；枯草芽孢杆菌（保藏号：CICC 23592）、贝莱斯芽胞杆菌（保藏号：CICC 24434）、枯草芽孢杆菌（保藏号：CICC 23830）、凝结魏茨曼氏菌（保藏号：CICC 24625）　中国工业微生物菌种保藏管理中心；玉米加工副产物污染样本（玉米胚芽粕、喷浆玉米皮、玉米蛋白粉、玉米浆）　某玉米加工企业；玉米赤霉烯酮标准品（纯度≥98.50%）　北京普华仁生物技术开发有限公司；甲醇（质谱纯）、乙腈（质谱纯）、三氯甲烷（分析纯）　上海国药集团化学试剂有限公司；LB 培养基、MRS 培养基　青岛海博生物技术有限公司；十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate, SDS）、蛋白酶 K（酶活力>30 U/mg）、氢氧化钠　上海泰坦科技股份有限公司；胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS）、DMEM 培养基　赛默飞世尔科技公司；CCK-8 试剂盒　上海碧云天生物技术股份有限公司。

Agilent 1260 HPLC 系统　配有紫外检测器，美国安捷伦公司；UHPLC/Q-TOF-MS 超高效液相串联四极杆飞行时间质谱仪　配有电喷雾离子源（ESI）及 MassLynx V4.2 数据处理系统，美国沃特世公司；CT90A 型全自动立式蒸汽灭菌锅　上海伯能仪器有限公司；SPX-250B-Z 型生化培养箱　上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机、SCIENTZ-10N/A 型冷冻干燥机、SCIENTZ-10LS 型离心浓缩仪　宁波新芝生物科技股份有限公司；INFINITE 200 PRO 型多功能酶标仪　帝肯奥地利有限责任公司；MGF 型鼓风干燥箱　上海牧朗仪器制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　供试菌株的发酵　从–80 ℃ 冰箱中取出冻存的 9 株供试菌，解冻后以 1% 的添加量将枯草芽孢杆菌 WB、枯草芽孢杆菌 23592、贝莱斯芽胞杆菌、枯草芽孢杆菌 23830、凝结魏茨曼氏菌分别于 LB 培养基，将植物乳植杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、干酪乳酪杆菌分别于 MRS 培养基中，在 37 ℃ 的恒温培养箱中活化培养 24 h。划线得到单菌落后，挑取接种于培养基得到各菌株种子液。将各菌株种子液以 1% 添加量加入液体培养基中，37 ℃ 环境中培养 24 h 后得到各菌株发酵液（菌株浓度为 1×10^8 CFU/mL），备用。

1.2.1.1　ZEN 脱除菌株的筛选　取菌株的发酵液 4950 μL，加入 50 μL 的 100 μg/mL ZEN 标准工作液，使其终浓度为 1.0 μg/mL，以无菌培养基加 ZEN 毒素作为空白对照，各设置三组平行，置于 37 ℃、180 r/min 摇床中培养 12 h 和 24 h 后分别取样 1 mL，检测 ZEN 残留量，计算 ZEN 脱除率（D），公式如下：

$$D(\%) = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100$$

式中：D 表示 ZEN 脱除率，%；D_1 表示对照样品中 ZEN 含量，μg/mL；D_2 表示实验样品中 ZEN 含量，μg/mL。

1.2.1.2　ZEN 检测方法　取反应完成的样品 1 mL 加入三倍体积的三氯甲烷，充分振荡，重复提取三次。待三氯甲烷于冷冻干燥机中离心挥干后，加入 1 mL 的 50% 甲醇溶解，经 0.22 μm 滤膜过滤后转入色谱小瓶，使用 HPLC 测定 ZEN 含量。配制质量浓度梯度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 μg/L 的 ZEN 标准溶液。

液相色谱条件如下：C_{18} 反相柱（柱长 150 mm，直径 4.6 mm，内径 4 μm）和紫外检测器（VWD，254 nm），进样量 20 μL，流动相为乙腈/水溶液（60∶40，V/V），流速 0.6 mL/min，柱温 30 ℃，等度洗脱 15 min。

1.2.2　菌株脱除 ZEN 的活性物质定位　通过不同方式获取枯草芽孢杆菌 23830 发酵液各组分。上清液：将发酵液离心（4 ℃，8000 r/min，10 min），收集上清液并通过 0.22 μm 过滤器过滤。菌体细胞：将发酵液离心，收集菌体细胞，使用无菌 PBS 洗涤三次后等体积复溶。细胞内容物：将菌体细胞在 400 W、工作 5 s、间歇 5 s 的条件下破碎 30 min，离心得上清液并过 0.22 μm 滤膜。高温灭活上清液：将发酵液在 0.1 MPa、121 ℃ 下高压灭菌 20 min 进行灭活处理，离心取上清液并使用 0.22 μm 滤膜过滤。高温灭活菌体细胞：将发酵液在 0.1 MPa、121 ℃ 下高压灭菌 20 min 进行灭活处理，离心收集菌体细胞，使用无菌 PBS 洗涤三次后等体积复溶。分别取相同体积的上述各组分加入 ZEN，使体系 ZEN 的终浓度为 1.0 μg/mL。在 37 ℃、180 r/min 的条件下培养 24 h 取样 1 mL，使用 HPLC 检测并计算 ZEN 脱除率。同时用含有相同浓度 ZEN 的 LB 培养基/无菌 PBS 作为对照组，每个样品设置 3 个重复。

