

处理方式对米根霉菌 *Rho18* 清除呕吐毒素的影响

Effect of treatment on the elimination of deoxynivalenol by *Rho18*

于小番 张琛 许慧卿 丁香丽 袁亚明

YU Xiao-fan ZHANG Chen XU Hui-qing DING Xiang-li YUAN Ya-ming

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225000)

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China)

摘要:通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)及高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)测定不同方式处理的米根霉菌 *Rho18* 对小麦粉中呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)的清除效果,探讨米根霉菌对 DON 的清除能力。结果显示,米根霉菌 *Rho18* 对小麦粉中 DON 的清除率均随浓度增高及孵育时间的延长而提高,各高浓度处理组孵育 10 h 后与其他处理组均存在显著差异,高浓度的细胞壁悬液与小麦粉孵育 10 h 条件下对 DON 的清除效果最好(51.62%)。不同方式处理的米根霉菌 *Rho18* 与 DON 作用后产生 3 种相对分子质量在 277, 279, 281 左右的新物质。结果表明,不同方式处理的米根霉菌 *Rho18* 对 DON 均有一定清除作用,且作用效果与浓度和孵育时间相关,其清除机制主要为生物酶系作用。

关键词:米根霉菌;呕吐毒素;菌体成分;清除作用;小麦粉;

Abstract: The effect of *Rho18* treated with different methods on the removal of deoxynivalenol (DON) from wheat flour was determined by ELISA and HPLC-MS. Processing results showed that the different ways of rice root mildew *Rho18* clearance to DON in wheat flour were all increased with the concentration increase with the extension of incubation time, as well as the high concentration of the treatment group. After 10 h incubation with the rest of the concentration of treatment group were significantly different, the cell walls of a high concentration of suspension and wheat 10 h incubation conditions to DON removal effect is best (51.62%). Three kinds of new substances with relative molecular weight of 277, 279 and 281 were produced by *Rho18* and DON treated in different ways. The results showed that *Rho18* of *Rhizopus oryzae* treated in different ways had certain scavenging effects on DON, and the effect was related to concentration and

incubation time, and its scavenging mechanism was mainly the action of biological enzyme system.

Keywords: *Rhizopus oryzae*; deoxynivalenol; bacterial composition; clearing effect; wheatmeal

呕吐毒素又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),是一种真菌毒素,主要由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)产生。DON 具有多种毒性作用,包括急性毒性、慢性毒性、细胞毒性、免疫毒性等,欧盟将其定为三级致癌物^[1]。由于中国的膳食结构偏向于谷物,所以呕吐毒素的危害就显得更为突出。

现有粮食中 DON 清除方法主要有物理脱毒法、化学脱毒法、生物脱毒法,但物理、化学脱毒方法均有不可避免的缺陷,如造成营养品质和适口性降低^[2]。因此,生物脱毒法已逐渐成为研究清除粮食中 DON 毒素污染的重要方向,如 Binder 等^[3]从牛瘤胃中得到一株可将 DON 毒素转化的细菌,He 等^[4]从鸡肠道中分离出对 DON 毒素转化率达 98% 的芽孢杆菌。目前生物脱毒的研究仅集中于整菌株探索对霉菌毒素的降解作用,但究竟菌株是通过哪个部分、何种机制来达到清除 DON 的作用尚未见报道。

米根霉(*Rhizopus oryzae*)是中国传统发酵食品的重要发酵菌种之一^[5],是美国 FDA 认证的安全菌株^[6]。米根霉在生长过程中产酶种类丰富、活力高,能产生多种有机酸^[7]。已有研究^[8]证实根霉菌具有一定的霉菌毒素脱毒作用。试验拟以粮食发酵中常用的米根霉菌株 *Rho18* 作为研究对象,探讨其菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液、细胞壁悬液对 DON 毒素的清除效果,以期为研究利用微生物清除粮食中 DON 毒素的实践应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

