

黄曲霉毒素分解酶基因克隆及其在大肠杆菌中的融合表达

Cloning of aflatoxin-detofizyme gene and fusion expression in *Escherichia coli*

李 旺 史敦胜 丁 轲 曹平华 赵龙妹

LI Wang SHI Dun-sheng DING Ke CAO Ping-hua ZHAO Long-mei

(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471023)

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:通过 GenBank 公布的黄曲霉毒素分解酶基因序列, 合成 ADTZ 基因引物。从发霉的玉米样品中提取混合菌液, 经菌液 PCR 扩增, 筛选 ADTZ 基因片段, 构建表达载体, 将目的基因转化到大肠杆菌中, 并进行诱导表达。通过 SDS-PAGE 检测表达产物大小和浓度。通过酶解试验检测表达产物对 AFB₁ 的降解能力。结果成功从发霉玉米混菌悬液中扩增到 ADTZ 基因, 该基因序列全长 2 088 bp, 与已报道的 ADTZ 基因相似度达到 99%。该基因可在大肠杆菌中进行融合表达, 表达产物蛋白大小为 118.5 kDa。重组大肠杆菌培养后获得的粗酶液可降解发霉玉米中的 AFB₁, 降解率达到 77.69%。

关键词:黄曲霉毒素分解酶基因; 大肠杆菌; 融合表达; 黄曲霉毒素 B₁

Abstract: The ADTZ gene primers were synthesized through the ADTZ gene sequence published by GenBank. The ADTZ gene fragment was screened by PCR from the mixed bacterial solution which extracted of the moldy corn sample, and transformed into *E. coli* by constructing expression vector. The size and concentration of the ADTZ expression product were detected by SDS-PAGE. The degradation ability of the expression product to aflatoxin AFB₁ was tested by enzymatic hydrolysis. The results showed that the ADTZ gene was successfully amplified from the moldy maize suspension. The full length of the ADTZ gene sequence was 2 088 bp, and the similarity with the reported ADTZ gene was 99%. The gene can be fused and expressed in *E. coli*.

The protein size of the expressed product was 118.5 kDa. The crude enzyme solution of recombinant *E. coli* could degrade AFB₁ in mildewed maize, and the degradation rate reached 77.69%.

Keywords: Aflatoxin-detofizyme gene; *Escherichia coli*; fusion expression; Aflatoxins

黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFT)是一类化学结构类似的剧毒物质^[1], 主要由曲霉菌属的黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等真菌在一定的环境条件下生物合成的次级代谢产物^[2-3], 具有强烈的致畸、致癌和致突变作用^[4-5]。AFT 是各种粮食、食品和饲料中广泛存在的一类霉菌毒素, 对全世界人类和动物的健康构成极大的威胁^[6-8]。近年来微生物及其产生的分解酶对 AFT 进行生物抑制和降解的方法陆续被报道, 其中黄曲霉毒素分解酶(Aflatoxin-detofizyme, ADTZ)是特异性分解黄曲霉毒素的活性物质^[9-12]。但天然黄曲霉毒素分解酶, 难以从菌株中分离, 不同微生物菌种对 AFT 的降解作用机理还不明确, 酶的活性不高, 大部分对标准品黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 具有分解效果^[9, 13], 而所筛选的酶对天然谷物等感染的黄曲霉毒素分解研究甚少。利用分子生物学和基因工程技术将 ADTZ 基因克隆, 并在异源宿主中进行表达, 可以获得明确的分解酶产物, 提高 ADTZ 的产量和活性^[14]。

本研究拟通过已报道^[15]的 ADTZ 序列合成引物, 扩增 ADTZ 基因, 在大肠杆菌中融合表达, 验证 ADTZ 基因是否可以异源表达, 同时检测表达产物表达量并应用到对谷物中黄曲霉毒素的分解上, 以期获得更高活性的 ADTZ, 对天然谷物中黄曲霉毒素的生物降解提供参考。

基金项目:国家自然科学基金(编号:31101744);河南省重大科技专项(编号:131100110300)