1.2.3　细胞内容物中活性物质探究　为了确定细胞内容物中是否存在某种活性酶对 ZEN 具有脱除作用，使用蛋白酶 K、SDS 以及高温灭活处理细胞内容物。将一组细胞内容物与 1 mg/mL 蛋白酶 K 在 55 ℃ 水浴中反应 2 h；一组细胞内容物与 1 mg/mL 蛋白酶 K 和 0.5 mg/mL 的 SDS 在 55 ℃ 水浴中反应 2 h；一组细胞内容物在 100 ℃ 沸水下加热 20 min。各组分别取相同体积并加入 ZEN 至 1 μg/mL，置于 37 ℃、180 r/min 的条件下反应 24 h，对照组为添加相同浓度 ZEN 的无菌 PBS，每个样品设置 3 个重复。

1.2.4 菌株脱除 ZEN 条件优化 发酵时间: 向 pH 为 6.0 的 LB 液体培养基中接种入 1% 的菌株发酵液, 同时加入 ZEN, 使体系 ZEN 的终浓度为 1 μg/mL。置于 37 ℃、180 r/min 的条件下培养, 于 2、4、8、12、24、36 h 分别取样。发酵温度: 其他条件不变, 将菌株置于 20、25、30、37、45、50 ℃ 下培养 24 h 后取样。pH: 其他条件不变, 将 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 培养 24 h 后取样。菌液添加量: 其他条件不变, 分别接种 0.25%、0.5%、1%、2%、5%、10% 的菌株发酵液(菌株浓度分别为 1.25×10^6、2.5×10^6、5×10^6、1×10^7、2.5×10^7、5×10^7 CFU/mL)培养 24 h 后取样。使用 HPLC 检测并计算 ZEN 脱除率。同时用含有相同浓度 ZEN 的 LB 培养基作为对照组, 每个样品设置 3 个重复。

1.2.5 ZEN 转化产物分析 在最优发酵条件下, 将菌株置于 ZEN 浓度为 10 μg/mL 的体系中反应完成后离心后取上清 200 μL, 加入 800 μL 的甲醇乙腈混合液(1∶1, V/V), 混匀并在 4 ℃ 放置 2 h 后离心, 取上清挥干, 再加入 200 μL 的 50% 乙腈水复溶后离心, 取上清装入进样小瓶作为试验组样品。阴性对照组为菌株发酵液, 阳性对照组为含有 10 μg/mL ZEN 的 LB 培养基, 处理方式与上述相同。利用高分辨质谱 UHPLC/Q-TOF-MS 检测, MassLynx V4.2 软件分析处理数据。

1.2.5.1 色谱条件 配备 Acquity BEH C_{18} 色谱柱(75 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 柱温 35 ℃, 进样量 2 μL, 样品室温度 4 ℃。流动相为乙腈(流动相 A)和 125 mmol/L 甲酸水溶液(流动相 B), 流速 0.3 mL/min, 洗脱梯度如表 1 所示。

表 1 洗脱梯度
Table 1 Gradient of elution

时间(min)	A(%)	B(%)
0	2	98
8	100	0
13	90	10
15	90	10

1.2.5.2 质谱条件 负电喷雾电离(ESI^-); 毛细管电压 3.0 kV; 锥孔电压 35 V; 离子源温度 110 ℃; 脱溶剂温度 350 ℃; 锥气(N_2)流速 50 L/h; 脱溶气(N_2)流量 800 L/h; 碰撞池内雾化器压力为 6.5 bar。质谱在 m/z=50~1000 的扫描范围内进行。

1.2.6 ZEN 和转化产物的体外毒性分析 将菌株发酵液与不同浓度 ZEN(0、0.5、1、2、5、10 μg/mL)于 37 ℃、180 r/min 的条件下反应 24 h。取反应完成的样品 1 mL 与甲醇乙腈混合液(1∶1, V/V)混匀并在 4 ℃ 放置 2 h 后离心(4 ℃, 8000 r/min, 10 min), 取上清并置于冷冻离心干燥机中挥干后, 使用 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基溶解以获得转化产物组的样品。将 LB 培养基与不同浓度 ZEN 在上述相同条件下反应后, 取样 1 mL 经三氯甲烷提取后挥干, 用 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基溶解以获得标品组的样品。以不给药的 HepG2 细胞作为对照组, 以不含 HepG2 细胞的完全培养液为空白组。将 HepG2 细胞接至 96-孔板中培养 24 h。待细胞贴壁后, 弃去培养基, 加入 100 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基(添加了 ZEN、转化产物组的药物, 不含药物, 每个处理做 6 个平行)。培养 24 h 后, 加入 100 μL 显色溶液(含有 10% CCK-8 的完全培养液)孵育 3 h。然后将 96-孔板置于酶标仪中使用 450 nm 波长检测各孔吸光值, 计算样品的细胞存活率(CV), 计算公式如下:

$$CV(\%) = \frac{AS - AB}{AC - AB} \times 100$$

式中, CV 表示细胞存活率, %; AS 表示实验组吸光值, Abs; AC 表示对照组吸光值, Abs; AB 表示空白组吸光值, Abs。

1.2.7 菌株对玉米加工副产物中 ZEN 的脱除 取 25 mL 菌株发酵液, 加入 5 g 灭菌后的玉米加工副产物阳性样本(玉米胚芽粕、喷浆玉米皮、玉米蛋白粉), 于 37 ℃、220 r/min 的条件下发酵, 对照组加入同体积的无菌水替代菌株发酵液, 3 d 后取出发酵完成样品于 70 ℃ 的烘箱中烘干。称取 1 g 样品, 按照料液比 1 g∶3 mL 依次加入超纯水、三氯甲烷, 充分涡旋混匀后超声 10 min, 然后在 25 ℃、8000 r/min 的条件下离心 10 min, 收集下层三氯甲烷层, 重复提取 3 次。待三氯甲烷于冷冻离心干燥机中挥干后, 加入 1 mL 的 50% 甲醇复溶, 过 0.22 μm 有机滤膜后装入进样瓶, 检测 ZEN 含量并计算脱除率。使用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液将玉米浆 pH 调至 6.0 并灭菌, 在 20 mL 玉米浆阳性样本中加入 5% 的菌株发酵液混匀, 于 37 ℃、180 r/min 的条件下发酵, 对照组加入 5% 的无菌水替代菌株发酵液, 在 24 h 后取样 1 mL 检测 ZEN 含量并计算脱除率。

1.3 数据处理

每个实验均设置三组平行, 结果以“平均值±标准差”表示, 以 $P<0.05$ 表示统计学显著性差异。使用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 26 软件对数据进行报告及显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对 ZEN 脱除能力的比较

本研究供试菌株均为益生菌, 是中国农业部允许投入饲料发酵体系中使用的菌株。9 株菌经由培养基体系筛选, 结果显示这些菌株对 ZEN 的脱除率主要分布在 30% 至 40% 之间。其中枯草芽孢杆菌 23830 对 ZEN 的脱除率在 12 h 就能达到 53.66%±2.12%, 在发酵 24 h 后 ZEN 脱除率仍然保持稳定(图 2)。综合评价菌株对 ZEN 的脱除效率及稳定性, 选取枯草芽孢杆菌 23830 作为后续研究菌株。

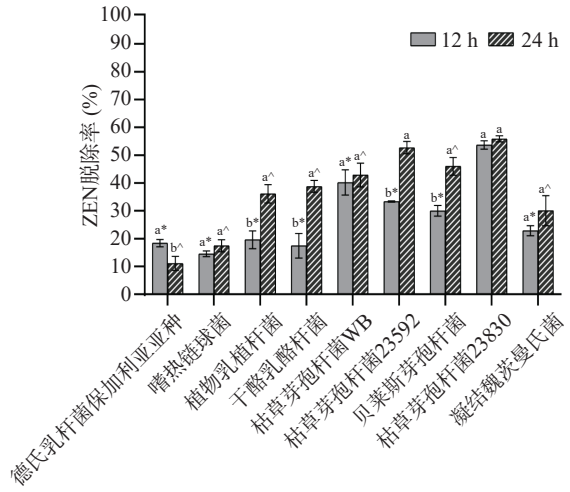


图 2　各菌株对 ZEN 的脱除率

Fig.2　Removal rate of ZEN by each strain

注：不同字母表示相同菌株不同处理时间之间的差异显著（P<0.05），*表示 12 h 时其他菌株与枯草芽孢杆菌 23830 之间的差异显著（P<0.05），^表示 24 h 时其他菌株与枯草芽孢杆菌 23830 之间的差异显著（P<0.05）。

2.2　菌株脱除 ZEN 的活性组分

如图 3A 所示，枯草芽孢杆菌 23830 的发酵上清液对 ZEN 的脱除率为 6.94%，菌体细胞对 ZEN 的脱除率能达到 56.71%。与活细胞相比，高温灭活处理后显著降低（P<0.05）了菌体细胞对 ZEN 的脱除效果（脱除率 31.31%）。由于加热过程可能会增加细胞的活性吸附位点并增强吸附毒素的能力，但也会导致酶失活并降低它们降解或转化毒素的能力[22]。本研究结果表明，经高温处理后的菌体细胞对 ZEN 的脱除能力未呈现增强趋势，各组分反而均表现出 ZEN 脱除率降低的现象。说明该菌株对 ZEN 的脱除作用可能并非主要依赖于菌体吸附，还可能与菌体分泌的酶介导的降解或转化过程相关。另一方面，高温处理前后的发酵上清液均未表现出显著的 ZEN 脱除效果（脱除率低于 10%），说明脱除 ZEN 的活性物质不是主要分布在发酵上清液中。而菌株细胞内容物对 ZEN 的脱除率可达 52.48%，基本与菌体细胞对 ZEN 的脱除效果持平，说明菌株细胞内容物是发挥脱除 ZEN 作用的主要组分。张晨曦等[23] 对菌株 NS2 降解活性成分分析结果显示，活菌体细胞 ZEN 降解率为 57%，细胞内容物 ZEN 降解率可达到 40.3%，推测该降解活性物质存在于胞内，与本研究得出的结果相似。