米根霉菌 *Rho18*: 从传统酒曲中选育,扬州大学食品

基金项目:国家自然科学基金(编号:31701634)

作者简介:于小番,女,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:2019-06-24

科学与工程学院营养与食品卫生实验室保存。

1.2 试验材料与仪器

呕吐毒素(DON):美国 Sigma 公司;

氯化钠、甲醇:分析纯,国药化学试剂有限公司;

DON ELISA 检测试剂盒:上海羽朵生物科技有限公司;

PDA 培养基:青岛高科园海博生物技术有限公司;

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;

台式冷冻离心机:X-22R 型,德国 Allegra 公司;

超声破细胞破碎仪:JY920- IID 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。

1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液及发酵上清液的制备 收集稳定期(20~32 h)的 *Rho18* 发酵液,调节浓度至 10^{12} CFU/mL,随后以 100 倍稀释,获得高、低 2 个浓度(1×10^{12} , 1×10^{10} CFU/mL)的菌液。将各浓度发酵液于 4 °C 以 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液和菌体。各浓度上清液分别用 0.22 μ m 滤膜过滤后收集,滤液即为高、低 2 个浓度的 *Rho18* 发酵上清液。菌体用无菌生理盐水洗涤 3 次后,用生理盐水重悬至原浓度,分别记为高、低 2 种浓度 *Rho18* 菌悬液,均于 4 °C 保存备用。

1.3.2 全菌裂解液及细胞壁悬浮液的制备 取 1.3.1 中高、低浓度 *Rho18* 菌悬液,用超声波细胞破碎仪(输出功率 700 W,间隔时间 5 s,每次裂解时间 5 s,裂解总时间 25 min,保护温度 0 °C)对菌悬液进行裂解(至镜检无完整细胞)。过滤,收集滤液,于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min,取各浓度上清液,即为高、低浓度的 *Rho18* 全菌裂解液。对每组沉淀用生理盐水洗涤 3 次并重悬至原溶液体积,即为高、低浓度的 *Rho18* 细胞壁悬浮液,均于 4 °C 保存备用。

1.3.3 粗提酶液的制备 取 1.3.1 中 *Rho18* 高、低浓度发酵上清液,于 4 °C 以 10 000 r/min 离心 20 min,上清液用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤^[9]收集各组滤液,即为高、低浓度的 *Rho18* 粗提酶液,均于 4 °C 保存备用。

1.3.4 小麦粉样品制备 取市售小麦粉,灭菌,测定 DON 含量,适量添加标品 DON,调节 DON 含量大于特征值[(2 366±187) μ g/kg^[10]],40 °C 干燥至恒重。

1.3.5 菌体成分对小麦粉中 DON 的清除试验 分别取 *Rho18* 各浓度菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液、细胞壁悬浮液,加入含有一定量 DON 的面粉样品中,按 1:5 (g/mL)添加;以添加 PBS 作空白对照,于 37 °C,

140 r/min 的条件下孵育培养,分别在孵育 5 h 和 10 h 时取样。

1.3.6 DON 清除率的测定 样品中 DON 的含量采用 GB 5009.111—2016 中酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定,每组设置 3 个平行,取平均值按式(1)计算清除率。

$$CR = \frac{a_0 - a_1}{a_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

CR——DON 清除率,%;

a_0 ——空白样中 DON 含量, μ g/10 g;

a_1 ——处理样中 DON 残留量, μ g/10 g。

1.3.7 DON 降解产物的定性分析 对孵育 10 h 后高浓度处理组的 DON 降解产物,参照吴娉等^[11]的方法,用高效液相色谱—质谱联用仪(HPLC-MS)进行定性分析,其中模式为 SEI,探头温度为 250 °C。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 *Rho18* 菌悬液对 DON 的清除效果

不同浓度的 *Rho18* 菌悬液对小麦粉样品中 DON 的清除效果如表 1 所示。

表 1 米根霉菌 *Rho18* 菌悬液对 DON 的清除率[†]