作者简介:李旺(1976—), 男, 河南科技大学副教授, 硕士生导师, 博士。E-mail: liwang@haust.edu.cn

收稿日期:2018-12-12

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒菌种

质粒 pGEM-Teasy:美国 Promega 公司;
质粒 pMAL-c5x、大肠杆菌 *Rosetta* (DE3):生工生物工程(上海)股份有限公司;
大肠杆菌(*E.coli* DH5a):本实验室保存;
混合菌种混悬液:本实验经发霉玉米制备,用以扩增 ADTZ 目的基因。

1.1.2 主要试剂

质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA Marker:天根生化科技(北京)有限公司;
黄曲霉毒素 B₁ ELISA 检测试剂盒:北京华安麦科生物技术有限公司;
非预染蛋白 Marker、预染蛋白 Marker:生工生物工程(上海)股份有限公司;
*Nco*I、*Bam*HI、DNA 聚合酶(500 U)、DNA 连接酶(100 U):美国 Promega 公司。

1.1.3 主要设备

恒温培养箱:DNP-9272BS 型,上海新苗医疗器械制造有限公司;
恒温培养摇床:SKY-2102 型,上海苏坤实业有限公司;

冷冻离心机:Thermo Micro 21R 型,美国 Thermo Electron Corporation 公司;

电泳仪:JY600C 型,北京君意东方电泳设备有限公司;

凝胶成像系统:Tanon 4600SF 型,上海天能科技有限公司;

酶标仪:DNM-9606 型,北京普朗新技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 混合菌种混悬液制备 称取 200 g 发霉玉米,破碎后置于 500 mL 烧杯中,加入 20 mL 蒸馏水,用塑料袋封住烧杯口,室温条件下放置 14 d,待霉菌菌丝长出,取表面 10 g 发霉玉米,加入 30 mL 的蒸馏水,用涡旋振荡器振荡 5 min,经 3 层纱布过滤杂质,取 180 μL 的滤液沸水浴 5 min 后,加入 20 μL 的溶菌酶,在 37 ℃ 水浴 30 min。

1.2.2 目的基因的 TA 克隆与鉴定 以处理过的发霉玉米混合菌液为模板,利用表 1 中合成的引物(上游引物含 *Nco*I 酶切位点,下游引物含 *Bam*HI 酶切位点),55 ℃ 退火温度扩增 ADTZ 基因,琼脂糖凝胶电泳检测后,回收 PCR 产物。将回收的 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化到 *E. coli* DH5a 中,对重组菌进行培养,提取质粒命名 pGEM-Teasy-ADTZ,并用 *Nco*I、*Bam*HI 进行双酶切鉴定。序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 目的基因引物信息
Table 1 The primers of objective gene

引物名称	引物序列
ADTZ 基因序列上游引物	5'-TCCATGGATGGCCACCACAACCTGTC-3'
ADTZ 基因序列下游引物	5'-CGGATCCTCACAATCGTCTCTCAATG-3'

1.2.3 表达载体的构建与鉴定 分别对重组质粒 pGEM-Teasy-ADTZ、质粒 PMAL-c5x 用 *Nco*I、*Bam*HI 进行双酶切,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因片段。用 T₄ DNA 连接酶连接、转化到感受态细胞 *Rosetta* (DE3)中,涂板在培养皿上形成单菌落。挑取阳性克隆菌落,提取质粒,对重组质粒进行酶切和测序,将重组的质粒命名为 pMAL-c5x-ADTZ。

1.2.4 ADTZ 基因的诱导表达及分析 挑取含 pMAL-c5x-ADTZ 质粒的 *Rosetta* (DE3)菌落于含 10 mL 的 LB 培养基的大试管中,37 ℃,220 r/min 摇床过夜扩大培养;将培养的菌液按体积比 1:100 比例分别接种于 8 个装液 100 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中,添加 Amp (1 μg/mL)溶液,37 ℃,220 r/min 振荡培养约 2 h,当菌液 OD 值达到 0.6~0.8 时,在 4 个摇瓶中分别添加终浓度为 1 mmol/mL 的 IPTG,并将 4 个三角瓶分 2 组,2 瓶于 25 ℃,220 r/min 振荡诱导过夜;另 2 瓶于 37 ℃,220 r/min 振荡诱导 4 h。未加 IPTG 诱导培养的 4 个摇