如图 3B 所示。经过高温处理后，细胞内容物对 ZEN 的脱除率显著（P<0.05）下降（28.09%），说明细胞内容物中的活性物质具有热不稳定性。分别使用蛋白酶 K 和蛋白酶 K＋SDS 处理后，ZEN 脱除率分别降低至 4.27% 和 1.93%。蛋白酶 K 能够降解所有的蛋白质，使其失去功能和活性，SDS 会使蛋白质的三级结构变性。本研究结果显示细胞内容物在经蛋白酶 K 和蛋白酶 K+SDS 处理后对 ZEN 脱除率

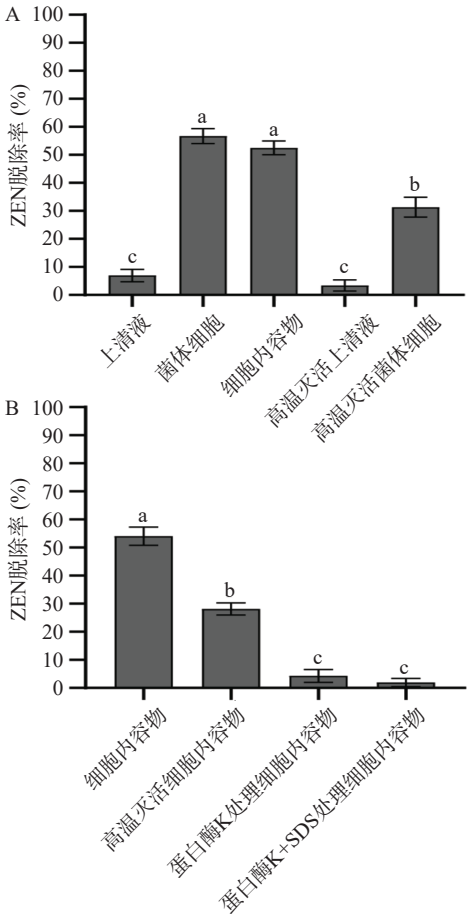


图 3　枯草芽孢杆菌 23830 不同处理方式对 ZEN 的脱除效果

Fig.3　Effects of different treatments of *Bacillus subtilis* strain 23830 on zearalenone removal

注：A：枯草芽孢杆菌 23830 不同组分及处理对 ZEN 脱除率的影响；B：细胞内容物不同处理对 ZEN 脱除率的影响；不同字母表示具有显著差异（P<0.05），图 4、图 6 同。

显著下降（P<0.05）。说明枯草芽孢杆菌 23830 的细胞内容物中存在能降解或转化 ZEN 的活性物质，推测为某种热不稳定的蛋白酶。这项结果与前人研究相似，Xiang 等[24] 利用水浴法和蛋白酶 K 法验证枯草芽孢杆菌 ZENL09 分泌的胞外酶对 ZEN 的降解作用，发现处理组的 ZEN 降解率显著低于未处理组，进而说明 ZEN 的降解是由于酶的作用。

2.3　菌株脱除 ZEN 条件优化

图 4 显示了不同培养条件对枯草芽孢杆菌 23830 脱除 ZEN 的影响。如图 4A 所示，枯草芽孢杆菌 23830 对 ZEN 的脱除率随着发酵时间的延长而提高。在 12 h 基本就可以实现 50.97% 的 ZEN 脱除率，而后随着发酵时间的延长，ZEN 脱除率保持稳定。培养温度通过影响菌株的生存状态，从而影响其对 ZEN 的脱除效果。在 20 ℃ 时，ZEN 脱除率较低（21.51%）。随着温度的升高，在 37 ℃ 时 ZEN 脱除率达到最大为 51.76%，之后随着温度的进一步升高，ZEN 脱除率呈现下降的趋势（图 4B）。如图 4C 所示，枯草芽孢杆菌 23830 在 pH 为 4.0 的环境中完全

