

## 分解玉米赤霉烯酮菌株的分离、鉴定及其产酶特征

孙志轩<sup>1Δ</sup> 冼钰茵<sup>2Δ</sup> 孙纬华<sup>1</sup> 梁钟<sup>2</sup> 邵伟琪<sup>2</sup> 周妮<sup>1</sup> 尹晓菲<sup>2</sup>

杨舜莲<sup>2</sup> 梁郁强<sup>1,3</sup> 姚冬生<sup>1</sup> 刘大岭<sup>1,3\*</sup>

(1. 暨南大学 微生物技术研究所 广东 广州 510632)

(2. 暨南大学 理工学院 食品工程系 广东 广州 510632)

(3. 暨南大学 生物工程系 广东 广州 510632)

**摘要:**【目的】从发酵食品材料中筛选出对玉米赤霉烯酮(ZEN)有分解作用的微生物, 研究其分解效率及产酶特征并进行菌种鉴定。【方法】利用添加 ZEN 毒素类似物(PL)的固体培养基对 25 种发酵食品材料进行初筛, 获得毒素类似物耐受菌株, 经过用 ZEN 复筛, 得到高效分解 ZEN 的细菌。用高效液相色谱法(HPLC)分析培养物残留 ZEN, 评价菌株对 ZEN 的分解效率。初步分析该菌株产纤维素酶、木聚糖酶及 β-葡萄糖苷酶的特性。通过微生物形态学、分子生物学方法进行菌种鉴定, 确定该菌的系统分类学地位。【结果】从发酵食品材料中筛选出一株分解 ZEN 的菌株 BF-B-3, 经初步鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。其 ZEN 分解率达 62.48%, 测定该菌产纤维素酶、木聚糖酶及 β-葡萄糖苷酶活力分别为 160.38、84.51 和 4.14 U/mL。【结论】枯草芽孢杆菌属于饲用微生物, 生物安全性高, 所分离到的枯草芽孢杆菌疑似株(*Bacillus subtilis*) BF-B-3 菌株, 可作为具有分解 ZEN 功能的益生菌使用, 具有较好的应用前景。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮, 生物降解, 产酶特征, 枯草芽孢杆菌, 霉菌污染

## Isolation, identification of a zearalenone degraded strain and the properties of its producing enzymes

SUN Zhi-Xuan<sup>1Δ</sup> XIAN Yu-Yin<sup>2Δ</sup> SUN Wei-Hua<sup>1</sup> LIANG Zhong<sup>2</sup> SHAO Wei-Qi<sup>2</sup> ZHOU Ni<sup>1</sup>  
YIN Xiao-Fei<sup>2</sup> YANG Shun-Lian<sup>2</sup> LIANG Yu-Qiang<sup>1,3</sup> YAO Dong-Sheng<sup>1</sup> LIU Da-Ling<sup>1,3\*</sup>

(1. Institute of Microbial Biotechnology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(2. Department of Food Engineering, Institute of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(3. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

**Abstract: [Objective]** To screen and identify a microorganism with zearalenone (ZEN) detoxifica-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102801); 广东省科技攻关计划项目(No. 2012B020305002); 暨南大学“国家大学生创新性试验计划”项目(No. 101055926)

\*通讯作者: Tel: 86-20-85228422; ✉: tldl@jnu.edu.cn

Δ并列第一作者

收稿日期: 2013-09-03; 接受日期: 2013-11-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

tion ability from fermented foods, and determine its decomposing efficiency and the properties of producing enzymes. **[Methods]** Solid media with toxin analogue (PL) were used to obtain toxin analogue resistant strains from 25 materials of fermented foods. Through the second screening of ZEN as the selective stress, a ZEN detoxified microorganism with high decomposition efficiency was confirmed. Its degradation efficiency was further evaluated in analysis of ZEN residue of bacteria suspension using high performance liquid chromatography (HPLC). Then we analysed the properties of producing cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase separately. The strain was identified for the taxonomical position using morphological observation and molecular identification. **[Results]** A ZEN detoxified strain BF-B-3 was screened and identified as *Bacillus subtilis*. Its degradation rate reached 62.48%. The cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activity of *Bacillus subtilis* BF-B-3 reached 160.38 U/mL, 84.51 U/mL and 4.14 U/mL separately. **[Conclusion]** *Bacillus subtilis* is a kind of feed microorganism. *Bacillus subtilis* BF-B-3 has favorable security for detoxifying ZEN, and could grow under different carbon sources. *Bacillus subtilis* BF-B-3 has potential values for preventing mould pollution of crops and feed.

