DOI:10.12441/spyswjs.20231122001 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0161-12

国产大麦代谢真菌毒素菌株的分离及体外抑制研究

邱 然 钟俊辉 常晓敏 肖 琳 白艳龙 余腾斐*

(华润雪花啤酒(中国)有限公司,北京 100005)

摘要:【目的】评估镰刀菌(*Fusarium* spp.)对大麦制麦过程及麦芽品质的影响,筛选具有抑制镰刀菌活性的微生物并探究其降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,DON)的潜力。【方法】以国产单二大麦为研究对象,从受镰刀菌感染的大麦中分离出产毒菌株,开展病原菌与宿主的相互作用研究,比较感染 5 d 的大麦与标准大麦的发芽率、水敏性及 DON 质量分数等指标,分析感染大麦制麦后产生的麦芽的 DON 质量分数和蛋白酶、β-葡聚糖酶、淀粉酶的酶活力以及理化指标(游离氨基酸、可溶性总氮、β-葡聚糖质量浓度)。从大麦和麦芽中筛选具有抑制产毒菌株活性的微生物,研究该微生物培养物上清液冻干粉(cell-free supernatant powder,cfsP)对产毒菌株生长发育的影响,测试不同质量分数(0.020~0.100 μg/kg)cfsP 的抑菌效果及抑菌机理。在浸麦阶段接种该抑菌微生物,评估其对麦芽 DON 质量分数及加工性能的调控作用。【结果】经鉴定,产毒菌株为大刀镰刀菌(*Fusarium culmorum*,*F. culmorum*)。利用该菌株感染 5 d 后大麦的发芽率下降了 45.8%,水敏性明显提高,DON 积累量达到 276 μg/kg。制麦后,感染麦芽的 DON 质量分数比对照组增加了近 6 倍,淀粉酶的酶活力降低,总蛋白酶和β-葡聚糖酶的酶活力提高,游离氨基和可溶性总氮水平增加,β-葡聚糖质量浓度减少。筛选出一株抑制大刀镰刀菌的植物乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum*,*L. plantarum*)NM-6,当 cfsP 质量分数≥0.020 μg/kg 时,可改变大刀镰刀菌的菌丝形态;当 cfsP 质量分数≥0.050 μg/kg 时,可抑制大分生孢子萌发管的生长;当 cfsP 质量分数为 0.100 μg/kg 时,可完全阻断菌体生长,且其在低 pH 条件下的抑菌活性更强。浸麦阶段接种 2×10^7 CFU/g 植物乳植杆菌 NM-6 时,麦芽 DON 质量分数约为对照麦芽的 50%,同时麦芽过滤性和溶解性能得到显著改善。【结论】感染单二大麦的镰刀菌鉴定为大刀镰刀菌,具有抑制大刀镰刀菌活性的微生物鉴定为植物乳植杆菌 NM-6。大刀镰刀菌感染导致大麦发芽能力下降和 DON 毒素积累;植物乳植杆菌 NM-6 通过分泌耐酸活性物质可高效抑制大刀镰刀菌的孢子萌发和菌丝生长,其应用于制麦工艺可同步实现毒素控制和品质提升,为真菌感染大麦的安全应用提供生物防治策略。

关键词:大麦;麦芽;微生物群落;过滤性能;真菌毒素

Isolation and *in Vitro* Inhibition of Mycotoxin-metabolizing Strains from Domestic Barley

*QIU Ran ZHONG Junhui CHANG Xiaomin XIAO Lin BAI Yanlong YU Tengfei**

(China Resources Snow Breweries Co., Ltd., Beijing 100005, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to assess the effects of *Fusarium* on the malting process and malt quality of barley, screen out the microorganism with inhibitory activity against Fusarium, and explore the potential of this microorganism for degrading deoxynivalenol (DON). [**Method**] The mycotoxin-producing strain was isolated from domestic Dan'er barley contaminated with pathogenic fungi, and the interaction between the pathogen and the host was studied. The germination rate, water sensitivity, and DON mass fraction were compared between the barley infected for 5 d and standard barley. The DON mass fraction, activities of protease, β-glucanase, and

通信作者:余腾斐(1984—),女,博士,高级工程师,主要从事食品工程研究。E-mail:yutengfei5@crb.cn

收稿日期:2023-11-22 **修回日期:**2024-03-22

amylase, and physicochemical indicators (free amino acids, soluble nitrogen, and β-glucan mass concentration) of malt produced from infected barley were measured. The microorganism capable of inhibiting the viability of the mycotoxin-producing strain was screened from barley and malt. The effects of the freeze-dried cell-free supernatant powder (cfsP) of the microorganism on the growth and development of the mycotoxin-producing strain were studied, and the antifungal effects and mechanisms of cfsP at different mass fractions (0.020~0.100 μg/kg) were tested. During the steeping stage, the antifungal strain was inoculated and its regulatory effects on the DON mass concentration and the processing performance of malt were evaluated. [**Result**] The mycotoxin-producing strain was identified as *Fusarium culmorum* (*F. culmorum*). After being infected with this strain for 5 d, the barley showed a germination rate decrease of 45.8%, significantly increased water sensitivity, and the DON accumulation reaching 276 μg/kg. Compared with the control group, the malt produced from infected barley showed an increase of 6 times in DON mass fraction, a decreased activity of amylase, increased activities of total protease and β-glucanase, increased levels of free amino acids and soluble nitrogen, and a reduced mass concentration of β-glucan. *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) NM-6 capable of inhibiting *F. culmorum* was screened out. The *L. plantarum* NM-6 cfsP with a mass concentration ⩾ 0.020 μg/kg changed the mycelial morphology of *F. culmorum*, and the cfsP with a mass concentration ⩾ 0.050 μg/kg inhibited the growth of the germination tube of conidia. The cfsP with a mass concentration of 0.100 μg/kg completely blocked the growth of the strain, and its antifungal activity was stronger at low pH conditions. When 2×10^7 CFU/g of *L. plantarum* NM-6 was inoculated into barley during the steeping stage, the DON mass fraction in the malt was approximately 50% of that of the control malt, and the filtration and solubility properties of the malt were significantly improved. [**Conclusion**] The *Fusarium* species infecting Dan'er barley was identified as *F. culmorum* and the microorganism with inhibitory activity against *F. culmorum* was identified as *L. plantarum* NM-6. The infection of *F. culmorum* led to a decrease in the germination ability and accumulation of DON in barley. *L. plantarum* NM-6 can efficiently inhibit the spore germination and mycelial growth of *F. culmorum* by secreting acid-tolerant active substances. Its application in the malting process can simultaneously achieve toxin control and quality improvement, providing a biocontrol strategy for the safe application of barley exposed to fungal infections.