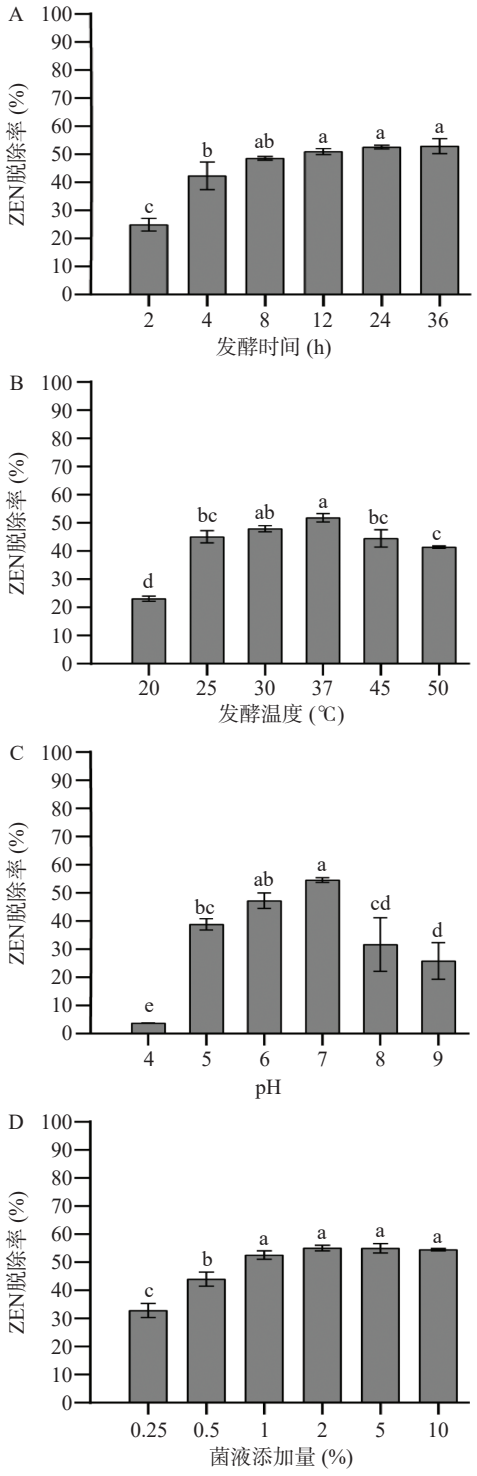


图 4 枯草芽孢杆菌 23830 不同发酵条件对 ZEN 的脱除效果

Fig.4 Effects of different fermentation conditions of *Bacillus subtilis* strain 23830 on zearalenone removal

丧失活性。随着 pH 从 5.0 到 7.0 的升高，枯草芽孢杆菌 23830 对 ZEN 的脱除率逐步提升，并在 pH 为 7.0 时达到最大为 53.03%。此后在偏碱性的培养环境中，枯草芽孢杆菌 23830 对 ZEN 的脱除能力出现显著下降的趋势（P<0.05）。菌株接种量也是影响 ZEN 脱除率的重要因素。如图 4D 所示，枯草芽孢杆菌 23830 的接种浓度在 1%~10% 范围时，对 ZEN 脱除率的影响不显著，说明该体系下菌株浓度已趋于饱和。在菌株接种量为 2% 时，ZEN 脱除率达到最大为 55.07%。考虑到实际应用的可行性和经济性，选择 2% 作为最优接种量。

总体来看，枯草芽孢杆菌 23830 脱除 ZEN 的最佳条件为：菌液添加量 2%（1×10^7 CFU/mL），发酵温度 37 ℃，发酵时间 12 h，pH 为 7.0。在此条件下进行三次平行实验，结果显示 ZEN 的脱除率可达 60.47%±2.18%，具有进一步研究的价值。

2.4 ZEN 转化产物分析

菌株转化 ZEN 前后的 EIC 和质谱图如图 5 所示。图 5b 显示 ZEN 在 6.20 min 出峰，负离子模式下形成了响应值较高的去质子化离子 m/z=317.1384 $[M-H]^-$（图 5e）。同时从 EIC 图可以观察到，ZEN 在阴性对照组中没有检测到，虽然在试验组检测到，但相比于阳性对照组，经过菌株发酵后的试验组 ZEN 分子峰面积显著降低，说明菌株对 ZEN 的转化较为完全。图 5c 为试验组总离子色谱图 317.1384 m/z 处的离子色谱峰，出峰时间为 6.20 min；图 5d 为试验组总离子色谱图 397.1074 m/z 处的离子色谱峰，出峰时间为 5.53 min，但是阴性对照和阳性对照在 397.1074 m/z 处均没有出现离子色谱峰。因此试验组 5.53 min 处为阴性对照和阳性对照的差异峰（图 5d），其 m/z=397.1074$[M-H]^-$（图 5f），与 ZEN 的 m/z 之差为 80。从二级质谱图显示的碎片离子来看（图 5g），m/z=273.1436$[M-H]^-$、m/z=175.0378$[M-H]^-$和 m/z=131.0513$[M-H]^-$分别与 Yang 等[25] 报道的 ZEN 碎片离子 $C_{17}H_{21}O_3^-$、$C_{10}H_7O_3^-$和 $C_9H_7O^-$一致，说明该产物的结构与 ZEN 相关。酚羟基是硫酸盐偶联的良好底物[26]，ZEN 有两个酚羟基分别位于 C-14 和 C-16，但由于内酯基团的影响，C-14 处的酚羟基比 C-16 处的酚羟基更容易与硫酸盐结合，因此推测转化产物主要为已报道的玉米赤霉烯酮-14-硫酸盐（ZEN-14-Sulf，$C_{18}H_{22}O_8S$）[27]。尽管 ZEN-14-Sulf 显示出一定的雌激素活性，但与 ZEN 相比，ZEN-14-Sulf 的 C-14 处酚羟基结合位点被阻断，导致雌激素活性显著降低[28]。另一方面，由于形成的产物亲水性增加，硫酸盐偶联产生的转化产物相较于原物质而言毒性较小[29]。综上所述，该产物是一种由菌株作用所转化产生的低毒性物质，初步判定该菌株对 ZEN 的转化途径较为安全，有投入后续研究及应用的价值。