**Keywords:** Zearalenone, Biodegradation, Enzyme production properties, *Bacillus subtilis*, Mold contamination

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN), 是一种酚的二羟基苯酸的內酯结构, 因 ZEN 与雌二醇结构相似, 又称 F-2 毒素<sup>[1]</sup>, 是由镰刀菌属在次级代谢过程中产生的一种较强的雌激素类毒素, 在人和动物体内积累可诱发一系列雌激素效应症状, 包括影响雌性哺乳动物乳房发育、外阴阴道炎、发情周期紊乱、假孕不孕、流产、死胎畸胎等。此外有研究证实玉米赤霉烯酮还有遗传毒性、细胞毒性、免疫毒性、致肿瘤毒性<sup>[2-6]</sup>, 是一种世界范围污染最广泛的霉菌毒素<sup>[1]</sup>。研究显示玉米赤霉烯酮常与黄曲霉毒素、伏马菌素、呕吐毒素、赭曲霉毒素等多种毒素共同存在于谷物和农副产品中<sup>[7-8]</sup>, 严重影响人类和动物的健康。王金勇等<sup>[9-10]</sup>调查结果显示, 2012 年上半年, 在检测 421 份来自全国各地的玉米、猪料、禽料等样品中, ZEN 的阳性检出率均高于 60%, 最高浓度均高于 2 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 平均水平也均远远大于中国《粮食卫生标准》(GB2715-2005)<sup>[11]</sup>规定的小麦和玉米中 ZEN 的限量(60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。

目前, 应用于防 ZEN 污染的方法主要有物理法、化学法和生物法。传统的物理法和化学法对 ZEN 的脱毒, 效果不稳定、易出现影响饲料营养等缺点。相比而言, 采用生物法去除 ZEN 毒素因

其具有安全、专一、高效等优点, 已成为更具应用前景的研究方向。国内外对微生物降解玉米赤霉烯酮的研究较为透彻的是 Hideaki Kakeya 等<sup>[12]</sup>(2002) 分离到的粉红粘帚霉(*Clonostachys Rosea* IFO7063) 菌株, 该菌株通过分泌一种內酯水解酶破坏 ZEN 结构中的內酯环, 将其转化为无雌激素活性产物, 该酶的基因克隆及转基因的相关研究均取得了一定的进展<sup>[13-15]</sup>。Yu 等<sup>[16]</sup>(2011)分离到一株不动杆菌属(*Acinetobacter* sp. SM04)菌株, 研究发现 SM04 可降解 ZEN 为低雌激素活性产物, 并确定了与降解有关的 Thioredoxin 过氧化物还原酶(Prx), 该酶基因在大肠杆菌中被克隆并表达, Prx 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在条件下可有效降解 ZEN<sup>[17]</sup>。Abdulla D. A. 等<sup>[18]</sup>从恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putid*)中克隆编码出玉米赤霉烯酮降解酶。此外, 有报道藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、毛孢酵母菌(*Trichosporon mycotoxinivorans*)等具有降解 ZEN 能力<sup>[19-20]</sup>。

传统的发酵食品最早应用于食品保藏, 发酵过程中可以抑制多数病原菌、霉菌的生长繁殖, 达到促进自然保护、防腐、延长食品保存期的目的, 是一种保证食品安全性的古老手段。因此, 本研究以传统发酵食品为实验材料, 从发酵微生物中筛选出

对 ZEN 有分解作用的微生物,分析确定分解 ZEN 菌株的系统分类学地位,对其产酶特征和分解效率进行评价,鉴定该微生物并最终确定其系统分类学地位,为寻找具有高效降解 ZEN 和具有益生功能的安全微生物,对开发可供动物饲养应用的微生物降解 ZEN 方法具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 样品采集:本研究以产自广州、佛山、阳江、珠海、肇庆、潮州、重庆、茂名等地的 25 种传统发酵食品为实验材料。