组别	5 h	10 h
高浓度组	17.18±0.30 ^{aA}	37.13±0.66 ^{aB}
低浓度组	1.28±0.05 ^{bA}	2.61±0.10 ^{bA}
对照	—	—

[†] 小写字母不同表示同列间的差异显著($P<0.05$);大写字母不同表示同行间的差异显著($P<0.05$);“—”表示 DON 清除率为 0%。

由表 1 可知,低浓度 *Rho18* 菌悬液经 5 h 孵育处理组对 DON 的清除率最低(1.28%);高浓度菌悬液经 10 h 孵育后对 DON 清除率为最高(37.13%)。孵育 5,10 h 时,高、低浓度 *Rho18* 菌悬液对 DON 的清除率存在显著差异($P<0.05$);低浓度菌悬液组随处理时间的延长,尽管清除率有所提高,但无显著差异。有研究^[12]证实,米根霉、匍枝根霉等根霉属微生物可以降解由镰刀菌属产生的毒素。试验表明米根霉 *Rho18* 菌株对小麦粉中的 DON 毒素有一定的清除作用,且清除作用在 10 h 内与菌液的浓度、处理时间有明显的正相关性,但具体的清除机制有待进一步研究。

2.2 不同浓度 *Rho18* 发酵上清液对 DON 的清除效果

不同浓度的 *Rho18* 发酵上清液对小麦粉样品中 DON 的清除效果如表 2 所示。

由表 2 可知,小麦粉样品与高、低浓度的米根霉菌

表 2 米根霉菌 *Rho18* 发酵上清液对 DON 的清除率[†]
Table 2 Removal effect of fermentation supernatant of *Rhizopus oryzae*18 on DON %

组别	5 h	10 h
高浓度组	19.44±0.00 ^{aA}	39.45±0.30 ^{aB}
低浓度组	0.49±0.12 ^{bA}	0.55±0.02 ^{bA}
对照	—	—

† 小写字母不同表示同列间的差异显著(P<0.05);大写字母不同表示同行间的差异显著(P<0.05);“—”表示 DON 清除率为 0%。

Rho18 发酵上清液孵育 5 h 后,高浓度组 DON 清除率为 19.44%;经过 10 h 孵育,高浓度组对 DON 的清除率(39.45%)显著升高(P<0.05)。结果表明,*Rho18* 发酵上清液对小麦粉样品中的 DON 有清除作用,高浓度组延长孵育时间可以显著提高 DON 清除率。试验发现,孵育 5, 10 h 后,低浓度处理组对 DON 的清除率显著低于高浓度组,且低浓度组孵育 5 h 与 10 h 组间无显著差异,可能与有效物质浓度过低有关。米根霉菌发酵上清液中主要为菌株代谢产物,含有多糖、有机酸及小分子蛋白质等多种有机物。其中部分有机酸具有还原型,可与 DON 毒素发生氧化还原反应。Marleen 等^[13]研究表明还原剂可改变单端孢酶烯族毒素的分子结构和生物活性。耿海荣等^[14]筛选出一株耐酸耐高温的枯草芽孢杆菌,并证实其发酵上清液中含有可清除镰刀菌产生的 ZEN 毒素,与试验结果相似。

2.3 不同浓度 *Rho18* 全菌裂解液对 DON 的清除效果

不同浓度的 *Rho18* 裂解液对小麦粉样品中 DON 的清除效果如表 3 所示。

表 3 米根霉菌 *Rho18* 全菌裂解液对 DON 的清除率[†]
Table 3 Removal effect of whole lysate of *Rhizopus oryzae*18 on DON %

组别	5 h	10 h
高浓度组	3.44±0.00 ^{aA}	46.34±0.00 ^{aB}
低浓度组	0.36±0.07 ^{bA}	0.45±0.15 ^{bA}
对照	—	—