瓶菌种按照同样的接种流程分别在 25,37 ℃ 培养。对所有菌液进行低温离心收集菌体和上清液,菌体进行超声波破碎,然后将破碎的菌体和上清液分别进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 ADTZ 粗酶液降解玉米 AFB₁ 试验

(1) 粗酶液的制备:将含 pMAL-c5x-ADTZ 质粒的 *Rosetta* (DE3)菌液活化,加入 IPTG,220 r/min,37 ℃ 诱导过夜培养;离心收集菌体,用 10 倍 PBS 缓冲液重悬超声波破碎后,即为粗酶液。

(2) 降解试验:称取 5 g 发霉玉米样品置于 25 mL 的小烧杯中,121 ℃ 灭菌 20 min。取 5 mL 的 ADTZ 粗酶液,加入到发霉的玉米样品中,搅拌均匀,在 37 ℃ 水浴锅中反应 48 h,在 65 ℃ 条件下烘干样品备测。对照组将 ADTZ 粗酶液煮沸灭活,同样操作,对照组和试验组各 3 个重复样品。

(3) 黄曲霉毒素检测:取样品 5 g,加入 60% 甲醇 25 mL 萃取 AFB₁;3 000 r/min 离心 10 min,取上清

1 mL 萃取液,再加入 4 mL 去离子水,稀释至甲醇浓度 12% 的待测液(样品共稀释 25 倍)。按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作方法测定样品 AFB₁ 的含量。按式(1)计算 AFB₁ 降解率。

$$d = \frac{c - t}{c} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

d ——降解率, %;

c ——对照组 AFB₁ 含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

t ——试验组 AFB₁ 含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 结果与分析

2.1 ADTZ 序列的克隆与序列分析

以发霉玉米提取的混合菌液为模板,对 ADTZ 序列进行 PCR 扩增,凝胶电泳结果显示成功扩出了大于 2 100 bp 大小目的条带,如图 1(a)泳道 1、2、3。将 PCR 扩增产物与 pGEM-Teasy 进行连接,提取重组质粒,命名为 pGEM-Teasy-ADTZ,对其进行 *Nco*I、*Bam*H I 双酶切鉴定,酶切后获得两条目的条带,其中一条约为 3 000 bp,另一条约为 2 100 bp,与 PCR 扩增结果和载体大小一致,如图 1(b)所示。将质粒进行测序,结果表明该基因片段大小为 2 088 bp,连续编码 695 个氨基酸。在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站上的 BLAST 比对,结果显示,该基因与 NCBI 网站公布报道的黄曲霉毒素分解酶基因(gene ID: AY941095.1)序列^[15]相似性达到 99%(见图 2),整个序列中有 3 处共 9 个碱基与已报道^[15]的黄曲霉基因碱基不同,说明已成功从发霉玉米混悬菌液中克隆得到黄曲霉毒素分解酶基因。