2.5 ZEN 及转化产物毒性分析

HepG2 细胞是一种人肝癌细胞，是常用来解释 ZEN 具有细胞毒性的细胞系之一[30]。如图 6 所示，总体趋势显示菌株发酵液处理后的转化产物组细胞存活率显著高于 ZEN 处理组（P<0.05）。并且可以看出随着 ZEN 浓度的增加，其细胞存活率下降，ZEN 处理组在 10 μg/mL 时观察到仅有 24.77% 的细胞存活率。而菌株发酵液处理后的 ZEN 转化产物组最低细胞存活率都能达到 72.27%。说明与 ZEN

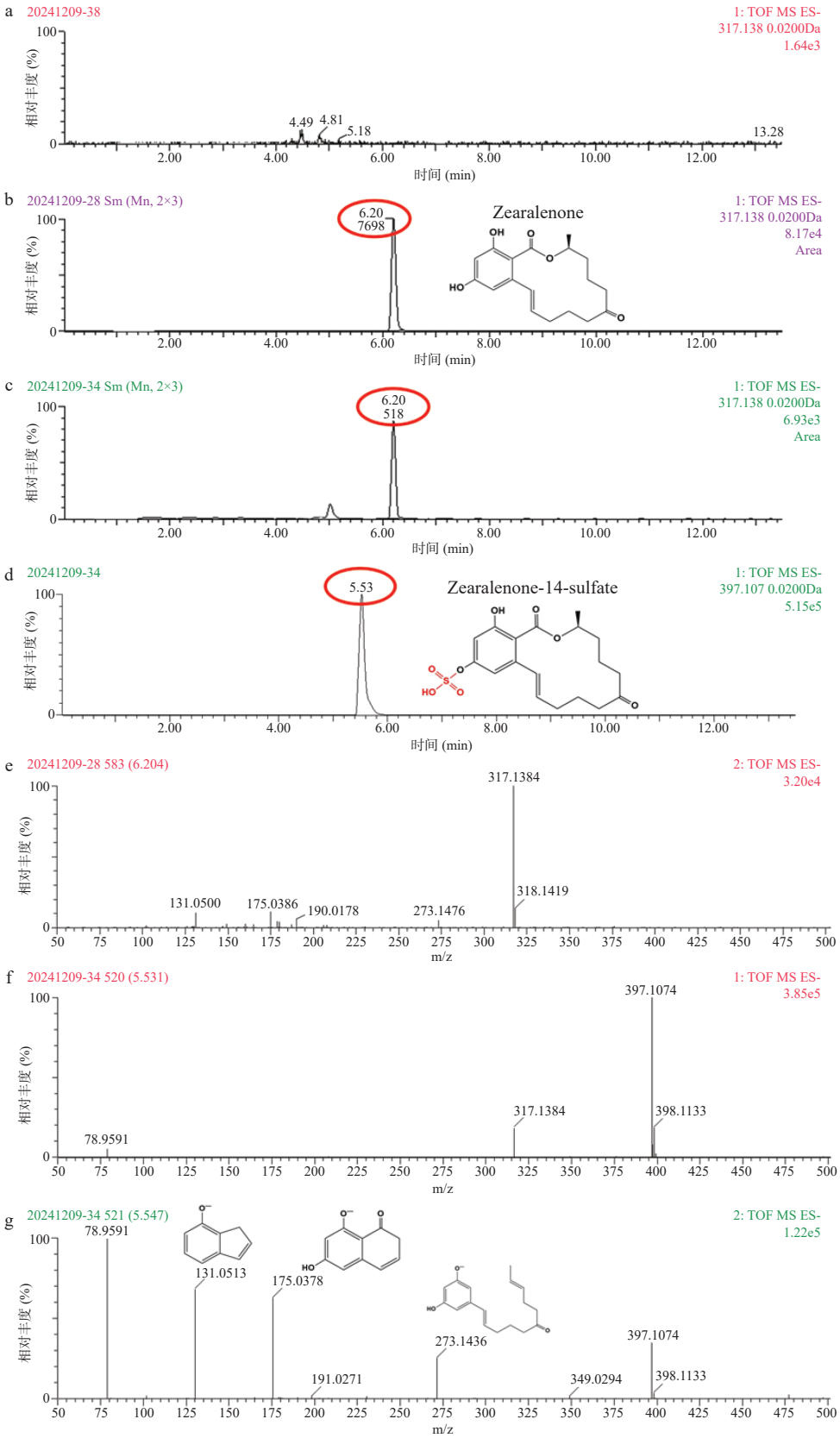


图 5　ZEN 与转化产物的提取离子色谱(EICs)和质谱图

Fig.5　Extraction ion chromatograms (EICs) and mass spectra of ZEN and transformation product

注：a：阴性对照组(发酵液)；b：阳性对照组(LB+10 μg/mL ZEN)；c：试验组(发酵液+10 μg/mL ZEN)；d：转化产物；e：ZEN 质谱图；f：转化产物质谱图；g：转化产物二级质谱图。