Keywords: barley; malt; microbial community; filtration properties; mycotoxin

镰刀菌是一种重要的植物病原菌，种类繁多、分布较广，普遍存在于土壤及动植物有机体中[1-2]。镰刀菌易侵染多种粮食和经济作物，引起根腐、茎腐、穗（粒）腐等多种病害，造成作物产量减少，给农作物生产带来严重破坏。镰刀菌毒素主要由大刀镰刀菌、禾谷镰刀菌（*Fusarium raminearum*）、轮枝镰刀菌（*Fusarium verticillioides*）等产生[3]。在大麦种植和啤酒生产行业，镰刀菌是引起大麦赤霉病[4-5]和啤酒喷涌[6]的重要真菌。在世界各地的作物中，镰刀菌的污染概率都较高[7]，在大麦、麦芽和啤酒中，通常都能检测到镰刀菌毒素[8-9]。

利用化学试剂（如NaClO等）可以分解某些真菌毒素，但化学试剂残留会带来新的危害。乳酸菌及其代谢产物因安全性在制麦方面的应用备受关注[10-11]。已有文献报道，由乳酸菌代谢得到的低相对分子质量化合物（如有机酸）具有抑制真菌或孢子生长的能力，这些化合物可通过自身或者协同其他物质共同发挥作用[12]。目前国内外研究表明，乳杆菌在抑制真菌这一方面的表现尤为突出，但乳酸菌抑制真菌的效果差异很大，主要与所采用的菌株有关[13]。

一般来说，DON是大麦中最常见的镰刀菌毒素[14]，例如在2020年收获的江苏单二大麦中，部分批次霉粒指标较高，且在成品麦芽中检测到了DON。该研究在含真菌毒素的麦芽原料中筛选并鉴定产毒菌株，分析其在制麦过程中的动态变化，检测在制麦过程中真菌生长与产生真菌毒素的相关性，验证分离菌株的产毒性能，并分析镰刀菌对麦芽质量的影响。最后，通过从麦类作物上分离具有抑制产毒真菌活性的乳酸菌，研究其抑菌机理，并在制麦过程中接种该乳酸菌，验证其对镰刀菌污染的抑制作用。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

大麦样品：用于分析真菌毒素的试验材料，2020年收获的某批次江苏单二大麦，DON质量分数为586 μg/kg，其他真菌毒素（雪腐镰刀菌烯醇（NIV）、赭曲霉毒素A（OTA）、玉米赤霉烯酮（ZEA）和伏马毒素B1（FB1））均未检出；用于感染产毒真菌的试验材料：2020年收获的某批次江苏单二啤酒大麦，DON、NIV、OTA、ZEA和FB1均未检出。用于筛选抑制真菌活性的试验材料：国产东北大麦‘垦啤8号’和‘垦啤9号’，国产苏北大麦‘KA-4B’和单二，国产西北大麦‘甘啤4号’以及内蒙古呼伦贝尔小麦，以上谷物原料及制成的麦芽均由中粮麦芽（大连）有限公司提供。

高盐察氏培养基、MRS培养基、PDA培养基、SNB培养基、MEB培养基、CAC培养基、MSA培养基（包含20 g/L麦汁、8 g/L琼脂、质量分数7.5% NaCl）：青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

PCR制备试剂盒：罗氏制药中国有限公司；Qubit dsDNA BR试剂盒：美国Thermo Fisher Scientific公司；柱式细菌基因组DNA提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；*D*-乳酸、*L*-乳酸、乙酸快速检测试剂盒、*α*-淀粉酶试剂盒、*β*-葡聚糖酶试剂盒、木聚糖底物：爱尔兰Megazyme公司；Triton-X100、乙二胺四乙酸（EDTA）、氨基甲烷（Tris）、500 mmol/L盐酸胍：美国Sigma公司。

1.2　仪器与设备

高效液相色谱仪：Agilent Technologies 1200 series型，美国安捷伦科技有限公司；Athena C18液相色谱柱（4.6 mm×250 mm×5 μm）：上海安谱实验科技股份有限公司；荧光计：Invitrogen Qubit® 2.0型，美国Thermo Fisher Scientific公司；分光光度计：NanoDrop 2000型，美国Thermo Fisher Scientific公司；酶标仪：Bio Rad型，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；微型制麦设备：澳大利亚Joe White公司；粉碎机：DLFU-W23050型，瑞士BUHILER公司；糖化仪：LB12型，德国LOCHNER公司；pH计：Delta320型，上海梅特勒-托利多公司；恒温恒湿培养箱：Forma型，美国Thermo Fisher Scientific公司；电热干燥箱：T6060型，德国HERAEUS公司。

1.3　方法

1.3.1　大麦携带产毒菌株的筛选和鉴定

镰刀菌的筛选：随机挑选100粒完整大麦，用体积分数0.1% NaClO溶液浸泡搅拌1 min，用无菌水反复清洗3次，在含有异菌脲和氯双脲的选择性高盐察氏培养基中25 ℃培养7 d。将生长出来的镰刀菌反复划线接种至PDA培养基上进行纯化，然后将纯化后的菌株接种在PDA斜面培养基上，于4 ℃保藏。

曲霉和青霉的筛选：随机挑选100粒完整大麦，用体积分数0.1% NaClO溶液浸泡搅拌1 min，用质量分数7.5% NaCl溶液反复清洗2次。取25粒处理大麦试样4份，分别放入4个MSA培养皿中，25 ℃培养7 d。将生长出来的曲霉或青霉菌株反复划线接种至PDA培养基上进行纯化，然后将纯化后的菌株接种在PDA斜面培养基上，于4 ℃保藏。

将筛选出的菌株接种到PDA平板上，于25 ℃培养并观察菌落特征。参照《真菌鉴定手册》对菌株进行形态学鉴定。用CTAB方法提取真菌基因组DNA。反应产物纯化后菌株ITS序列测序和比对由宝生物工程（大连）有限公司完成。大麦表面杀菌方法参照Lowe等[15]的方法。

1.3.2　大麦、麦芽检测方法及酶活力分析方法

用Analytica-EBC推荐的方法分析大麦和麦芽样品。使用试剂盒测定*α*-淀粉酶、*β*-淀粉酶、*β*-葡聚糖酶的酶活力，其中微生物来源的*β*-葡聚糖酶的酶活力是在60 ℃下检测得到的。根据Brijs等[14]的方法测定蛋白酶的酶活力。

1.3.3　孢子悬浮液的培养、制备和接种

参照Mauch等[16]的方法制备孢子悬浮液，获取1×10^5 CFU/mL的孢子悬浮液。将产毒菌株接种在PDA平板上，28 ℃培养4 d，于4 ℃储存待用。取出含有镰刀菌的培养物转移至500 mL的SNB培养基中。于25 ℃、120 r/min条件下培养7 d，诱导产生大分生孢子。10倍梯度稀释法将孢子悬浮液浓度调整为1×10^3、1×10^5、1×10^7 CFU/mL，涂布于PDA平板上，28 ℃培养，观察菌丝生长情况。

消毒大麦中接种体积分数2%的真菌分生孢子悬液，在恒温（25 ℃）恒湿（相对湿度98%）培养箱中培养5 d，每8 h翻麦一次。分析接种大麦的水分并准备制麦。未感染大麦不接种，其余相同处理作为对照组。

1.3.4 微型制麦试验方法

将 1 kg（干质量）接种大麦与 4 kg（干质量）对照大麦均匀混合成感染大麦，参照相关工艺流程进行制麦。浸麦：18 ℃，湿浸 5 h、干浸 12 h、干浸 6 h；发芽：18 ℃，发芽 5 d，样品箱自动旋转通风，每隔 10 min 旋转 1 min；焙焦：45 ℃保持 3 h，程序升温 1 h 至 55 ℃，55 ℃保持 3 h，程序升温 1 h 至 65 ℃，65 ℃保持 3 h，程序升温 1 h 至 70 ℃，70 ℃保持 1 h，程序升温 1 h 至 75 ℃，75 ℃保持 1 h，程序升温 1 h 至 85 ℃，85 ℃保持 3 h。