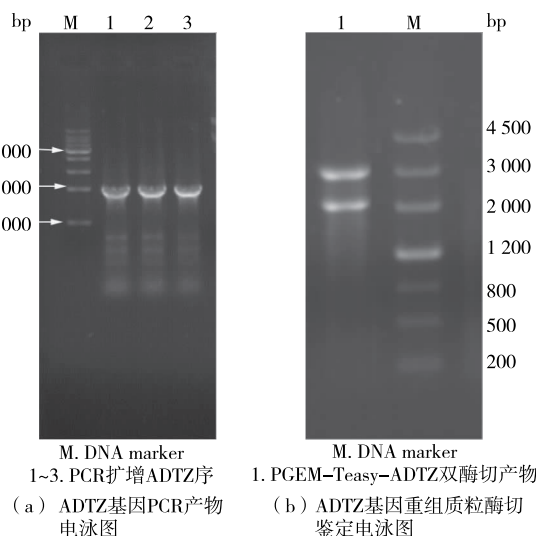
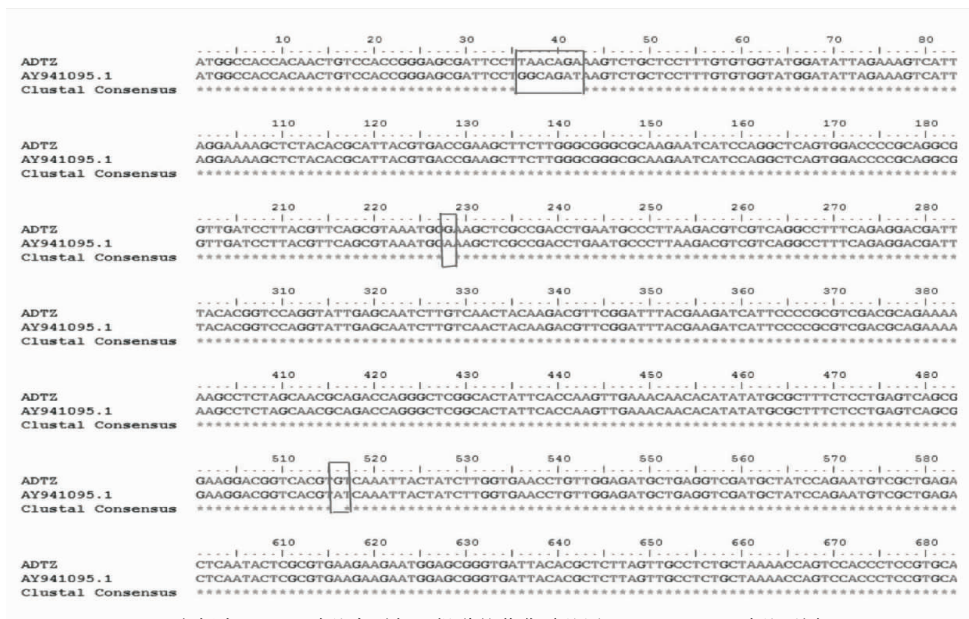


图 1 ADTZ 基因的 PCR 扩增和酶切鉴定

Figure 1 PCR amplification and identification of the ADTZ sequence

已知的 ADTZ 基因来源于真菌假密环菌(*Armillariella tabescens*)^[15],但也有报道^[9-12]表明,很多微生物具有降解黄曲霉毒素的能力。本试验中 ADTZ 基因,是从发霉玉米中提取的混合菌液中扩增得到,且与黄曲霉毒素分解酶(ADTZ)基因序列相似性达到 99%。结合李俊霞等^[16]从发霉饲料中筛选出两株降解 AFB₁ 菌株的试验结果,推测发霉玉米中不仅含有能够产生 AFT 的微生物,同时也具有能够降解黄曲霉毒素的微生物的存在。其可能为较高浓度的毒素作为一种选择压力,能够降解 AFT 菌株更容易生存。在模板不明确的条件,从混合



方框内 ADTZ 碱基序列与已报道的黄曲霉基因(AY941095.1)碱基不同

图 2 ADTZ 序列分析与比对

Figure 2 Analysis and alignment of ADTZ sequences

菌液中成功获得 ADTZ 基因,表明 PCR 探针能够有效地筛选出目的基因。与常规的 PCR 技术进行比较,利用菌液 PCR 技术筛选目的基因快速灵敏,成本较低,是获得目的基因片段的有效途径^[17]。

2.2 重组质粒 pMAL-c5x-ADTZ 的构建与鉴定

ADTZ 基因片段经 *Nco*I、*Bam*H I 双酶切后连接、转化,构建重组质粒 pMAL-c5x-ADTZ,该质粒的各序列结构图谱如图 3 所示。

挑取含有 pMAL-c5x-ADTZ 重组质粒的阳性菌,扩大培养后提质粒,用限制性内切酶 *Nco*I、*Bam*H I 双酶切鉴定,结果如图 4 所示。质粒酶切后获得两条 DNA 片段,其中一条与载体大小一致,约为 5 700 bp,另一条与 ADTZ 目的基因大小一致,约为 2 100 bp,表明目的基因成功连接到大肠杆菌表达载体上。