† 小写字母不同表示同列间的差异显著(P<0.05);大写字母不同表示同行间的差异显著(P<0.05);“—”表示 DON 清除率为 0%。

由表 3 可知,小麦粉样品与不同浓度的 *Rho18* 全菌裂解液经过 5 h 孵育后,高浓度组 DON 的清除率(3.44%)显著高于低浓度组(P<0.05);经过 10 h 孵育,高浓度组 DON 清除率显著提高(P<0.05),DON 清除率呈现出随浓度升高、孵育时间增长而上升的趋势。以上结果表明,*Rho18* 细胞内可能含有可清除 DON 的物质,

这种物质对 DON 的清除作用与作用时间、全菌裂解液浓度有关。全菌裂解液中主要包括细胞器、胞内酶和一些小分子物质。推测微生物清除 DON 毒素的途径:① 自身代谢酶作用^[15];② 多膜结构的细胞器对 DON 毒素存在吸附作用^[16]。孵育 10 h 的效果显著高于 5 h,可能与酶的作用时间有关。具体何种酶具有良好的清除作用还需进一步探究。

2.4 不同浓度 *Rho18* 粗提酶液对 DON 的清除效果

不同浓度的 *Rho18* 粗提酶液对小麦粉样品中 DON 的清除效果如表 4 所示。

表 4 米根霉菌 *Rho18* 粗提酶液对 DON 的清除率[†]
Table 4 Removal effect of *Rhizopus oryzae*18 crude enzyme solution on DON %

组别	5 h	10 h
高浓度组	16.48±0.01 ^{aA}	40.84±0.00 ^{aB}
低浓度组	2.63±0.23 ^{bA}	5.96±0.44 ^{bA}
对照	—	—

† 小写字母不同表示同列间的差异显著(P<0.05);大写字母不同表示同行间的差异显著(P<0.05);“—”表示 DON 清除率为 0%。

由表 4 可知,小麦粉样品与不同浓度组的 *Rho18* 粗提酶液孵育不同时间后,高浓度组的 DON 清除率均显著高于相同孵育时间下的低浓度组(P<0.05),高浓度组孵育 10 h 后对 DON 的清除率可达 40.84%,低浓度组经过不同孵育时间处理后无显著差异。以上结果表明,*Rho18* 粗提酶液对小麦粉中的 DON 有清除作用,作用效果受酶的作用时间、浓度影响,在高浓度下,清除效果会随着时间的延长而增加。粗提酶液的主要成分是 *Rho18* 稳定期的胞外酶,包括淀粉酶、脂肪酶等,此阶段酶活性较高。淀粉酶可将小麦淀粉水解为极限糊精,糊精对小分子物质具有一定的包埋作用^[17],可固化 DON 毒素,从而降低 DON 毒素的检出量;脂肪酶能够催化水解环氧化合物,可以将 DON 转化为 DOM-1^[15],其毒性为 DON 的 1/55^[18]。多种酶类的综合作用,间接或直接降低了小麦淀粉中 DON 毒素的含量。

2.5 不同浓度 *Rho18* 细胞壁对 DON 的清除效果

不同浓度的 *Rho18* 细胞壁悬液对小麦粉样品中 DON 的清除率如表 5 所示。

由表 5 可知,小麦粉样品与不同浓度组的 *Rho18* 细胞壁悬液混合作用,经 5 h 孵育后,低浓度组(4.54%)显著低于高浓度组(P<0.05);处理 10 h 后,与处理 5 h 相比高浓度组对 DON 的清除率显著提高(P<0.05),低浓度组相较无显著差异。以上结果表明,*Rho18* 的细胞壁对小麦粉中的 DON 毒素有一定的清除效果。

有研究^[19]表明,微生物细胞壁对真菌毒素的清除作用可能包括物理吸附和生物降解。细胞壁的吸附作用主

表 5 米根霉菌 *Rho*18 细胞壁对 DON 的清除率[†]Table 5 Removal effect of cell wall of *Rhizopus oryzae* 18 on DON %