相比，转化产物具有较低的体外毒性，进一步验证了 ZEN-14-Sulf 的毒性弱于 ZEN。多项研究表明菌株发酵处理可以有效降低 ZEN 的毒性。Zhou 等[31] 从土壤中分离出的一株枯草芽孢杆菌 YQ-1 显著降低了 ZEN 对 MCF-7 细胞的毒性作用，有效消除了 ZEN 的雌激素毒性。Yang 等[20] 报道的一株枯草芽

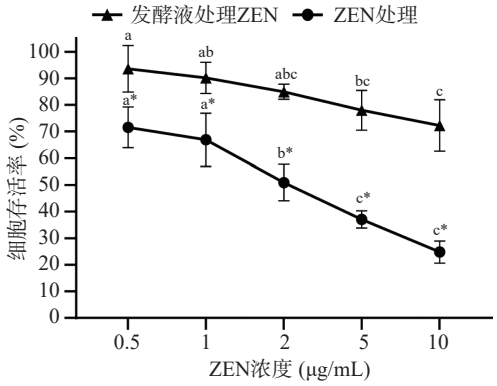


图 6 不同 ZEN 浓度下两种处理方式的细胞存活率

Fig.6 Cell survival rate under two treatment methods at different ZEN concentrations

注：不同字母表示在同一处理下不同浓度组的差异显著（$P<0.05$），*表示同一 ZEN 浓度下与发酵液处理 ZEN 组相比，未添加发酵液的 ZEN 组具有显著差异（$P<0.05$）。

孢杆菌 Y816 可在短时间内有效转化 ZEN 为一种新的偶联物 ZEN-P，并利用全酵母细胞生物传感器证明 ZEN-P 的雌激素毒性被显著降低。Xiang 等[24]使用 HepG2 细胞评估 ZEN 降解产物的细胞毒性，结果显示在不同 ZEN 初始浓度下，降解产物组最高仅有 20% 的细胞毒性。说明 ZEN 经由菌液处理后转化为毒性较小的物质，这与本研究得出的结论一致。因此，本研究的枯草芽孢杆菌 23830 具备实际应用的潜力。

2.6 菌株在玉米加工副产物中的应用评价

玉米副产物中 ZEN 含量如表 2 所示。经过菌株发酵，枯草芽孢杆菌 23830 对玉米浆中 ZEN 的脱除效果最好，脱除率可达 45.44%。这可能是由于玉米浆作为液态发酵基质，更适宜于枯草芽孢杆菌 23830 的有氧生长，从而将菌株对 ZEN 的脱除效果最大化发挥。其次对玉米蛋白粉中 ZEN 的脱除率次高，可达 30.71%。高于 Wu 等[32]报道的枯草芽孢杆菌 ZJ-2019-1 菌株对玉米蛋白粉中 ZEN 的脱除水平（22.01%）。在喷浆玉米皮中可达到 19.22% 的脱除率，在玉米胚芽粕中的脱除率最低，仅有 15.67%。这些试验结果表明，枯草芽孢杆菌 23830 具备在饲料中发酵脱毒的应用潜力。

表 2 不同玉米加工副产物中的 ZEN 脱除率

Table 2 ZEN removal rate in different corn processing by-products

样品名称	ZEN浓度	ZEN脱除率(%)
玉米胚芽粕	1.10 mg/kg	15.67±0.64
喷浆玉米皮	0.82 mg/kg	19.22±2.35
玉米蛋白粉	0.90 mg/kg	30.71±0.79
玉米浆	1.99 μg/mL	45.44±2.73

3 结论

本研究成功筛选出一株可转化 ZEN 的枯草芽孢杆菌 23830，其细胞内容物为转化 ZEN 的主要活性来源。在最优发酵条件（菌株添加量 2%，发酵温度 37 ℃，发酵时间 12 h，pH7.0）下，该菌株对 1 μg/mL ZEN 的脱除率可达 60.47%±2.18%。质谱分析揭示转化产物为 ZEN-14-Sulf，其雌激素活性显著降低，表明转化途径安全。HepG2 细胞实验进一步证实，转化产物细胞毒性显著低于 ZEN，说明发酵过程实现了 ZEN 的减毒。此外，该菌株在玉米加工副产物中亦表现出良好的 ZEN 脱除效果，尤其在玉米浆中脱除率可达 45.44%±2.73%，显示出实际应用脱毒的潜力。未来的研究将聚焦于转化酶及其与转化产物的关系，探讨经过菌株发酵处理的饲料中 ZEN 转化产物在动物体内的稳定性，并分析其对动物健康产生的影响，以期为开发高效且安全的 ZEN 生物解毒制剂提供理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] ROPEJKO K, TWARUZEK M. Zearalenone and its metabolites-general overview, occurrence, and toxicity[J]. Toxins, 2021, 13(1): 35.

[2] LIJALEM Y G, GAB-ALLAH M A, YU H, et al. Occurrence of zearalenone and its major metabolites in cereal flour from Korea[J]. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2023, 40(5): 675−687.

[3] HAO W, LI A P, WANG J Y, et al. Mycotoxin contamination of feeds and raw materials in China in year 2021[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9(1): 929904.