1.3.5 真菌生长情况的测定

分别在第一次干浸、第二次湿浸、第二次干浸、发芽阶段每间隔 24 h 取样，以及在焙焦阶段 55 ℃后取样，使用 PCR 仪和分光光度计测定 DNA 质量浓度[17]，以此反映真菌生长情况。基因组 DNA 提取：取 20 g 新鲜麦粒于冰上研磨，转入装有 55 mL 超纯水和 25 mL 裂解缓冲液的无菌烧杯中搅拌 15 min。裂解液配制：20 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris、体积分数 1% Triton-X100、500 mmol/L 盐酸胍、250 mmol/L NaCl 溶解于 1 L 超纯水。室温超声处理 1 min，静置 15 min，用移液管吸取 1.2 mL 上清液转入 2 mL 灭菌离心管中，8 000 *g* 离心 1 min。用 PCR 制备试剂盒进行真菌基因组 DNA 分离，将基因组 DNA 涡旋混合，置于冰上并用于 PCR 反应。PCR 反应条件：按照说明书要求，将 2 μL 基因组 DNA 加到 48 μL 的反应液中。特异性引物为 OPT 18R（5′-GATGCCAGACGCACTAAGAT-3′）和 OPT 18F（5′-GATGCCAGACCAAGACGAAG-3′）。94 ℃预变性 4 min；39 次循环：94 ℃、20 s，63 ℃、20 s，72 ℃、30 s；72 ℃延伸 5 min。使用荧光计与 Qubit dsDNA BR 柱式试剂盒对 PCR 产物进行定量。按照说明书制备样品，22 ℃反应 2 min 后读数。通过真菌 DNA 的 S 型曲线验证 PCR 的线性范围（10~26 μg/mL）。

1.3.6 DON 的液相色谱分析

参照金昭等[18]的方法检测 DON 质量分数，取 25 g 大麦或麦芽细粉，加入 100 mL 体积分数 75% 的乙腈-水溶液，搅拌提取 3 h（样品加标提取 1 h），中速滤纸过滤。取 2 mL 滤液过 PuraToxSR DON 专用净化柱，氮气吹干，复溶于 200 μL 水-甲醇-乙腈溶液（体积比 90∶6∶4）。过 ODS 色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm），流动相为水-甲醇-乙腈溶液（体积比 90∶6∶4），流量 1.0 mL/min，柱温 25 ℃，进样量 20 μL，检测波长 220 nm，检出限 30 μg/kg，回收率 90%。

1.3.7 乳酸菌的分离、纯化及鉴定

玻璃试管内装满样品，密封后恒温（30 ℃）富集 8 d，称试管中部材料 10 g，加入 40 mL 无菌水混匀，用 10 倍梯度稀释法进行稀释。取不同浓度的菌悬液分别涂布于含溴甲酚紫的 MRS 固体培养基上，30 ℃兼性厌氧培养 2 d，挑取乳酸菌进行分离纯化。

参照试剂盒的说明书，提取具有强抑制真菌活性的菌体总 DNA。以细菌通用引物 27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）和 1509R（5′-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′）扩增 16S rDNA。将所得长度前 900 bp 的基因片段上传至 GenBank 数据库，使用 BLAST 搜索，同源性大于 98% 的序列菌株即为同一菌株。扩增及测序由宝生物工程（大连）有限公司进行。

1.3.8 抑菌试验

挑取待检测的单菌落，在 MRS 固体平板培养基上划线，培养 24~36 h 至长出菌斑后，保留待用。将 100 μL 孢子悬浮液与 5 mL 经融化后保持在 45 ℃的 PDA 上层培养基混匀，立即倒至上述划线平板上。微氧条件下 30 ℃培养 3 d，再转移至有氧条件 25 ℃培养 2 d 来促进真菌生长。测量细菌菌落周围透明圈的大小来确定每个菌株的抑制真菌活性。

1.3.9 乳酸菌 cfsP 的制备

将抑菌能力最强和无抑菌作用的乳酸菌分别接种到 500 mL 新鲜的 MRS 液体培养基中，室温静置 24 h 后，30 ℃培养 144 h。3 000 *g* 离心 15 min，用酸度计测量 pH，然后将乳酸菌上清液冷冻喷雾干燥，获得乳酸菌 cfsP 备用。

1.3.10 乳酸菌上清液中 *D*-乳酸、*L*-乳酸和乙酸水平的测定

将乳酸菌 cfsP 加到去离子水中至终质量分数为 25%，根据说明书，用 *D*-乳酸、*L*-乳酸、乙酸试剂盒进行测定。

1.3.11 乳酸菌上清液对真菌的生长抑制

使用微孔板法研究不同浓度乳酸菌上清液对真菌的影响。使用 30 μm 孔径的滤纸过滤孢子悬浮液，调整孢子悬浮液浓度为 1.0×10^5 CFU/mL，各

取1 mL，于4 ℃、3 000 *g*离心10 min，弃去上清液。MEB培养液中加入等体积的*D*-乳酸、*L*-乳酸混合溶液，用4 mol/L NaOH将pH调至4.0，用0.45 μm滤膜过滤。用1 mL MEB培养液再次悬浮孢子沉淀，将分生孢子质量分数调整为0、0.010、0.025、0.050、0.075、0.100 μg/kg。向96孔酶标板中加入200 μL培养液，25 ℃培养48 h，将酶标仪设定为每4 s振动1 s，每3 h自动记录OD_{620}值，形成真菌生长曲线，平行测定3次。

1.3.12　大分生孢子萌发试验

制备具有抑制镰刀菌的乳酸菌cfsP，配制含有强抑菌活性和无抑菌活性乳酸菌上清液的MEB培养液，质量分数分别为0、0.05、0.10 μg/kg，各配制20 mL，将pH调节至4.0。将乙酸作为对照添加到MEB培养液中，将pH调节至4.0。溶液经0.45 μm滤膜过滤。将20 mL孢子悬浮液于4 ℃、3 000 *g*离心10 min后，孢子沉淀再次悬浮在含有乳酸菌上清液的MEB培养液中，于350 r/min、25 ℃下培养。每隔3 h于4 000 *g*离心3 min。弃去上清液后，孢子沉淀再次悬浮在100 μL体积分数50%的甘油中。转移5 μL到显微镜载玻片上，使用显微镜在400倍下分析100个随机选择的大分生孢子，测定形成芽管的大分生孢子数量，计算出芽率（以百分数计），平行测定3次。

1.3.13　菌丝生长期间的形态学观察

用去离子水溶解cfsP，经0.45 μm滤膜过滤，制备质量浓度为50 g/dL的工作液。配制含有0、0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 g/dL工作液的PDA平板，用含有*D*-乳酸、*L*-乳酸的混合溶液和乙酸制备化学酸化对照CAC平板，接种大约100个大分生孢子在平板的中心点。在25 ℃培养72 h，通过照相扫描平板来监控真菌生长情况，试验重复3次。

1.3.14　pH、蛋白酶和热处理对抑制真菌化合物活性的影响

等分含有质量分数10%的抑菌/非抑菌活性物质的20 mL MEB培养液，用*D*-乳酸、*L*-乳酸混合溶液将pH调节至4.0、5.0、6.5。接种真菌到MEB培养液中，并测定大分生孢子萌发率，平行测定3次。

