

# 一株高效降解菜籽饼粕中硫苷的枯草芽孢杆菌 基因组鉴定及功能分析

熊川<sup>1</sup>, 罗强<sup>2</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 金鑫<sup>1</sup>, 张娟<sup>3</sup>, 张利<sup>4</sup>, 朱宇<sup>1</sup>

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610061; 2. 重庆医科大学附属第二医院  
感染病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400010; 3. 四川省农业科学院茶叶研究所,  
成都 610066; 4. 四川省阿坝州林业和草原科学技术研究所, 四川 汶川 623000)

**摘要:**为筛选可高效降解菜籽饼粕中硫苷的细菌, 给硫苷降解基因工程菌的构建提供实验数据, 以堆放菜籽饼粕的土壤为分离源, 通过硫苷选择培养基筛选及硫苷降解率测定, 获得一株硫苷降解率最大的菌株 C1, 采用 16S rRNA 基因序列进行种属鉴定, 通过第 3 代 Illumina NovaSeq PE150 测序, 获得其基因组完成图并进行功能注释, 借助比较基因组学探究 C1 降解硫苷的机制。结果表明: 菌株 C1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 其硫苷降解率为  $(68.98 \pm 4.74)\%$ ; C1 菌株的基因组染色体全长为 4 139 381 bp, 鸟嘌呤和胞嘧啶含量为 43.88%, 编码区总长度占全基因组的比例为 89.14%; C1 菌株能编码大量的功能蛋白, 主要涉及氨基酸转运与代谢; 比较基因组学分析确认, C1 与枯草芽孢杆菌的模式菌株 (NC000964.3) 共线性高, 序列中未见大片段易位和倒置的区域, 但 C1 序列中 2.7 Mb 处出现一个小片段的插入, 2.1~2.4 Mb 处出现小片段缺失, 分别涵盖了 2 条黑芥子酶的相关基因, 推测 C1 的硫苷降解机制为其可高效分泌黑芥子酶。C1 菌株能够高效降解菜籽饼粕中的硫苷, 是构建硫苷降解基因工程菌的可选材料。

**关键词:**菜籽饼粕; 硫苷; 比较基因组学; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q939.96; Q935 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)10-0096-07

## Genome identification and functional analysis of a *Bacillus subtilis* strain efficiently degrading glucosinolates in rapeseed meal

XIONG Chuan<sup>1</sup>, LUO Qiang<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, JIN Xin<sup>1</sup>,  
ZHANG Juan<sup>3</sup>, ZHANG Li<sup>4</sup>, ZHU Yu<sup>1</sup>

(1. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Tea Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; 4. Institute of Forestry and Grassland Science and Technology of Aba Prefecture, Sichuan Province, Wenchuan 623000, Sichuan, China)

**Abstract:** In order to screen bacteria that can efficiently degrade glucosinolates in rapeseed meal and provide experimental data for the construction of glucosinolate-degrading genetically engineered bacteria, the soil stacked with rapeseed meal was used as the separation source, and a strain C1 with the greatest glucosinolate degradation rate was obtained by glucosinolate selection medium screening and

glucosinolate degradation rate determination, and 16S rRNA gene sequence was used for C1 species identification and the third generation Illumina NovaSeq PE150 was used to sequencing the whole genome to obtain C1 genome completion map and functional annotation was carried out. The

收稿日期: 2021-08-20; 修回日期: 2022-04-26

基金项目: 四川省农业科学院现代农业学科建设推进工程项目 (2021XKJS060)

作者简介: 熊川 (1990), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术 (E-mail) xiongchuan1234@126.com。

通信作者: 朱宇, 研究员 (E-mail) zhuyusc@126.com。

comparative genomics was used to explore the mechanism for glucosinolate degradation of strain C1. The results showed that strain C1 was *Bacillus subtilis*, and its glucosinolate degradation rate was  $(68.98 \pm 4.74)\%$ . The genome chromosome of the strain C1 was 4 139 381 bp in length, and the guanine and cytosine content was 43.88%. The total length of the coding region accounted for 89.14% of the whole genome. Strain C1 could encode a large number of functional proteins, mainly related to amino acid transport and metabolism. Comparative genomics analysis confirmed that C1 was highly colinear with the model strain of *Bacillus subtilis* (NC000964.3), and there were no large fragment translocation and inversion regions in the sequence. However, a small fragment insertion was found at 2.7 Mb in C1 sequence, and a small fragment deletion appeared at 2.1 – 2.4 Mb, covering two gens of myrosinase, respectively, and the mechanism of glucosinolate degradation of C1 was presumed to efficiently secrete myrosinase. Strain C1 can efficiently degrade glucosinolates in rapeseed meal and is a potential material for constructing glucosinolate – degrading genetically engineered bacteria.