2.3 ADTZ 基因在大肠杆菌中的表达

将含有重组质粒 pMAL-c5x-ADTZ 的大肠杆菌 *Rosetta* (DE3)和宿主菌在 25, 37 °C 下培养,收集菌体和上清,对菌体破碎后进行聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),结果如图 5 所示。

由图 5 可知,在宿主大肠杆菌 *Rosetta* (DE3)菌体蛋白中未出现于目的蛋白大小相当的条带。在重组大肠杆

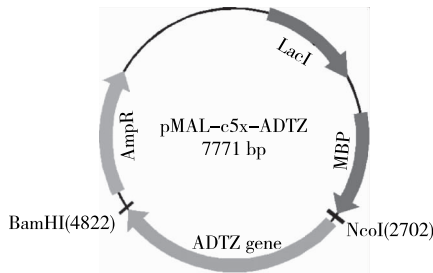
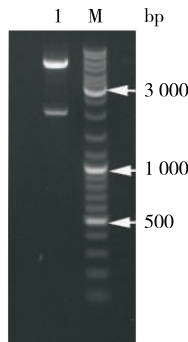


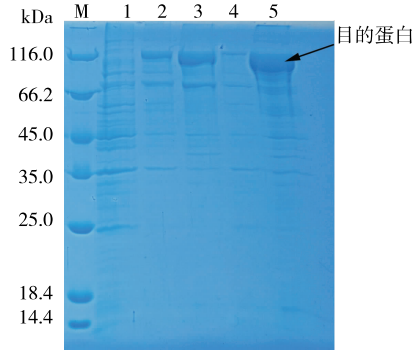
图 3 重组质粒 pMAL-c5x-ADTZ 模式图
Figure 3 Schematic diagram of the recombinant plasmid pMAL-c5x-ADTZ



DNA 分子量表从上到下依次为 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 200, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 bp

图 4 质粒 PMAL-c5x-ADTZ 的双酶切鉴定

Figure 4 Identification of plasmid PMAL-c5x-ADTZ by double digestion



M. Protein Marker 1. *Rosetta* (DE3)总蛋白 2. 25 °C 上清
3. 25 °C 沉淀 4. 37 °C 上清 5. 37 °C 沉淀

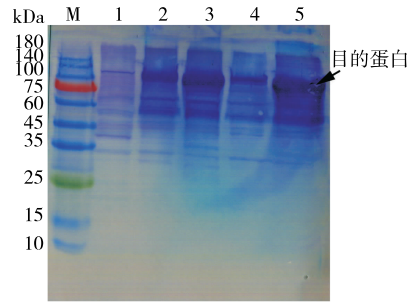
图 5 MBP-ADTZ 融合蛋白 SDS-PAGE 检测

Figure 5 MBP-ADTZ fusion protein SDS-PAGE detection

菌的上清液和菌体蛋白中(泳道 2~4)均可检测到分子量约 116 kDa 的蛋白条带,与 MBP 标签和 ADTZ 蛋白两者融合产生的蛋白分子量一致。其中菌体中的目的蛋白含量更多,37 °C 培养的细菌菌体中目的蛋白含量高于 25 °C 培养,而上清液中目的蛋白含量相反。

对重组大肠杆菌进行 IPTG 诱导表达结果如图 6 所示。宿主 *Rosetta* (DE3)诱导后无与目的蛋白大小一致的条带出现;而其他 4 条泳道均有大小与目标蛋白一致的蛋白条带,其规律未进行诱导的结果一致,表达的蛋白量高于未经诱导的菌株。进一步验证了 ADTZ 基因能够在大肠杆菌中与 MBP 标签进行了融合并表达,表达产物大部分在细胞内,受诱导物的诱导。

pMALTM 系统是一种高效的蛋白融合表达系统,其中 pMAL 载体含有编码麦芽糖结合蛋白(Maltose Binding Protein, MBP)的基因,其下游插入目的基因,可利用 MBP 标签对麦芽糖的特异性,结合实现融合蛋白的一步亲和纯化^[18]。其中 MBP 蛋白大小为 40 kDa,由大肠杆菌 K12 的 *malE* 基因编码,具有表达效率高、蛋白稳定、易于纯化等优点,能够协助新生的多肽链折叠,并组