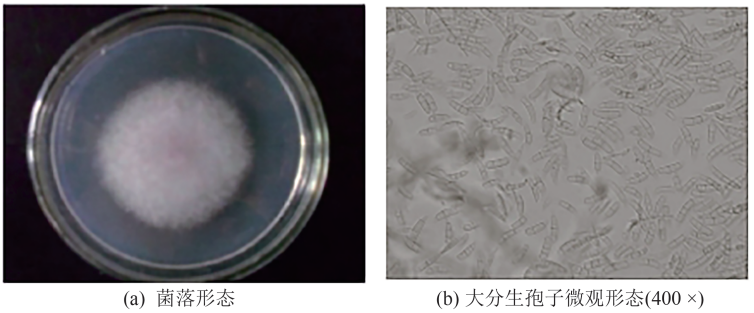
用链霉蛋白酶E和蛋白酶K水解抑菌活性上清液。根据说明书制备酶液，不加SDS和Triton X-100。向酶液中加入有抑菌活性的cfsP，配制成质量分数25%的溶液。用4 mol/L的NaOH将pH调节至7.5，并用0.45 μm滤膜过滤，于37 ℃培养1~5 h，冷却至20 ℃后终止反应。用MEB培养液将cfsP溶液的质量分数调节至10%，并使用*D*-乳酸、*L*-乳酸混合溶液将pH调节至4.0。将2 mg的cfsP溶解到8 mL去离子水中，分别在80、90、100 ℃条件下加热1 h，将cfsP溶液稀释到质量分数为10%。

2　结果与讨论

2.1　真菌的筛选及鉴定

在含有异菌脲和氯双脲的选择性高盐察氏培养基上共筛选感染镰刀菌大麦26粒，经反复转接、培养和纯化，所有污染菌株均为同一种镰刀菌，其形态特征见图1。PDA平板上菌落呈圆形，正面呈白色至淡粉红色，中间凸起，背面中央呈淡红色，气生菌丝浓密。25 ℃培养5 d后，直径约7 cm，菌丝光滑、有隔、分枝，大分生孢子呈镰刀状。

测序得到一条536 bp的序列，提交到GenBank数据库进行比对，与大刀镰刀菌的相似度为99%，登录号为JX125045，在MSA培养基上未分离到青霉属和曲霉属，因此可以判定大刀镰刀菌是导致该批次麦芽中产生真菌毒素的微生物。



(a) 菌落形态　　(b) 大分生孢子微观形态(400 ×)

图1　菌落形态及大分生孢子的微观形态

Fig. 1　Colony morphology and microscopic morphology of macroconidia

2.2 制麦过程中真菌的生长与产毒

2.2.1 大麦的理化指标分析

如表1所示，除了DON质量分数，对照大麦与标准大麦的各项理化指标差距不大。对照大麦DON质量分数为586 μg/kg，而在标准大麦中未检出DON。在接种大刀镰刀菌前后，大麦水分质量分数从13.56%增加到26.85%，增加约1倍；种子发芽率受霉菌感染影响较大，从83.0%降至45.0%，降低了45.8%；发芽率也是相同的下降趋势。这个结果与Schwarz等[19]利用禾谷镰刀菌*F. graminearum* KB-172感染田间大麦的研究结果一致，在温室中接种真菌孢子的大麦发芽率降低了42%。发芽力的降低与大麦水敏性呈负相关，其中感染大麦的水敏性增加到38.3%，增加了约2倍。感染大麦的*β*-葡聚糖质量浓度从286 mg/L降到236 mg/L，这可能是因为大刀镰刀菌会分泌*β*-葡聚糖酶[20]。研究发现，人工感染禾谷镰刀菌和梨孢镰刀菌后，谷粒细胞壁上可以检测到有外切葡聚糖酶的产生和活性[21]。接种孢子悬浮液5 d后，感染大麦的DON质量分数为276 μg/kg。

表1 大刀镰刀菌感染大麦与标准大麦理化指标对比

Table 1 Physicochemical indicators of barley infected with *F. culmorum* and standard barley

样品	水分质量分数/%	蛋白质质量分数/%	千粒质量/g	发芽力/%	发芽率/%	水敏性/%	*β*-葡聚糖质量浓度/(mg/L)	DON质量分数/(μg/kg)
对照大麦	13.89±0.11	12.30±0.22	41.5±0.3	88.0±2.0	87.0±0.5	15.5±1.5	269±18	586
标准大麦	13.56±0.08	11.80±0.22	40.8±0.5	84.0±1.0	83.0±1.5	12.5±1.5	286±18	0
感染大麦	26.85±0.14	11.90±0.04	40.6±0.8	48.0±2.0	45.0±1.0	38.3±3.0	236±12	276
Δ/%	98.0	0.8	−0.5	−42.9	−45.8	206.4	−17.5	—

注：“—”表示未检测到；“Δ”表示感染大麦与标准大麦的差值百分率。

2.2.2 制麦过程真菌生长情况与DON质量分数变化

大刀镰刀菌可以感染大麦穗，在田间暴露24 h至60 h[22]，在体外培养5~6 h后产生多细胞分生孢子[23]。尽管大刀镰刀菌是田间真菌，但它可以在收获后于适宜条件（25 ℃，相对湿度100%）下增殖[22]。已知大刀镰刀菌主要产生B型单端孢霉烯，例如DON及其衍生物和NIV等[22]。真菌毒素是在环境胁迫条件下产生的微生物次级代谢产物[23-24]，麦芽中真菌毒素的水平取决于镰刀菌的感染模式和加工工艺[25]。

在制麦过程中，种子会经历一系列生理变化。浸麦的开始中断了植物的休眠期，谷物吸收水分至约46%。发芽阶段，谷物分泌大量水解酶，导致蛋白质和细胞壁的降解，以及淀粉质胚乳的水解。最后绿麦芽经过高温焙焦，导致水解酶失活，并蒸发掉了麦粒水分，阻止麦芽过度溶解，同时发生美拉德反应，赋予了麦芽特殊的颜色和香味。因为用于制麦的大麦颗粒可能感染少量镰刀菌，所以制麦过程中大麦水分质量分数的增加不仅促进了植物代谢，而且激活了休眠的微生物[26]，这些微生物将在制麦过程中进一步感染谷物。

通过检测真菌DNA质量浓度和DON质量分数来评估制麦过程中大刀镰刀菌生长和产毒情况，结果见图2。感染大麦中大刀镰刀菌的起始DNA质量浓度为9.56 μg/mL，起始DON质量分数为55 μg/kg。制麦过程中大刀镰刀菌DNA质量浓度和DON质量分数都随着制麦时间的延长呈逐渐增加趋势。至焙焦结束，大刀镰刀菌DNA质量浓度达到31.43 μg/mL；DON质量分数为376 μg/kg，增加了近6倍。

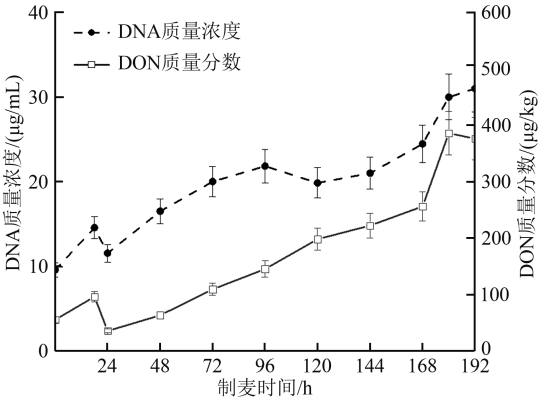


图2 制麦过程中大刀镰刀菌的DNA浓度和DON质量分数

Fig. 2 DNA concentration and DON mass fraction of *F. culmorum* during the malting process