**Key words:** rapeseed meal; glucosinolates; comparative genomics; *Bacillus subtilis*

油菜籽经浸提或压榨后会产生大量的菜籽饼粕。相关研究证实,菜籽饼粕营养丰富,富含碳水化合物、脂质、蛋白质、矿物质和维生素<sup>[1]</sup>。此外,菜籽饼粕氨基酸分布平衡,含有丰富的含硫氨基酸及一定量的赖氨酸,氨基酸组成接近世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)的推荐值,是一种优良的天然植物蛋白资源<sup>[2]</sup>。但是,菜籽饼粕中存在硫苷等抗营养因子,直接作为饲料应用,会对动物肝、肾等器官产生毒害作用,影响其饲用安全性和适口性,导致其饲用受到严重制约<sup>[3-4]</sup>。因此,如何高效降解菜籽饼粕中的硫苷,是一个亟待解决的问题。

为了降解菜籽饼粕中的抗营养因子,相关学者进行了大量的研究,物理、化学及微生物脱毒法都有相关报道<sup>[5]</sup>。相较于物理脱毒或化学脱毒,微生物脱毒法具有反应条件温和、硫苷降解彻底且能提高菜籽饼粕中蛋白质含量等优点<sup>[6-8]</sup>。微生物脱毒法一般通过微生物发酵进行,常用的微生物是丝状真菌和细菌,包括枯草芽孢杆菌、植物乳酸菌和霉菌等<sup>[9]</sup>。目前,对于微生物发酵菜籽饼粕技术的研究仍存在一些问题,如菌株遗传稳定性差、降解率不高、规模化发酵生产不稳定等<sup>[10]</sup>。因此,筛选高效硫苷降解菌株,从基因组层面分析并改造,获得硫苷降解效率高、遗传性质稳定的微生物资源,对粮油产业的发展大有裨益。

土壤是天然的微生物培养基,从土壤中可以分离到多种功能的微生物,而堆放了菜籽饼粕的土壤,很有可能自然筛选出能够利用菜籽饼粕的微生物。基于此,本文从堆放菜籽饼粕的土壤中分离筛选具有硫苷降解能力的菌株,通过第三代测序技术获得其全基因组完成图并进行序列分析,通过比较基因

组学探讨其硫苷降解机制,从基因组水平解析影响微生物硫苷降解率的因素,为硫苷降解基因工程菌的构建提供数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

菜籽饼,分别采集自成都市邛崃市新兴粮油公司(YD-1)、成都市新都区农业装备示范农场(YD-2)、乐山市沙湾区牛石镇菜籽油加工厂(LS-1),样品37℃恒温干燥,研磨后过0.150 mm(100目)筛,备用。土壤样品采集自成都市新都区农业装备示范农场堆放菜籽饼粕的表层土壤(1~6 cm),每份样本采集200 g,装入无菌采样袋,低温保存。

氯化钡,纯度99%,上海麦克林生化科技有限公司;羧甲基纤维素钠,成都市科隆化学品有限公司;琼脂粉、蛋白胨,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

Microfuge 20R 高速离心机,德国 Beckman 公司;SpectraMax L 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;BS124S 型电子天平,美国 Sartorius 公司;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;THZ-98AB 恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;S1000 Thermal Cycler PCR 仪、Mini-Sub 小型水平电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像仪,美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 硫苷选择培养基的配制

粗硫苷提取液配制<sup>[11]</sup>。取干燥过筛后的菜籽饼100 g,加入蒸馏水900 mL,煮沸15 min,期间不断用玻璃棒搅拌,然后用4层纱布过滤,收集滤液,滤液以5 000 r/min 离心10 min 去除杂质,定容到

1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 得粗硫苷提取液, 备用。

在传统的 LB 培养基的基础上用菜籽饼粗硫苷提取液替换酵母提取物, 配制硫苷选择培养基。称取 10 g 蛋白胨、10 g NaCl、15 g 琼脂, 然后加入 100 mL 粗硫苷提取液, 搅拌溶解, 最后加入蒸馏水定容至 1 000 mL, 待用。