M. 预染 Protein Marker 1. 诱导前总蛋白 2. 25 °C 上清
3. 25 °C 沉淀 4. 37 °C 上清 5. 37 °C 沉淀

图 6 MBP-ADTZ 诱导表达电泳图

Figure 6 Induced expression electrophoresis of MBP-ADTZ

装成稳定的有生物活性的结构^[19-20]。本试验正是利用该表达系统的特点,进行 ADTZ 基因的融合表达,并获得了具有生物活性的表达产物。验证了该系统的可靠性。

已报道^[16,21]来源于假密环菌(*Armillariella tabescens*)的 ADTZ 基因,编码合成的生物蛋白为假密环菌的胞内酶,具有降解 AFT 的能力,能独立完整地表达具有活性的 ADTZ 蛋白,并能够在大肠杆菌以及酵母菌(*Pichia pastoris*)中表达^[22-23]。温思霞等^[15]通过分子克隆技术,成功克隆并重组表达了一种具有 AFB₁ 转化功能的黄曲霉毒素氧化酶(Aflatoxin-oxidase, AFO),同时试验推测 ADTZ 酶可能存在于其他能够降解 AFT 的生物菌株中。本试验扩增的 ADTZ 基因与已有的报道,虽然同源性高达 99%,但存在 3 处碱基的突变,通过构建表达载体 pMAL-c5x 实现了黄曲霉毒素在大肠杆菌中的异源融合表达,表达产物具有生物活性,丰富了 AFB₁ 降解基因的种类。

2.4 AFDZ 表达产物对玉米 AFB₁ 的分解

为了验证 ADTZ 基因表达产物——黄曲霉毒素分解酶的酶活性,用其对发霉玉米的 AFB₁ 进行分解试验,结果如表 2 所示。对照组中 AFB₁ 测定结果平均值为 27.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$,试验组中 AFB₁ 的平均值为 6.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁ 平均降解率为 77.69%。表明,ADTZ 基因在大肠杆菌中的表达产物能够有效地降低天然发霉样品中的 AFB₁ 的含量,更进一步验证了 ADTZ 基因结构完整,能够实现异源表达,且表达产物具有生物学活性。

表 2 表达产物对玉米 AFB₁ 的降解结果

Table 2 Degradation of expressed products to maize AFB₁

样品	AFB ₁ 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		AFB ₁ 降解率/%
	对照组	试验组	
玉米样品 1	27.45	5.79	78.91
玉米样品 2	28.47	6.75	76.29
玉米样品 3	27.98	6.17	77.95
平均值	27.97	6.24	77.69

本试验中重组菌粗酶液对黄曲霉毒素的降解率为 77.69%,低于已报道的降解率(达到 80% 以上^[24-25])。分析其原因可能:本试验表达产物为融合蛋白,在降解功能上可能受到影响;本试验测定的降解率为天然发霉玉米种的 AFB₁,与标准品 AFB₁ 比较,天然样品的结构更复杂,降解其中的 AFB₁ 难度更高。

3 结论

采用 PCR 的方法成功从发霉玉米样品中扩增到黄曲霉毒素分解酶基因,通过序列分析与已报道^[15]的基因相似度达到 99%,说明黄曲霉毒素分解酶基因广泛存在于自然界的微生物菌种中,并丰富了黄曲霉毒素分解酶基因序列。通过构建表达载体实现了该基因在大肠杆菌

中的表达,表达产物表现出了分解黄曲霉毒素的能力,说明可以通过异源表达获得高纯度的黄曲霉毒素分解酶。本研究使用大肠杆菌表达系统进行基因表达,后续的研究将集中在该基因产物的分离纯化方面,以获得纯度较高的酶蛋白,并通过分子手段从基因水平对其进行改造以提高表达产物分解天然黄曲霉毒素的效果。