分离出的大刀镰刀菌的产毒特性见图3。感染大麦中大刀镰刀菌起始DNA质量浓度为5.62 μg/mL，起始DON质量分数为586 μg/kg。感染大麦DON质量分数较高，但随着浸麦结束，其

质量分数明显降低，第二次浸麦结束时DON质量分数为52 μg/kg，这可能是因为DON具有水溶性[27]。发芽过程中DON质量分数逐渐增加。55 ℃排潮结束后，DON质量分数快速增加，至焙焦结束，DON质量分数略有降低。成品麦芽中DON质量分数比原料大麦降低了37%。在焙焦阶段，温度快速升高不利于真菌的生长，导致真菌发生应激反应并快速代谢真菌毒素。因为DON在80 ℃下具有热稳定性，所以在制麦最终阶段达到最高水平。镰刀菌在温度为55 ℃的烘干阶段可存活[27]，且在热压力下可产生过量的DON。另外，Vegi等[28]研究了人工接种和自然感染大麦籽粒中禾谷镰刀菌*Tri5*基因与产生DON的相关性，结果表明，DON的产生和镰刀菌的生长情况（*Tri5*浓度）的相关性取决于感染模式。

2.2.3　大刀镰刀菌感染对成品麦芽品质的影响

大刀镰刀菌感染大麦和标准大麦制麦后产生的感染麦芽和标准麦芽的理化指标见表2。其中*β*-葡聚糖质量浓度、色度、可溶性总氮质量分数、库值、脆度与麦芽溶解度有关，大刀镰刀菌感染能明显增强麦芽的溶解度。虽然感染麦芽溶解程度较好，但是并没有提高过滤性能，也没有减少麦汁黏度，与通过抑制细菌处理以提高麦汁过滤速度的结果不一致[29]，这可能是因为接种大刀镰刀菌孢子悬浮液浓度较高，菌体快速生长导致菌丝体阻塞了过滤膜，影响了过滤效果。

虽然感染麦芽的未发芽麦粒数比对照组的多，但感染麦芽的溶解度却优于对照麦芽，这是因为大刀镰刀菌能代谢产生蛋白酶和*β*-葡聚糖酶。如表3所示，感染麦芽的总蛋白酶酶活力增加，说明游离氨基酸和可溶性总氮的水平较高。由于在接种和发芽期间的真菌感染，菌丝体覆盖谷物导致氧气减少，胚芽损伤严重，这也是发芽率降低的一个主要原因。镰刀菌引起的颗粒结构破坏抑制了大麦激素信号的传导，阻止了*α*-淀粉酶的合成[30]。然而，也有研究报道在浸麦过程中，接种镰刀菌导致*α*-淀粉酶活性增加[31]。感染麦芽累积了348 μg/kg的DON，这也是淀粉酶酶活力降低的原因，真菌毒素能抑制淀粉酶的合成[32]。除了产生真菌毒素外，与对照麦芽相比，感染麦芽损失增加了12.8%，这是真菌对麦芽品质破坏性的体现。

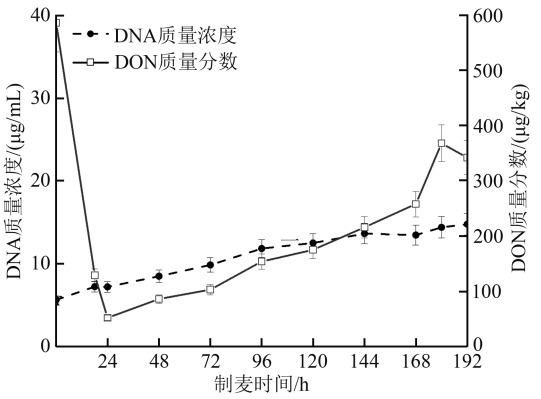


图3　感染大麦制麦过程中大刀镰刀菌的DNA质量浓度和DON质量分数

Fig. 3　DNA concentration and DON mass fraction of *F. culmorum* during the malting process of infected barley

表2　感染麦芽与标准麦芽的理化指标

Table 2　Physicochemical indicators of standard malt and infected malt

样品	水分质量分数/%	蛋白质质量分数/%	*β*-葡聚糖质量浓度/mg/L	千粒质量/g	浸出物质量分数/%	糖化力/WK	pH	过滤时间/min	色度/EBC
标准麦芽	4.50±0.05	11.9±0.1	256±7	34.6±0.1	78.3±0.5	387±12	5.92±0.01	56	4.75±0.13
感染麦芽	4.60±0.11	12.4±0.2	198±5	34.9±0.5	78.7±0.3	354±9	5.82±0.01	58	7.00±0.25
Δ/%	2.2	4.2	−22.6	0.8	0.9	−8.5	−2.6	3.6	47.3

样品	黏度/（mPa·s）	可溶性总氮质量分数/%	FAN质量浓度/（mg/L）	极限发酵度/%	库值/%	脆度/%	玻璃质粒质量分数/%	麦芽损失质量分数/%	DON质量浓度/（μg/kg）
标准麦芽	1.63±0.01	0.84±0.01	178±6	78.3±0.4	44.2±0.6	72.5±0.2	3.1±0.7	21.8±0.2	—
感染麦芽	1.60±0.01	0.92±0.01	215±7	79.6±1.5	50.6±1.0	78.9±0.1	3.1±0.9	24.6±0.4	348
Δ/%	−1.6	9.5	20.8	1.7	14.5	8.8	1.1	12.8	0

注：“—”表示未检测到；“Δ”表示感染大麦与标准大麦的差值百分率。

表 3　感染麦芽与对照麦芽的酶活力分析

Table 3　Activities of enzymes in control malt and infected malt

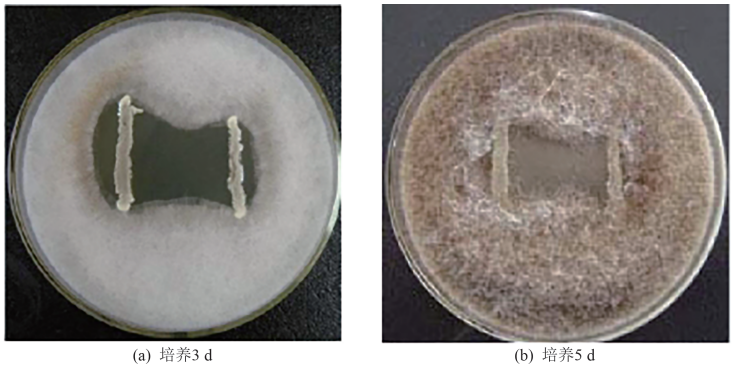
样品	α-淀粉酶 酶活力/(U/g)	β-淀粉酶 酶活力/(U/g)	总蛋白酶 酶活力/(U/g)	30 ℃时β-葡聚糖酶 酶活力/(U/kg)	60 ℃时β-葡聚糖酶 酶活力/(U/kg)
对照麦芽	290.1±7.0	14.9±0.2	16.4±1.8	521.3±16.2	101.5±2.8
感染麦芽	258.4±3.4	13.0±0.2	28.5±2.5	546.3±6.3	156.5±3.8
Δ%	−10.9	−12.9	73.8	4.8	55.2