1.1.2 培养基:营养琼脂(NA)培养基(g/L):蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0,牛肉膏 3.0,琼脂 15.0;马铃薯葡萄糖(PDA)培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,固体培养基加 1.5%琼脂;

1.1.3 主要试剂:玉米赤霉烯酮类似物(PL, Sigma-Aldrich),玉米赤霉烯酮(Sigma-Aldrich),羧甲基纤维素钠(CMC,上海生工),刚果红(上海生工),木聚糖(上海生工),柠檬酸铁(上海生工),七叶苷(上海生工)。

### 1.2 方 法

1.2.1 ZEN 分解菌株的初筛:称取 10 g 实验材料经研碎、加水振荡制成样品悬液。取 1 mL 样品悬液加入营养琼脂培养基(含 PL 浓度为 10 g/L),凝固后,在 37 °C 倒置培养 24 h;取 1 mL 样品悬液加入马铃薯葡萄糖琼脂培养基(含 PL 浓度为 10 g/L)上,凝固后,28 °C 倒置培养 72-120 h,筛选 ZEN 类似物(PL)耐受菌株。

1.2.2 ZEN 分解菌株的复筛:第一步,挑取 1.2.1 中生长良好的单菌落分别接种于 LB 培养基(含 ZEN 浓度为 10 mg/L)和马铃薯葡萄糖培养基(含 ZEN 浓度为 10 mg/L),分别在 37 °C、180 r/min 培养 24 h;28 °C、150 r/min 培养 3 d 后,分别取菌悬液 1 mL 制备 TLC 检测样品,对培养液中 ZEN 残留进行 TLC 检测。第二步,选择 10  $\mu$ L 检测液点样荧光点完全消失所对应的菌株,在含 ZEN 20 mg/L 的培养基中培养,以相同的方法检测样品,通过观察样品的荧

光亮度确定各个菌株对玉米赤霉烯酮分解能力的相对大小,确认具有分解 ZEN 作用的菌株。

TLC 检测参照 AOAC Official Method 976.22<sup>[21]</sup>:菌悬液经氯仿萃取 3 次,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水,获得含残留 ZEN 的 TLC 检测样品,在经活化的硅胶板上点样,经展开剂(CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH=95:5,体积比)展开,干燥,在 365 nm 紫外光<sup>[22]</sup>下,观察蓝色荧光变化。第一步中检测样品的点样量分别为 10、15、20  $\mu$ L 3 个梯度;第二步中检测样品的点样量分别为 10、15、20、25、30、35  $\mu$ L 6 个梯度。

1.2.3 ZEN 分解菌株分解效率的评价:取 1.2.2 中第二步的培养菌液,制备检测样品,取 1 mL 检测样品挥发干燥,加入 1 mL 甲醇振荡,0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,得到待测样品,通过 HPLC<sup>[23-24]</sup>定量检测残留 ZEN。色谱条件: COSMOSIL 5C18-MS II 型色谱柱,流动相:甲醇:水=65:35(体积比),流速:1 mL/min,柱温:30 °C,RF-10AXL 荧光检测器: $\lambda_{ex}$ =274 nm, $\lambda_{em}$ =440 nm。空白对照:含 ZEN 终浓度 20 mg/L 的培养基,其他处理相同。

1.2.4 ZEN 分解菌株产酶特征分析:将 ZEN 分解菌菌液稀释后分别涂布于含 1% CMC 的 NA 培养基、1%木聚糖的 NA 培养基、0.25%柠檬酸铁-1%七叶苷的 NA 培养基上,37 °C 倒置培养 48 h。取 CMC 培养基、木聚糖培养基用刚果红染色 30 min 后,1 mol/L NaCl 脱色,观察水解圈确定其产纤维素酶和木聚糖酶活性<sup>[25]</sup>;观察柠檬酸铁-七叶苷培养基黑色特征圈确定其产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性<sup>[26]</sup>。