参考文献

- [1] REDDY K, SALLEH B, SAAD B, et al. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health[J]. Toxin Reviews, 2010, 29(1): 3-26.
- [2] 罗自生, 秦雨, 徐艳群, 等. 黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 250-257.
- [3] SINGH P, ORBACH M J, COTTY P J. Aspergillus texensis: A novel aflatoxin producer with S morphology from the united states[J]. Toxins, 2018, 10(12): 513-527.
- [4] RUSHING B R, SELIM M I. Aflatoxin B₁: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 124: 81-100.
- [5] 张焕, 王加启, 高亚男, 等. 霉菌毒素对畜禽的危害及其毒性降解研究进展[J]. 中国饲料, 2017(4): 12-16.
- [6] XIONG J L, WANG Y M, ZHOU H L, et al. Effects of dietary adsorbent on milk aflatoxin M₁ content and the health of lactating dairy cows exposed to long-term aflatoxin B₁ challenge[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(10): 8 944-8 953.
- [7] TULAYAKUL P, MINGKHWAN R, HANANANTACHAI H, et al. Heavy metal (Cd and Pb) and aflatoxin contamination in tissues and eggs from free grazing ducks and their environment in central thailand[J]. Biological Trace Element Research, 2018, 186(2): 514-520.
- [8] NABIZADEH S, SHARIATIFAR N, SHOKOOHI E, et al. Prevalence and probabilistic health risk assessment of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in Iranian edible oils[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2018, 25(35): 35 562-35 570.
- [9] 袁远, 张佩, 何鹏飞, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及在玉米贮藏中的应用[J]. 微生物学报, 2019, 59(2): 395-404.
- [10] 张舒月, 郑婧萱, 郭晓军, 等. 青贮用拮抗黄曲霉并降解黄曲霉毒素菌株的筛选与鉴定[J]. 中国饲料, 2018(3): 26-29.
- [11] QIU Yu-xin, WU Xi-yang, XIE Chun-fang, et al. A rational design for improving the trypsin resistance of aflatoxin-detoxifzyme (ADTZ) based on molecular structure evaluation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 86: 84-92.
- [12] CAO Hong, LIU Da-ling, MO Xue-mei, et al. A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B₁ conversion: Purification and ESI-MS/MS identification[J]. Microbiological Research, 2011, 166(6): 475-483.

(下转接第 50 页)