注：“Δ”表示感染大麦与标准大麦的差值百分率。

2.3　具有抑制大刀镰刀菌活性的微生物的分离及抑菌活性分析

2.3.1　乳酸菌的鉴定

对筛选出的89株乳酸菌进行大刀镰刀菌活性抑制试验，在GenBank中进行同源性搜索比较其扩增的16S rRNA基因序列，鉴定结果为植物乳植杆菌，同时也分离得到一株无抑菌活性的植物乳植杆菌，说明植物乳植杆菌的抑菌活性是菌株依赖型的。为进一步研究乳酸菌的抑菌机理，选择植物乳植杆菌NM-6为研究对象，无抑菌活性的植物乳植杆菌HW-1为阴性对照。植物乳植杆菌NM-6对大刀镰刀菌的抑菌效果见图4。结果表明，抑菌圈会随培养时间的延长而变小，且菌丝颜色变深。



(a) 培养3 d　(b) 培养5 d

图 4　植物乳植杆菌NM-6对大刀镰刀菌的抑制作用

Fig. 4　Inhibition of *F. culmorum* by *L. plantarum* NM-6

2.3.2　乳酸菌代谢产物对镰刀菌生长的影响

以江苏大麦中的产毒真菌大刀镰刀菌为靶标微生物，研究植物乳植杆菌NM-6的抑菌活性。植物乳植杆菌NM-6是以分泌胞外代谢产物来抑制菌丝生长和大分生孢子萌发。添加到PDA平板中的cfsP质量分数为0.010 μg/kg时，大刀镰刀菌生长情况与对照平板无差别。当添加质量分数≥0.025 μg/kg时菌丝颜色有较大变化，且中心位置的菌丝明显减少，菌丝呈放射状向四周分散。如图5所示，含有cfsP平板的菌丝面积相比于化学酸化平板和对照平板明显缩小。

当MEB培养液中的cfsP质量分数达到0.050 μg/kg时，大分生孢子形成2个及以上芽管，并且这些芽管主要出现在非顶端细胞。相反，在无抑菌液或含有0.050 μg/kg非抑菌冻干粉培养液里，大分生孢子只在顶端细胞形成芽管。Koch等[32]观察到，在链霉菌产生的抑制真菌滤液存在的情况下，大刀镰刀菌的菌丝会发生扭曲并不同程度地膨大。

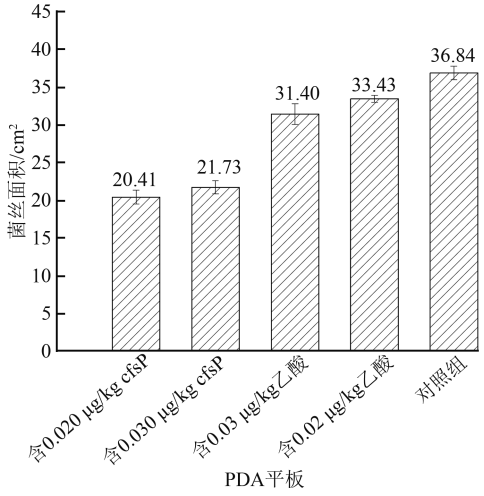


图 5　大刀镰刀菌在PDA平板培养72 h的菌丝面积

Fig. 5　Mycelial areas of *F. culmorum* incubated on PDA for 72 h

如图6所示，当MEB培养液中添加cfsP质量分数达到0.100 μg/kg时，大分生孢子的萌发被完全抑制。48 h后，OD_{620}值也没有变化，并且没有萌发管形成。降低cfsP质量分数至0.075 μg/kg时，OD_{620}值在42 h后增加。当质量分数为0.050 μg/kg时，大约50%大分生孢子在6 h后形成萌发管，9 h后OD_{620}值开始升高。质量分数低于0.05 μg/kg时几乎不影响大分生孢子的萌发。

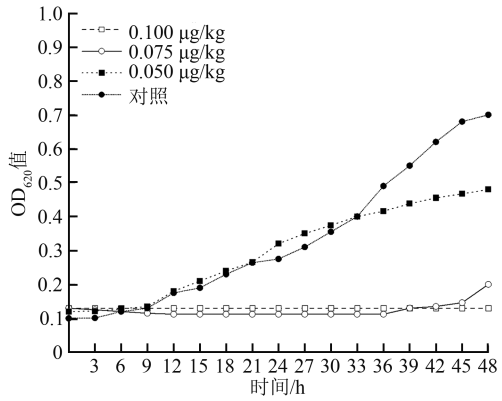


图6　大刀镰刀菌在不同质量分数cfsP培养条件下的生长曲线

Fig. 6　Growth curves of *F. culmorum* cultured with different mass fractions of cfsP

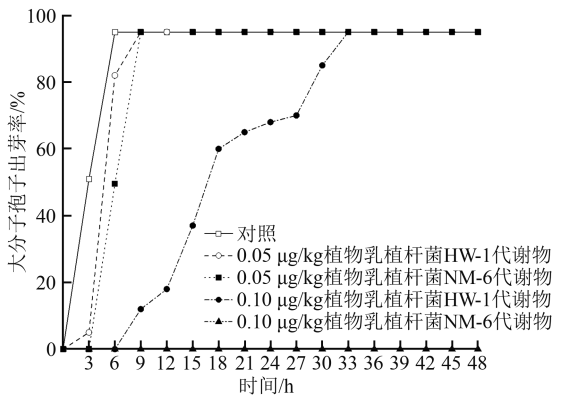


图7　大刀镰刀菌大分生孢子在不同质量分数乳酸菌代谢物中的出芽率

Fig. 7　Germination rates of *F. culmorum* macroconidia cultured with different mass fractions of lactic acid bacteria metabolites

2.3.3　pH、蛋白酶和加热对植物乳植杆菌NM-6代谢物抑菌活性的影响

如图8所示，在pH 4.0时大分生孢子完全被抑制。当pH为5.0和6.5时，随着时间的延长，大分生孢子出芽率逐渐增加。当pH达到6.5时，植物乳植杆菌NM-6代谢物仍然有较弱的抑菌活性，培养9 h后失去抑菌活性。这说明有机酸有利于植物乳植杆菌NM-6代谢物发挥抑菌活性。在低pH条件下，有机酸主要是未解离的状态，使其更容易穿透到靶标微生物的疏水性细胞膜里，从而抑制微生物生长。有研究者[33]利用短乳杆菌LMG 6906抑制普通食物中的腐败真菌，当pH从3.5逐渐升高到6.0时，抑制作用基本丧失。质量分数25%的植物乳植杆菌NM-6和植物乳植杆菌HW-1的cfsP溶液中的*D*-乳酸、*L*-乳酸浓度的检测结果见表4。植物乳植杆菌NM-6上清液和植物乳植杆菌HW-1上清液中*D*-乳酸浓度相近，分别为12.8 mmol/L和12.3 mmol/L。*L*-乳酸和乙酸浓度有一定差距。乳酸和乙酸是常见的抑菌化合物，也是乳酸菌主要的代谢物。植物乳植杆菌NM-6除了会分泌乳酸和乙酸外，还可能会分泌其他抑菌化合物，这些化合物单独或与乳酸、乙酸协同作用可抑制真菌。Lavemicocca等[34]观察到，添加过量的乳酸和乙酸到植物乳植杆菌21B的培养液中，会导致苯乳酸分泌量的增加，并增强了抑菌效果。

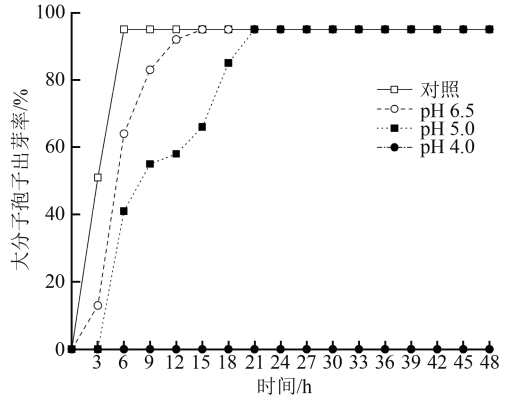


图8　大刀镰刀菌大分生孢子在不同pH抑菌液中的出芽率

Fig. 8　Germination rates of *F. culmorum* macroconidia in cell-free supernatants with different pH