ZEN 分解菌在 NA 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 24 h 后,菌悬液离心,上清液即为待测酶液。按照《微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求 NY/T 1847-2010》<sup>[27]</sup>所述方法测定纤维素酶活力和木聚糖活力。 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定以 1%的 D-水杨苷为底物代替滤纸,其他同纤维素酶活测定。酶活单位的定义:参照文献<sup>[27]</sup>,以 U/mL 表示。

1.2.5 菌株鉴定:形态学观察:将最终筛选得到的 ZEN 分解菌株划线接种于 LB 固体培养基,37 °C 倒

置培养 24 h, 观察菌落形态; 挑取菌体进行革兰氏染色, 观察菌体形态。分子生物学鉴定: CTAB 法<sup>[28]</sup>提取菌株基因组总 DNA。16S rRNA 基因 PCR 扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), 由生工生物工程(上海)有限公司合成。经 PCR 扩增得 16S rRNA 基因产物纯化后送交华大基因公司测序。测序结果与 NCBI 中的 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析序列同源性<sup>[29]</sup>, 应用 MEGA 4.0 软件包<sup>[30]</sup>, 采用邻位连接法(Neighbour-Joining)进行系统发育树的构建和系统发育关系分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZEN 分解菌株的初筛

经含 ZEN 类似物 PL 浓度 10 g/L 的培养基初筛, 获得 20 个菌株(表 1)。

### 2.2 ZEN 分解菌株的复筛

20 个菌株经第一步 TLC 检测确认筛选得到 10  $\mu$ L 检测液点样荧光完全消失的菌株 5 个。再经第二步的确认筛选, 最终得到 BF-B-3 为 ZEN 分解能力相对较强的菌株(表 2)。

### 2.3 ZEN 分解菌株分解效率的评价

HPLC 分析, ZEN 保留时间为 9.54 min, ZEN

在 0.5–25.0  $\mu$ g/L 浓度范围内线性良好, 经 HPLC 检测分析 ZEN 残留量, 结果表明: BF-B-3 ZEN 分解率[实验组/(标准品-空白对照) $\times$ 100%]达到 62.48% (图 1)。

### 2.4 ZEN 分解菌株产酶特征分析

BF-B-3 菌株产纤维素酶活性观察: 经羧甲基纤维素钠培养基培养后, 刚果红染色结果, 水解圈非常明显, 水解圈直径:菌落直径约为 1:1 (图 2A)。产木聚糖酶活性观察: 经木聚糖培养基培养后, 刚果红染色结果, 水解圈较为明显, 水解圈直径:菌落直径约为 2:5 (图 2B)。产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性观察: 经柠檬酸铁-七叶苷培养基培养后, 结果显示有明显黑色特征圈(图 2C)。结果表明, BF-B-3 菌株具有分泌纤维素酶、木聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的功能。

经测定得到 BF-B-3 菌株在培养 24 h 后, 产纤维素酶、木聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力依次为 160.38、84.51 和 4.14 U/mL。结果表明: BF-B-3 菌株具有相对高产纤维素酶及木聚糖酶活性, 具有一定程度的产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性。

### 2.5 菌种鉴定

形态学观察结果: 菌落呈枯草状, 圆形或不规则, 浊白色, 扁平, 有褶皱, 边缘不完整, 菌体为短棒状, 大小为(0.7–0.9)  $\mu$ m $\times$ (2.0–3.0)  $\mu$ m, 革兰氏

表 1 PL 耐受菌株筛选结果  
Table 1 The results of PL tolerant strains

菌株编号 Strain number	菌株来源 Origin	菌液浑浊度 Turbidity of bacteria liquid	菌株编号 Strain number	菌株来源 Origin	菌液浑浊度 Turbidity of bacteria liquid
PL-B-44	酸菜	+++	BF-B-39	萝卜干	++
PL-B-51	梅菜	++++	BF-B-40	水豆豉	++
PL-B-53	白萝卜干	+++	BF-B-41	水豆豉	++
PL-B-59	菜头 II	++++	BF-B-43	豆瓣酱	+++
PL-B-66	酒粉	+++	BF-B-44	豆瓣酱	++
PL-M-27	酒粉	++++	BF-B-45	酒粉	+++
PL-M-28	泡椒	+++++	BF-B-13	菜头 I	++
PL-M-29	泡椒	++++	BF-B-17	茂名豆豉	+++
PL-M-30	泡椒	+++	BF-B-3	霉豆	+++
PL-M-31	黄皮	+++	BF-B-34	腐乳	+++

注: 菌液浑浊度以“+”表示, “+”越多表明菌液越浑浊, 菌种的生长能力越强。

Note: “+” showed the turbidity of bacteria liquid; The more the number of “+” indicate increases in turbidity, that is, the stronger vitality the strains grewed.