组别	5 h	10 h
高浓度组	40.27±0.05 ^{aA}	51.62±0.08 ^{aB}
低浓度组	4.54±0.10 ^{bA}	5.12±0.02 ^{bA}
对照	—	—

[†] 小写字母不同表示同列间的差异显著($P<0.05$),大写字母不同表示同行间的差异显著($P<0.05$);“—”表示 DON 清除率为 0%。

要是通过其中的肽聚糖、甘露聚糖和葡聚糖等高分子物质实现^[16]。米根霉菌细胞壁的主要成分为几丁质和壳聚糖^[20],其中壳聚糖是米根霉菌细胞壁结构性多糖的主要成分,且大部分含 1.28% 左右的氨基,具有良好的吸附作用^[21]。细胞壁的生物降解作用可能与细胞壁表面的酶类有关。米根霉菌细胞壁的壳聚糖对于酶具有良好的固化作用^[22],可同时吸附、固化某些酶。同时,细胞壁表面存在的一些具有类似于酶活性作用的表面蛋白,对 DON 也可能具有一定的降解作用。此外,米根霉菌细胞壁对金属离子具有一定的吸附作用,Meng 等^[23]以米根霉菌细胞壁制备了同时可吸附 Ni^{2+} 和 Fe^{3+} 的双吸收剂,张亚娟^[24]

发现黑根霉对 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Pb^{2+} 等重金属有较高的吸附能力。金属离子能够与酶结合成金属蛋白酶,对于酶的活性存在积极的影响^[14]。因此,高浓度的 *Rho*18 细胞壁具有较高的 DON 清除能力可能与这些金属离子能够辅助米根霉菌细胞壁清除 DON 有关。

由表 1~5 可以看出,经过同一处理方式处理的米根霉 *Rho*18 与小麦粉样品混合,其清除率与时间呈正比关系。不同方式处理的 *Rho*18 对小麦粉中 DON 的清除效果存在差异,其中细胞壁对 DON 的清除效果最好,其次是发酵上清液。米根霉菌 *Rho*18 所产的酶大部分为初级代谢产物,且细胞内外均存在^[25]。试验所制备的 *Rho*18 全菌裂解液、粗提酶液中均含有一定比例的酶或小分子代谢物质,但因各成分液所含酶系及有机物质种类存在差异,而导致不同处理的 *Rho*18 对 DON 的清除率存在差异。细胞壁对 DON 毒素除由于结构特性而存在吸附作用外,其固化的酶对于 DON 毒素也可能存在清除作用,因而细胞壁对 DON 毒素的清除效果较好。