除了有机酸对真菌有抑菌作用之外，一些学者也发现乳酸菌分泌的蛋白质具有抑制真菌活性，且乳酸菌产生的一些环肽和3-苯基乳酸之间有较弱的协同效应。为此进一步通过蛋白酶K和链霉蛋白酶E水解植物乳植杆菌NM-6代谢物，观察蛋白酶是否具有抑制真菌活性。链霉蛋白酶E处理5 h后，抑菌液加到大分生孢子培养液中，24 h后其抑菌活性逐渐丧失。此时约有

25% 的大分生孢子萌发，33 h 后萌发率增加到最大发芽率约 70%。蛋白酶 K 处理 1 h 后抑菌活性明显降低，接种 33 h 后开始萌发。用链霉蛋白酶 E 处理 1 h 没有影响到抑菌活性，用链霉蛋白酶 E 消化 5 h 的植物乳植杆菌 NM-6 抑菌活性与用蛋白酶 K 消化 1 h 的相同。这些数据说明乳酸菌分泌的蛋白质具有抑菌活性或者参与其他物质的抑菌过程。

表 4　植物乳植杆菌 cfsP 溶液中 *D*-乳酸、*L*-乳酸和乙酸浓度

Table 4　Concentrations of *D*-lactic acid, *L*-lactic acid, and acetate in the solution of *L. plantarum* cfsP

成分	*D*-乳酸浓度/（mmol/L）	*L*-乳酸浓度/（mmol/L）	乙酸浓度/（mmol/L）
植物乳植杆菌 NM-6 的 cfsP 溶液	12.8	19.8	13.2
植物乳植杆菌 HW-1 的 cfsP 溶液	12.3	14.1	9.5

因大多蛋白质通常对温度敏感，故设计了不同温度对乳酸菌代谢物抑菌效果的影响。80 ℃加热 1 h 后，代谢物加到大分生孢子培养液中，27 h 后大分生孢子开始生长，48 h 后约 10% 的大分生孢子开始出芽，这说明该代谢物加热易分解。分别加热到 90、100 ℃并维持 1 h，代谢物的抑菌活性没有受到影响，并且在接种 48 h 后也未发现芽管形成。这可能是代谢物在高温下会形成其他具有抑菌活性的化合物，例如热处理的发酵液能导致二酮哌嗪类等具有抑菌活性的化合物生成。

2.4　接种乳酸菌对麦芽品质的影响

体外抑菌试验结果表明，植物乳植杆菌 NM-6 能较好地抑制大刀镰刀菌的生长。为了解其在制麦中的应用效果，将 2×10^7 CFU/g 的植物乳植杆菌 NM-6 孢子悬液添加到 2 次浸麦水中，过程中取样检测 DON 质量分数，并分析成品麦芽质量。

添加植物乳植杆菌 NM-6 的 DON 质量分数变化情况见图 9。DON 质量分数在整个制麦过程中的变化趋势与对照组一致。从发芽阶段开始，接种植物乳植杆菌 NM-6 的 DON 质量分数基本低于对照组，制麦最终阶段，麦芽中 DON 质量分数为 176 μg/kg，约为对照麦芽的 50%。

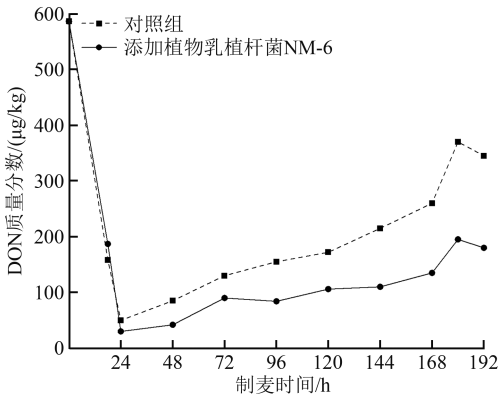


图 9　制麦过程中添加植物乳植杆菌 NM-6 对麦芽 DON 质量分数的影响

Fig. 9　Effect of inoculating *L. plantarum* NM-6 on the mass fraction of DON during malting

如表 5 所示，接种植物乳植杆菌 NM-6 除了能抑制大刀镰刀菌和降低麦芽中的 DON 质量分数，其在影响其他指标方面也显示了较强的优势。特别是改善过滤性能方面，如 *β*-葡聚糖质量浓度、黏度、浊度和过滤时间均得到改善。接种植物乳植杆菌 NM-6 还改善了麦芽的溶解性能，如库值、*α*-氨基氮质量浓度和总酸水平都要高于对照麦芽，但其总酸水平达到了 1.72 mL，高于啤酒厂的可接受范围（0~1.70 mL）。此外，植物乳植杆菌 NM-6 对麦芽的色度、糖化力和 pH 的影响不大。

表 5　接种植物乳植杆菌 NM-6 对麦芽品质的影响

Table 5　Effects of inoculating *L. plantarum* NM-6 on malt quality

组别	色度/EBC	糖化力/WK	黏度/（mPa·s）	浸出率/%	过滤时间/min	*β*-葡聚糖质量浓度/（mg/L）	*α*-氨基氮质量浓度/（mg/L）	浊度/FTU	pH	总酸水平/mL	库值/%
接种植物乳植杆菌 NM-6 的麦芽	3.25	346	1.45	79.5	48	148	217	1.78	5.86	1.72	44.9
对照麦芽	3.25	331	1.54	79.5	60	294	199	2.83	5.89	1.43	42.0

注：总酸水平的单位（mL）表示每 100 mL 样品溶液消耗的 1 mol/L 的 NaOH 标准溶液的毫升数。

3 结论

从含有真菌毒素DON的国产单二大麦中分离得到一株产毒真菌，经鉴定为大刀镰刀菌。评估了大刀镰刀菌对制麦过程和麦芽品质的影响。原料大麦杀菌后接种大刀镰刀菌，证实制麦过程中大刀镰刀菌能够产生真菌毒素DON，真菌毒素的累积量与菌体生长趋势一致。将感染大刀镰刀菌的大麦混合到正常大麦中，制麦后产生的成品麦芽的DON质量分数增加了近6倍。与对照麦芽相比，感染麦芽除了产生真菌毒素外，其损失增加12.8%，这是大刀镰刀菌对大麦破坏性的体现。

作者分离筛选出能够抑制大刀镰刀菌的植物乳植杆菌NM-6，并研究了其抑菌活性机理。植物乳植杆菌NM-6通过分泌胞外代谢产物来抑制大刀镰刀菌的菌丝生长和大分生孢子萌发。通过分析植物乳植杆菌NM-6代谢产物发现，其抑菌作用是有机酸和蛋白质协同作用的结果。分别在2次浸麦水中接种植物乳植杆菌NM-6，接种浓度为2×10^7 CFU/g时即可有效降低感染麦芽的DON质量分数。与对照麦芽相比，接种植物乳植杆菌NM-6的麦芽除了可抑制大刀镰刀菌和降低麦芽中DON质量分数外，还可改善麦汁过滤性能和麦芽溶解性能。下一步可对植物乳植杆菌NM-6的抑菌机理展开深入研究，例如对具有抑菌活性的化合物进行纯化和鉴定。另外，也需要对其安全性进行评估，优化接种时机、数量和制麦工艺。

参考文献

[1] 钱恒伟. 尖孢镰刀菌两个分泌蛋白与番茄SlPR1蛋白互作机制的研究[D]. 济南：山东师范大学，2022.