表 2 ZEN 分解菌株 TLC 复筛检测结果  
Table 2 The TLC results of strains resist ZEN

菌株编号 Strain number	不同点样量荧光强度 Fluorescence intensity of different sample amount (μL)								
	第一步筛选 The first step screening			第二步筛选 The second step screening					
	5	10	20	10	15	20	25	30	35
	PL-B-66	-	-	-	+	++	+++	++++	+++++
BF-B-34	-	+	++	+	++	+++	++++	+++++	+++++
BF-B-3	-	+	++	-	+	++	+++	++++	+++++
PL-M-29	-	-	-	+	++	+++	++++	+++++	+++++

注: - : 荧光完全消失; + : 肉眼可见荧光; +多少: 荧光亮度强弱。

Note: - : Fluorescent point disappearing entirely. + : Visible fluorescence; The amount of "+" showed the degree of fluorescent brightness.

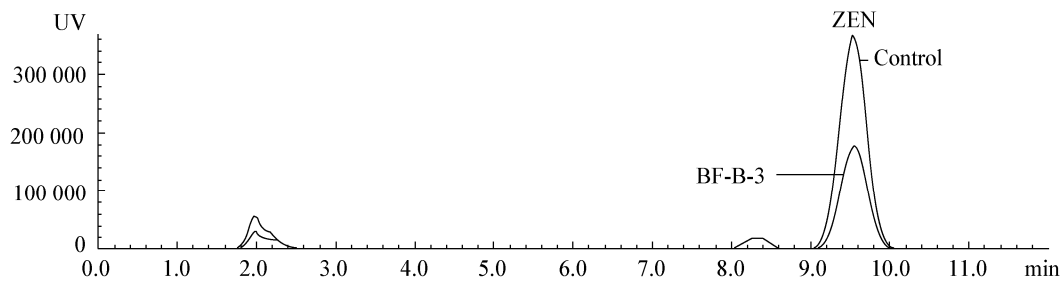


图 1 BF-B-3 菌株 ZEN 分解率的 HPLC 分析

Figure 1 The effects of BF-B-3 strain detoxified ZEN by HPLC analysis

注: 线性方程:  $y=502\ 219x-86\ 763$ ,  $R^2=0.993\ 1$ ; 回收率: 93.61%。

Note: Linear equation:  $y=502\ 219x-86\ 763$ ,  $R^2=0.993\ 1$ ; Recovery: 93.61%.

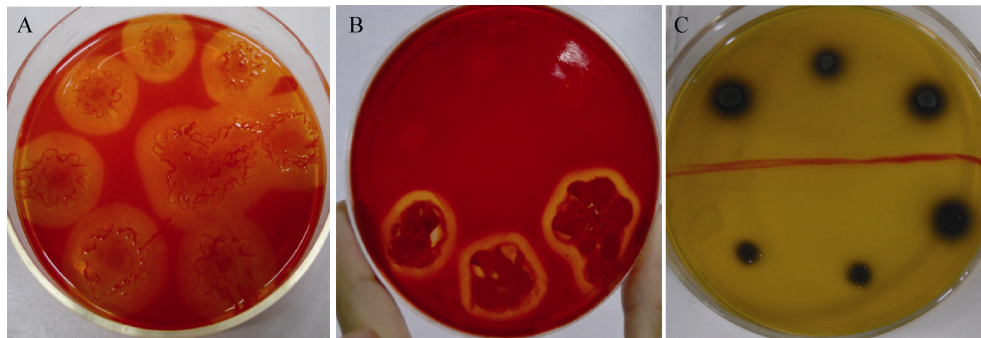


图 2 BF-B-3 菌产酶特征结果

Figure 2 The result of BF-B-3 producing enzymes

注: A: 羧甲基纤维素钠刚果红染色; B: 木聚糖刚果红染色结果; C: 水解七叶苷结果。

Note: A: The result of hydrolyzing CMC by congo red staining; B: The result of hydrolyzing xylan by congo red staining; C: The result of hydrolyzing aesculin.