2.6 DON 降解产物的定性分析

高浓度的 *Rho*18 用不同处理方式后,与小麦粉共同孵育 10 h,用 LC-MS 测定 DON 的降解产物,测定结果如图 1 所示。

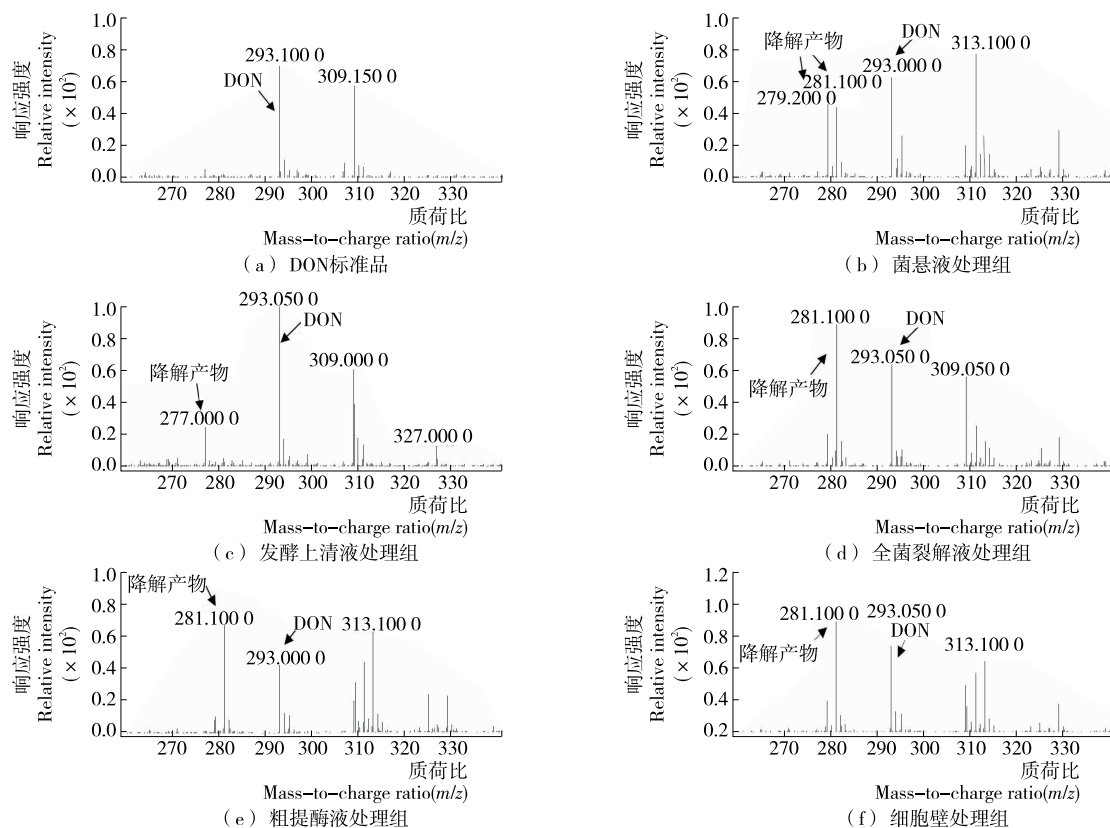
图 1 高浓度 *Rho*18 不同处理方式孵育 10 h 后降解产物的 LC-MS 图谱

Figure 1 LC-MS spectra of degradation products after high concentration *Rho* 18 was incubated for 10 h with different treatments

由图1可知,DON标准品的相对分子质量为293.30,经过 *Rho18* 菌悬液、发酵上清液、全菌裂解液、粗提酶液以及细胞壁悬液处理10 h后,均产生相对分子质量为277,281左右的两种新物质,其中DON经 *Rho18* 悬液处理后可产生相对分子质量为279,281左右的两种物质。以上结果表明,不同处理方式的 *Rho18* 可通过生物降解DON产生新的物质。

相关研究^[16,26]显示,DON在糖苷酶作用下可进行3C-糖苷化,生成低毒性的降解产物;同时,DON作为烯醇类化合物,含有环氧基团和羟基,环氧化合物在脂肪酶作用下可被水解。乐华爱等^[27]研究证实根霉菌可产生高活性的糖苷酶,可降解DON。此外,根霉菌可产生脂肪酶^[28]、酸性蛋白酶以及酒化酶系^[29],但这些酶系是否具有开C12/C13环氧基,或是在复杂酶系作用下与有机酸发生酯化反应,进一步氧化或分解DON,还需进一步论证。