[4] 苏青云, 齐莎日娜, 雷元培, 等. 2022 年中国饲料和原料中霉菌毒素污染调查报告[J]. 饲料工业, 2024, 45(9): 121−125. [SU Q Y, QI S R N, LEI Y P, et al. A survey report on the mycotoxin contamination of Chinese raw materials and feed in 2022[J]. Feed Industry, 2024, 45(9): 121−125.]

[5] KOWALSKA K, HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA D E, PIASTOWSKA-CIESIELSKA A W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 48(6): 141−149.

[6] YANG H Y, WANG G X, LIU J L, et al. Toxic effects of zearalenone and its derivatives α-zearalenol on male reproductive system in mice[J]. Reproductive Toxicology, 2007, 24(3-4): 381−387.

[7] RAI A, DAS M, TRIPATHI A. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(16): 2710−2729.

[8] MARIN D E, PISTOL G C, BULGARU C V, et al. Cytotoxic and inflammatory effects of individual and combined exposure of HepG2 cells to zearalenone and its metabolites[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2019, 392(8): 937−947.

[9] ROGOWSKA A, POMASTOWSKI P, SAGANDYKOVA G, et al. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods[J]. Toxicon, 2019, 162(7): 46−56.

[10] LIU L, XIE M, WEI D. Biological detoxification of mycotoxins: current status and future advances[J]. International Journal of

Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1064.
[11] BEN TAHEUR F, KOUIDHI B, AL QURASHI Y M A, et al. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes[J]. Toxicon, 2019, 160(5): 12−22.
[12] GARI J, ABDELLA R. Degradation of zearalenone by microorganisms and enzymes[J]. Peerj, 2023, 11(1): 15808.
[13] MOLNAR O, SCHATZMAYR G, FUCHS E, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(6): 661−671.
[14] SUN X L, HE X X, XUE K S, et al. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 72(10): 76−82.
[15] TAN H, HU Y C, HE J, et al. Zearalenone degradation by two *Pseudomonas* strains from soil[J]. Mycotoxin Research, 2014, 30(4): 191−196.
[16] CHEN S W, WANG H T, SHIH W Y, et al. Application of zearalenone (ZEN)-detoxifying bacillus in animal feed decontamination through fermentation[J]. Toxins, 2019, 11(6): 330.
[17] CHIOCCHETTI G M, JADÁN-PIEDRA C, MONEDERO V, et al. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(10): 1534−1545.
[18] VEGA M F, DIEGUEZ S N, RICCIO B, et al. Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(4): 715−723.
[19] GUO Y P, ZHOU J C, TANG Y, et al. Characterization and genome analysis of a zearalenone-degrading *Bacillus velezensis* strain ANSB01E[J]. Current Microbiology, 2020, 77(2): 273−278.
[20] YANG S B, ZHENG H C, XU J Y, et al. 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.
[21] XU H W, WANG L Z, SUN J D, et al. Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(18): 4951−4969.
[22] YANG Y, ZHONG W T, WANG Y N, et al. Isolation, identification, degradation mechanism and exploration of active enzymes in the ochratoxin A degrading strain *Acinetobacter pittii* AP19[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 465(5): 133351.
[23] 张晨曦, FOLLY Y M E, 赵月菊, 等. 解淀粉芽孢杆菌 NS2 降解玉米赤霉烯酮的研究[J]. 核农学报, 2020, 34(7): 1507−1517. [ZHANG C X, FOLLY Y M E, ZHAO Y J, et al. Degradation effects of *Bacillus amyloliquefaciens* NS2 on zearalenone[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(7): 1507−1517.]
[24] XIANG M X, LIU P, ZHANG H, et al. *In vitro* degradation of zearalenone by culture supernatant of *Bacillus subtilis*[J]. Food and Bioprocess Technology, 2024, 17(8): 2206−2215.
[25] YANG S P, ZHANG H Y, SUN F F, et al. Metabolic profile of zearalenone in liver microsomes from different species and its *in vivo* metabolism in rats and chickens using ultra high-pressure liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(51): 11292−11303.
[26] ELSHARKAWY S H, SELIM M I, AFIFI M S, et al. Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 549−552.
[27] DIANE B, SANDRA C, BRUCE C, et al. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed[J]. EFSA Journal, 2014, 12(12): 3916.
[28] DRZYMALA S S, BINDER J, BRODEHL A, et al. Estrogenicity of novel phase I and phase II metabolites of zearalenone and cis-zearalenone[J]. Toxicon, 2015, 105(20): 10−12.
[29] FAISAL Z, FLISZáR-NYúL E, DELLAFIORA L, et al. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 310(7): 113236.
[30] CALADO T, ABRUNHOSA L, VERDE S C, et al. Effect of gamma-radiation on zearalenone-degradation, cytotoxicity and estrogenicity[J]. Foods, 2020, 9(11): 1687.
[31] ZHOU Y Q, YANG J G, YU Y S, et al. A novel glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* achieves zearalenone detoxification by diglycosylation modification[J]. Food & Function, 2024, 15(11): 6042−6053.
[32] WU J W, WANG Z L, AN W, et al. *Bacillus subtilis* simultaneously detoxified aflatoxin B_1 and zearalenone[J]. Applied Sciences-Basel, 2024, 14(4): 1589.