- 品质和肌原纤维蛋白特性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(2): 346-351.
- [10] 魏心如, 韩敏义, 王鹏, 等. 热处理对鸡胸肉剪切力与蒸煮损失的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 629-633.
- [11] 吴亮亮, 罗瑞明, 孔丰, 等. 蒸煮时间对滩羊肉蒸煮损失、嫩度及水分分布的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 19-23.
- [12] 涂黎明. 西式火腿加工方法[J]. 江西畜牧兽医杂志, 1991(2): 40-42.
- [13] 余德敏. 西式火腿加工工艺及其质量控制[J]. 肉类工业, 2007(2): 7-9.
- [14] 李增利. 西式火腿蒸煮温度和时间的确定[J]. 肉类工业, 1988(6): 20-22.
- [15] HUANG Feng, HUANG Ming, XU Xing-lian, et al. Influence of heat on protein degradation, ultrastructure and eating quality indicators of pork[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(3): 443-448.
- [16] COX R J, THOMPSON J M, CUNIAL C M, et al. The effect of degree of doneness of beef steaks on consumer acceptability of meals in restaurants[J]. Meat Science, 1997, 45(1): 75-85.
- [17] YEUNG H, EHLERS J D, WANISKA R D, et al. Rapid screening methods to evaluate cowpea cooking characteristics[J]. Field Crops Research, 2009, 112(2/3): 245-252.
- [18] 邓力. 烹饪过程动力学函数、优化模型及火候定义[J]. 农业工程学报, 2013, 29(4): 278-284.
- [19] 邓力. 中式烹饪热/质传递过程数学模型的构建[J]. 农业工程学报, 2013, 29(3): 285-292.
- [20] BOEKEL M A V. Kinetic modeling of food quality: A critical review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2010, 7(1): 144-158.
- [21] 黄万有, 刘书成, 吉宏武, 等. 超高压处理条件下的虾仁品质变化动力学[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 100-105.
- [22] 柴春祥, 杜利农. 动力学模型在鱼肉品质变化中的应用[J]. 食品工业科技, 2006, 27(1): 75-76.
- [23] 余冰妍, 邓力, 李文馨, 等. 猪里脊肉油传热过程中品质变化动力学研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 48-53.
- [24] 周厚源, 李汴生, 阮征, 等. 热处理过程鸡翅品质变化的动力学模型[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 68-75.
- [25] 钟金锋, 覃小丽, 郑炯. 竹笋热烫处理过程中颜色变化的动力学模型[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 101-105.
- [26] CHRISTENSEN L, ERTBJERG P, AASLYNG M D, et al. Effect of prolonged heat treatment from 48 °C to 63 °C on toughness, cooking loss and color of pork[J]. Meat Science, 2011, 88(2): 280-285.
- [27] RUBIO B, MARTÍNEZ B, GARCÍA-CACHÁN M D, et al. Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids[J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1 182-1 187.
- [28] 夏建新, 王海滨, 徐群英. 肌肉嫩度仪与质构仪对燕麦复合火腿肠测定的比较研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 145-149.
- [29] PURSLOW P P, ARCHILE-CONTRERAS A C, CHA M C. Meat science and muscle biology symposium: Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue[J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(3): 950-959.
- [30] HOPKINS D L, HEGARTY R S, WALKER P J, et al. Relationship between animal age, intramuscular fat, cooking loss, pH, shear force and eating quality of aged meat from sheep[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2006, 46(7): 879-884.

(上接第 30 页)

- [13] 计成, 赵丽红. 黄曲霉毒素生物降解的研究及前景展望[J]. 动物营养学报, 2010(2): 241-245.
- [14] 计成, 贾如, 赵丽红. 基因工程技术在黄曲霉毒素生物降解中的应用[J]. 中国农业科学, 2017(17): 3 422-3 428.
- [15] 温思霞, 管敏, 周涛, 等. 假蜜环菌黄曲霉毒素氧化酶的基因克隆、表达、纯化及酶学性质分析(英文)[J]. 微生物学报, 2011(9): 1 212-1 221.
- [16] 李俊霞, 梁志宏, 关舒, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌株的筛选及鉴定[J]. 中国农业科学, 2008(5): 1 459-1 463.
- [17] 郝爱平, 魏继承, 国会艳. 菌液浓度对 PCR 扩增的影响[J]. 北方园艺, 2012(3): 127-129.
- [18] 黄茜, 黄璐, 潘道东, 等. 重组融合蛋白 MBP-BSH 在大肠杆菌中的表达及其纯化、功能鉴定[J]. 食品科学, 2012(7): 198-203.
- [19] DIPPEL R, BOOS W. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: Metabolism and transport[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(24): 8 322-8 331.
- [20] RIGGS P. Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein[J]. Molecular Biotechnology, 2000, 15(1): 51-63.
- [21] LIU Da-ling, YAO Dong-sheng, LIANG Ren, et al. Detoxification of aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*[J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36(7): 563-574.
- [22] 左振宇, 刘大岭, 胡亚冬, 等. 密码子优化的重组黄曲霉毒素解毒酶(rADTZ)在毕氏酵母中组成型分泌表达的研究[J]. 中国农业科技导报, 2007(5): 87-94.
- [23] 胡熔, 刘大岭, 谢春芳, 等. 黄曲霉毒素解毒酶在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及其圆二色谱分析[J]. 中国生物工程杂志, 2011(4): 71-76.
- [24] 孙玲玉, 李超, 郝海玉, 等. 泰山枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对黄曲霉毒素 B₁ 的降解研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014(8): 246-250.
- [25] FARZANEH M, SHI Z Q, GHASSEMPOUR A, et al. Aflatoxin B₁ degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran[J]. Food Control, 2012, 23(1): 100-106.