阳性; 芽孢大小为  $0.5\ \mu\text{m}\times(1.0-1.5)\ \mu\text{m}$ , 椭圆形或柱状, 中生或次端生, 孢囊不明显膨大。分子生物学鉴定结果: 以通用引物为模板通过 PCR 扩增得到 16S rRNA 基因序列, 测序大小为 1 514 bp, GenBank 数据库登录号为 KF512668。将 BF-B-3 菌株序列在

NCBI GenBank 数据库 BLAST 比对, 结果显示: 其与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和空气芽孢杆菌(*Bacillus aerius*)一致性均高达 99%, 根据系统发育学分析结果(图 3), BF-B-3 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)

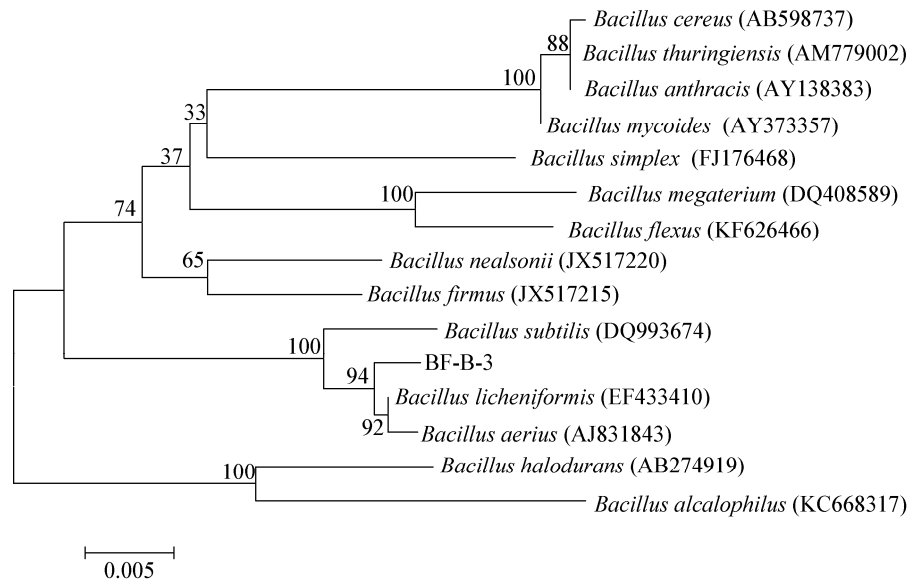


图3 基于16S rRNA基因构建的BF-B-3菌株临近连接法系统进化树

Figure 3 Neighbour-Joining phylogenetic tree of strain BF-B-3 based on 16S rRNA gene sequences

Note: Numbers in parentheses represent GenBank ID of the sequences. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.005 represents sequence divergence.

Bootstrap 为 100%，结合形态学特征分析<sup>[31]</sup>，初步鉴定 BF-B-3 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

### 3 讨论

本研究以 ZEN 类似物及 ZEN 为筛选压力，从传统发酵食品材料中筛选并初步鉴定的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BF-B-3 具有降解 ZEN 能力。近年来，益生菌和酶作为饲料生物降解添加剂，高效安全降解霉菌毒素已成为饲养中广泛使用的方法。中国农业部 2008 年批准使用的饲料微生物有 16 种(农业部 1126 号公告)，其中枯草芽孢杆菌被列入。而且，饲用菌株的益生功能与其分泌的分解纤维素和半纤维素的功能密切相关，经测定 BF-B-3 菌株具有分泌分解纤维素和半纤维素的能力，将 BF-B-3 菌株应用于饲料添加剂，可有效提高饲料营养价值及利用率。因此，BF-B-3 菌株可作为具有分解 ZEN 功能的益生菌使用，具有较好的应用前景。本研究下一步将从 BF-B-3 菌株分解 ZEN 条件的研究，代谢产物毒性分析，以及 BF-B-3 菌株纤维素酶、木聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质研究着手，为 BF-B-3 菌株应用于饲料生物降解