[2] 张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展[J]. 生命科学，2011，23(3)：311-316.
ZHANG Y P. The research advance of biosynthesis and regulation mechanism on *Fusarium mycotoxins* [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences，2011，23(3)：311-316.（in Chinese）

[3] OSBORNE L E，STEIN J M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals [J]. International Journal of Food Microbiology，2007，119(1/2)：103-108.

[4] DONG F，QIU J B，XU J H，et al. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu Province，China[J]. International Journal of Food Microbiology，2016，230：58-63.

[5] STÜBNER M，LUTTERSCHMID G，VOGEL R F，et al. Heterologous expression of the hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* in *Pichia pastoris* and evaluation of its surface activity and contribution to gushing of carbonated beverages [J]. International Journal of Food Microbiology，2010，141(1/2)：110-115.

[6] WARZECHA T，ADAMSKI T，KACZMAREK Z，et al. Genotype-by-environment interaction of barley DH lines infected with *Fusarium culmorum*（W. G. Sm.）Sacc [J]. Field Crops Research，2011，120(1)：21-30.

[7] NIELSEN L K，COOK D J，EDWARDS S G，et al. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK[J]. International Journal of Food Microbiology，2014，179：38-49.

[8] 肖健，蔡国林，吴殿辉，等. 酸啤酒酿造用乳酸菌的筛选及应用[J]. 食品与发酵工业，2021，47(13)：107-111.
XIAO J，CAI G L，WU D H，et al. Screening and application of lactic acid bacteria for modern sour beer brewing[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(13)：107-111.（in Chinese）

[9] 彭晓斌，李新良. 啤酒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的测定[J]. 食品与生物技术学报，2012，31(4)：438-442.
PENG X B，LI X L. Determination of deoxynivalenol in beer[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2012，31(4)：438-442.（in Chinese）

[10] MATEO E M，TARAZONA A，AZNAR R，et al. Exploring the impact of lactic acid bacteria on the biocontrol of toxigenic *Fusarium* spp. and their main mycotoxins [J]. International Journal of Food Microbiology，2023，387：110054.

[11] RYAN L M，BELLO F D，ARENDT E K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread[J]. International Journal of Food Microbiology，2008，125(3)：274-278.

[12] CABO M L，BRABER A F，KOENRAAD P M F J. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium[J]. Journal of Food Protection，2002，65(8)：1309-1316.

[13] KOKKONEN M，OJALA L，PARIKKA P，et al. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions[J]. International Journal of Food Microbiology，2010，143(1/2)：17-25.

[14] BRIJS K，TROGH I，JONES B L，et al. Proteolytic enzymes in germinating rye grains [J]. Cereal Chemistry，2002，79(3)：423-428.

[15] LOWE D P，ULMER H M，GRASER K，et al. The influence of starter cultures on barley contaminated with *Fusarium culmorum* TMW 4.0754[J]. Journal of the

American Society of Brewing Chemists，2006，64（3）：158-165.

[16] MAUCH A，DAL BELLO F，COFFEY A，et al. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley［J］. International Journal of Food Microbiology，2010，141（1/2）：116-121.

[17] 陶京兰，陆震鸣，王宗敏，等. 实时荧光定量PCR监测镇江香醋醋酸发酵过程中微生物变化[J]. 食品与发酵工业，2013，39（2）：156-160.
TAO J L，LU Z M，WANG Z M，et al. Detection of the variation of microorganisms in acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar through real-time quantitative PCR［J］. Food and Fermentation Industries，2013，39（2）：156-160.（in Chinese）

[18] 金昭，陆健，蔡国林，等. HPLC法测定啤酒原料中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素[J]. 啤酒科技，2009（3）：44-47，50.
JIN Z，LU J，CAI G L，et al. Determination of deoxynivalenol in barley and malt by HPLC[J]. Journal of Beer Science & Technology，2009（3）：44-47，50.（in Chinese）

[19] SCHWARZ P，SCHWARZ J，ZHOU A，et al. Effect of *Fusarium graminearum* and F-poae infection on barley and malt quality［J］. Monatsschrift Fur Brauwissenschaft，2001，54（3/4）：55-63.

[20] SCHWARZ P B，JONES B L，STEFFENSON B J. Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley［J］. Journal of the American Society of Brewing Chemists，2002，60（3）：130-134.

[21] DING L N，XU H B，YI H Y，et al. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways[J]. PLoS One，2011，6（4）：e19008.

[22] Bushnell WR. Histology and physiology of Fusarium head blight[M]. St Paul. MN：APS Press，2003：44-83.

[23] CHAMPEIL A，DORÉ T，FOURBET J F. *Fusarium* head blight：epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains［J］. Plant Science，2004，166（6）：1389-1415.

[24] PLACINTA C M，D'MELLO J P F，MACDONALD A M C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins[J]. Animal Feed Science and Technology，1999，78（1/2）：21-37.

[25] RAULIO M，WILHELMSON A，SALKINOJA-SALONEN M，et al. Ultrastructure of biofilms formed on barley kernels during malting with and without starter culture［J］. Food Microbiology，2009，26（4）：437-443.

[26] 许伟，耿芳芳，范梦雪，等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒性的研究进展[J]. 生物学杂志，2016，33（1）：78-81，85.
XU W，GENG F F，FAN M X，et al. Research progress of deoxynivalenol toxicity[J]. Journal of Biology，2016，33（1）：78-81，85.（in Chinese）

[27] 栾静，赵长新. 大麦微生物对制麦和啤酒酿造的影响及其控制[J]. 食品工业科技，2008，29（12）：297-299.
LUAN J，ZHAO C X. Control of mold and effects of barley microbe on malting and brewing[J]. Science and Technology of Food Industry，2008，29（12）：297-299.（in Chinese）

[28] VEGI A，SCHWARZ P，WOLF-HALL C E. Quantification of *Tri5* gene，expression，and deoxynivalenol production during the malting of barley［J］. International Journal of Food Microbiology，2011，150（2/3）：150-156.

[29] 邱然，陆健，钟俊辉，等. 微生物对麦汁过滤性能和大麦呼吸活性的影响[J]. 中外酒业，2022（15）：31-42.
QIU R，LU J，ZHONG J H，et al. Effects of microorganisms on filtration performance of wort and respiratory activity of barley［J］. Global Alcinfo，2022（15）：31-42.（in Chinese）

[30] GARDA-BUFFON J，BARAJ E，BADIALE-FURLONG E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology，2010，53（3）：505-511.

[31] NOOTS I，DELCOUR J A，MICHIELS C W. From field barley to malt：detection and specification of microbial activity for quality aspects［J］. Critical Reviews in Microbiology，1999，25（2）：121-153.

[32] KOCH E，LÖFFLER I. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53［J］. Journal of Phytopathology，2009，157（4）：235-242.

[33] DE MUYNCK C，LEROY A I J，DE MAESENEIRE S，et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites［J］. Microbiological Research，2004，159（4）：339-346.

[34] LAVERMICOCCA P，VALERIO F，VISCONTI A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products［J］. Applied and Environmental Microbiology，2003，69（1）：634-640.

（责任编辑：闫林红）