3 结论

试验结果表明,米根霉菌 *Rho18* 对DON的清除率因处理方式、浓度及孵育时间而不同,其中高浓度的 *Rho18* 细胞壁悬液与小麦粉孵育10 h后,小麦粉中呕吐毒素的清除率最高(51.62%),其作用机制可能与 *Rho18* 细胞壁对DON生物降解和物理吸附作用有关。LC-MS测定结果表明,经不同方式处理的米根霉 *Rho18* 与DON作用后均有新物质生成,可能与根霉菌丰富且高活性的酶系有关,但具体由何种酶系发挥主要作用,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 张琛,许慧卿,崔桂友,等. 纳豆芽孢杆菌 *Bacillus natto* 16-1 对小麦粉中呕吐毒素的脱毒机制[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 8-14.
- [2] 朱金林. 呕吐毒素最新研究进展及发展趋势[J]. 国外畜牧学: 猪与禽, 2013, 33(12): 102-104.
- [3] 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.
- [4] HE P, YOUNG L G, FORSBERG C. Microbial transformation of deoxynivalenol(vomitoxin)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 58(12): 3 857-3 863.
- [5] LONDOÑO-HERNÁNDEZ L, RAMÍREZ-TORO C, RUIZ H A, et al. *Rhizopus oryzae* - Ancient microbial resource with importance in modern food industry [J]. Food Microbiol, 2017, 257: 110-127.
- [6] 吴寒. 米根霉和乳酸菌混合固态发酵对燕麦营养及功能性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 16-17.
- [7] DENARDI-SOUZA T, LUZ C, MANES J, et al. Antifungal effect of phenolic extract of fermented rice bran with *Rhizo-*

- pus oryzae* and its potential use in loaf bread shelf life extension[J]. Food Agric, 2018, 98(13): 5 011-5 018.
- [8] 张立阳,赵雪娇,刘帅,等. 食品及饲料中黄曲霉毒素生物脱毒的研究进展[J]. 动物营养学报, 2019, 31(2): 521-529.
- [9] 赵俊廷. NJA-1 菌产环氧化物水解酶条件的优化及对脱氧雪腐镰刀菌烯醇生物转化的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 38-40.
- [10] 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.
- [11] 吴娱,王开萍,唐正江,等. 米曲霉 *Aspergillus oryzae* As-W.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.
- [12] JÁNOS V, ZSANETT P, KATALIN T, et al. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(3): 321-328.
- [13] MARLEEN P, JANINE W, SUSANNE K, et al. Studies on the bioavailability of deoxynivalenol (DON) and DON sulfonate (DONS) 1, 2, and 3 in pigs fed with sodium sulfite-treated DON-contaminated maize[J]. Toxins, 2015, 7(11): 4 622-4 644.
- [14] 耿海荣,张晨曦,赵月菊,等. 一株高效降解玉米赤霉烯酮的耐酸耐高温枯草芽孢杆菌的研究[J]. 核农学报, 2019(7): 1 399-1 407.
- [15] PALOMO J M, MUÑOZ G, FERNÁNDEZ-LORENTE G, et al. Modulation of mucormicel lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R, S)-2-butyrolyl-2-phenylacetic acid[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2003, 21(4): 201-210.
- [16] POPPENBERGER B, BERTHILLER F, LUCYSHYN D, et al. Detoxification of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(48): 47 905-47 914.
- [17] 魏蒙月,张赞彬,吴西芝,等. 香辛料精油-β-环糊精微胶囊的物理特征及对酱牛肉熏蒸保鲜的效果研究[J]. 中国食品添加剂, 2019(4): 127-133.
- [18] 曹慧英,伍松陵,孙长坡. 呕吐毒素(DON)生物合成和降解研究进展[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(5): 116-123.
- [19] 胡晓清,褚召娟,张继祥,等. 酵母生物脱毒的研究进展[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 272-277.
- [20] 陈世年. 从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究Ⅳ[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 1997(1): 80-82.
- [21] 李子琪,孟倩,孙凤清,等. 壳聚糖及其衍生物脱除贝类中重金属的机理及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 188-192.