添加剂提供更有力的依据。

### 参考文献

- [1] Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): 1-18.
- [2] Zaki MM, EI-Midany SA, Shaheen HM, et al. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 2012, 4(1): 13-28.
- [3] 熊凯华, 程波财, 胡威, 等. 玉米赤霉烯酮降解的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 138-141.
- [4] 姜淑贞, 杨维仁, 杨在宾. 玉米赤霉烯酮的代谢、毒性及其预防措施[J]. 动物营养学报, 2011, 23(2): 196-202.
- [5] Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, et al. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes[J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2004, 557(1): 19-27.
- [6] 余增丽, 张立实, 吴德生. 玉米赤霉烯酮对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和凋亡的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(5): 328-331.
- [7] Placinta CM, D'Amico Mello JPF, Macdonald AMC. 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.
- [8] Borutova R, Aragon YA, Nährer K, et al. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in

- feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 178(3/4): 190-197.
- [9] 王金勇, 刘颖莉. 2012年上半年中国饲料和原料霉菌毒素污染情况调查报告[J]. *饲料工业*, 2012, 33(22): 40-43.
- [10] 张建梅, 陈静, 汪官保, 等. 玉米赤霉烯酮的污染状况及生物脱毒研究进展[A]//王文娟. 2012首届饲料脱霉技术研讨会暨霉菌毒素吸附剂大会论文集[C]. 北京: 中国农业科学院《饲料与畜牧-新饲料》杂志社, 2012: 37-39.
- [11] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准管理委员会. GB 2715-2005 粮食卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [12] Hideaki K, Naoko TA, Makoto K, et al. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp.[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(12): 2723-2726.
- [13] Makoto K, Naoko TA, Takumi N, et al. Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006, 86(3): 117-123.
- [14] Naoko TA, Shuichi O, Takehiko S, et al. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3239-3245.
- [15] Tomoko I, Naoko TA, Noriyuki O, et al. Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1622-1629.
- [16] Yu YS, Qiu LP, Wu H, et al. Degradation of zearalenone by the extracellular extracts of *Acinetobacter* sp. SM04 liquid cultures[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(3): 613-622.
- [17] Yu YS, Wu H, Tang YQ, et al. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification[J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(3): 121-126.
- [18] Altalhi AD, El-Deeb B. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161(2/3): 1166-1172.
- [19] 饶正华, 李兰, 苏晓鸥. 玉米赤霉烯酮解脱毒技术研究进展及发展趋势[J]. *饲料工业*, 2010, 31(22): 58-61.
- [20] 龙淼, 李鹏, 朱连勤, 等. 微生物降解玉米赤霉烯酮毒素及其机制[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(11): 116-119.
- [21] Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 976.22-1995. Zearalenone in corn, thin layer chromatographic method. AOAC Official Method of Analysis[S]. Gaithersburg, USA: AOAC International, 1995.
- [22] Schaafsma AW, Nicol RW, Savard ME, et al. Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography[J]. *Mycopathologia*, 1998, 142(2): 107-113.
- [23] Ostry V, Skarkova J. A HPTLC method for the determination of the mycotoxin zearalenone in cereal products[J]. *Mycotoxin Research*, 2003, 19(1): 64-68.
- [24] 朱孟丽, 彭聪, 洪振涛. 高效液相色谱法对饲料中玉米赤霉烯酮的测定[J]. *饲料工业*, 2007, 28(1): 37-38.
- [25] Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(4): 777-780.
- [26] Eberhart B, Cross DF, Chase LR.  $\beta$ -Glucosidase system of *Neurospora crassa*-I.  $\beta$ -glucosidase and cellulase activities of mutant and wild-type strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 1964, 87(4): 761-770.
- [27] 中华人民共和国农业部, 中华人民共和国农业部种植业管理司. NY/T 1847-2010. 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [28] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(2): 208-218.
- [29] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 2007, 57(10): 2259-2261.
- [30] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [31] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 59-65.