(下转第146页)

- [9] 高乾坤, 焦琳舒, 杜贺超, 等. 高通量测序分析不同产地带鱼冷藏时微生物群落多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 127-132.
- [10] 江艳华, 王联珠, 许东勤, 等. 基于高通量测序分析虾夷扇贝柱菌群结构及腐败优势菌[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 140-145.
- [11] 江艳华, 姚琳, 李凤铃, 等. 基于高通量测序的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2 840-2 845.
- [12] 曹荣, 刘洪, 赵玲, 等. 基于高通量测序的牡蛎冷藏过程中微生物群落分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(20): 275-280.
- [13] 江杨阳, 杨水兵, 余海霞, 等. 基于培养基法和高通量测序法分析冷藏小龙虾优势腐败菌[J]. 食品科学. (2018-11-01) [2019-05-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20181029.1701.044.html>.
- [14] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and pre-processing of metagenomic datasets[J]. Bioinformatics, 2011, 27(6): 863-864.
- [15] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [16] AL-DAGAL M M, BAZARAA W A. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(1): 51-56.
- [17] 魏静. 即食小龙虾的腐败菌相分析及杀菌技术的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2014: 12-23.
- [18] 符莎露. 绿原酸接枝明胶制备新型水产品生物保鲜剂的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 19-25.
- [19] MARIA D L, DOLORES S D, ALESSANDRA D, et al. Characterization of bacterial communities of donkey milk by high-throughput sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 251(19): 67-72.
- [20] 蔡丽萍, 徐海圣, 何琳, 等. PCR-DGGE 技术分析不同地区野生锯缘青蟹肠道菌群多样性[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 278-282.
- [21] COLLINS M D, LAWSON P A, WILLEMS A. The phylogeny of the genus clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combinations [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 812-826.
- [22] LAWSON P A, RAINEY F A. Proposal to restrict the genus clostridium prazmowski to clostridium butyricum and related species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66: 1 009-1 016.
- [23] TAKAMI H, TAKAKI Y, UCHIYAMA I. Genome sequence of Oceanobacillus iheyensis isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(18): 3 927-3 935.
- [24] LU Jie, NOGI Y, TAKAMI H. Oceanobacillus iheyensis gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1 050 m on the Iheya Ridge [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205: 291-297.
- [25] LU Jie, NOGI Y, TAKAMI H. Oceanobacillus iheyensis gen. nov., sp. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(85): 685-690.
- [26] YUMOTO I, HIROTA K, NODASAKA Y, et al. Oceanobacillus oncorhynchi sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout(Oncorhynchus mykiss), and emended description of the genus Oceanobacillus International[J]. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1 521-1 524.
- [27] 商宝娣, 杨星, 李正友, 等. 希瓦氏菌属的研究进展[J]. 福建农业, 2015, 7(1): 152-154.
- [28] 李琳, 潘子强. 水产品特定腐败菌的确定及生长模型建立研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 152-156.

(上接第 73 页)

- [22] 李冠龙, 刘晓兰, 波利特. β -半乳糖苷酶的固定化及其在乳清行业中的应用[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 264-269.
- [23] MENG Qin, LU De-wei. Biosorption of Ni^{2+} and Fe^{3+} by fungal cell wall sacchrides[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2000(2): 123-127.
- [24] 张亚娟. 黑根霉菌对重金属废物的生物吸附及其固定化技术[J]. 环保科技, 2009, 15(3): 30-34.
- [25] SALLEH A B, MUSANI R, BASRI M, et al. Extra and intracellular lipase from a thermophile *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(10): 978-981.
- [26] 于大海. 脂肪酶拆分环氧丙醇和 2-辛醇[D]. 吉林: 吉林大学, 2008: 37-38.
- [27] 乐华爱, 谢玉梅, 张树政, 等. 根霉的研究Ⅳ: 根霉淀粉葡萄糖苷酶的研究[J]. 微生物学报, 1966, 12(2): 187-193.
- [28] 范凯, 王栋, 徐岩. 华根霉液态培养生产脂肪酶不同形态菌体的转录组差异分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 29-41.
- [29] 窦晓, 杨建刚, 马莹莹, 等. 华根霉在酿酒中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 246-250.