### 1.2.2 硫苷降解菌的筛选与鉴定

称取土壤样本 1 g, 置于无菌研钵中研磨均匀, 加入 5 mL 无菌水, 振荡混匀后以 4 000 r/min 离心, 收集上清液。取 0.5 mL 上清液, 均匀涂布于硫苷选择培养基上, 35 °C 恒温培养箱中培养 48 h。收集平板上长出的菌落, 测定其硫苷降解率。再将硫苷降解率最高的菌株送成都擎科生物公司进行 16S rRNA 的检测, 在美国国家生物信息中心 (NCBI) 中搜索相似程度高 (相似度  $\geq 98\%$ ) 的序列, 采用邻位相连 (Neighbour - Joining, N - J) 法做序列进化分析, 并完成菌种鉴定<sup>[12]</sup>。

### 1.2.3 硫苷降解率测定

#### 1.2.3.1 发酵培养

将分离得到的硫苷降解菌制备成菌悬液, 取 100  $\mu$ L 菌悬液接种于 10 mL 粗硫苷提取液中, 于 35 °C 振荡培养 (转速 150 r/min) 72 h。培养完成后, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

#### 1.2.3.2 硫苷含量测定

通过氯化钡比色法测定硫苷含量。量取 0.5 mL 发酵培养上清液于试管中, 加入 2 mL 质量分数为 0.1% 的羧甲基纤维素钠溶液, 温和振荡混匀。然后加入 1 mL 氯化钡溶液, 常温放置 2 h 进行显色反应, 采用 0.5 mL 蒸馏水、2 mL 0.1% 的羧甲基纤维素钠溶液以及 1 mL 氯化钡溶液混合液调零后, 在 540 nm 下测定吸光度 ( $A$ ), 按下式计算硫苷降解率 ( $x$ )<sup>[13]</sup>。对照为同体积的粗硫苷提取液。

$$x = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.4 硫苷降解菌基因组完成图获得及分析

#### 1.2.4.1 基因组测序及组装

通过商品化试剂盒提取硫苷降解菌基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳法检测其浓度、纯度和基因组的完整性, 通过 Qubit 进行定量。选择达标的样本分别采用 Nanopore 平台和 Illumina 平台建库, 检测合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量进行 Nanopore PromethION 和 Illumina NovaSeq PE150 测序。原始数据下机后, 过滤测序质量值较低的 reads, 保留质量值较高的 reads, 过滤后的 clean data 进行序列组装。

#### 1.2.4.2 功能基因注释

基于氨基酸序列进行功能基因注释。使用 Blast 软件将菌株待测基因对应的氨基酸序列与选择的数据库进行比对, 获得相应的功能基因注释信息。选择的数据库包括 Gene Ontology (GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、Cluster of Orthologous Groups of Proteins (COG)、EggNOG、NR、Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) 和 Carbohydrate - Active Enzymes Database (CAZy)<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.5 数据分析

获得的试验统计数据以“平均值  $\pm$  标准差”表示, 应用统计软件 SPSS 19.0 进行分析, 多组均数比较采用 ANOVA 检验,  $p < 0.05$  为具有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 硫苷降解菌的分离筛选

通过对堆放菜籽饼粕土壤的分离筛选, 共获得 8 株具有硫苷降解功能的细菌, 测定其硫苷降解率, 结果见表 1。由表 1 可看出, 8 株细菌的硫苷降解率介于  $(37.71 \pm 2.02)\%$  ~  $(68.98 \pm 4.74)\%$  之间, 其中, 4 号菌株具有最高的硫苷降解率, 为  $(68.98 \pm 4.74)\%$ , 高于刘建利等<sup>[15]</sup> 分离筛选的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 的硫苷降解率 ( $58.11\%$ ), 略高于蒋边等<sup>[16]</sup> 分离获得的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的硫苷降解率 ( $62.14\%$ ), 与徐鑫等<sup>[11]</sup> 通过蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 混合发酵获得的菌株的硫苷降解率 ( $67.21\%$ ) 相当。因此, 将 4 号菌株命名为 C1 并继续开展后续试验。

表 1 硫苷降解菌的分离筛选

菌株编号	硫苷降解率/%
1	$45.56 \pm 1.98^d$
2	$37.71 \pm 2.02^f$
3	$52.66 \pm 1.76^e$
4	$68.98 \pm 4.74^a$
5	$40.41 \pm 2.45^e$
6	$59.07 \pm 3.31^b$
7	$61.62 \pm 2.77^b$
8	$44.43 \pm 2.99^d$

注: 不同小写字母代表 5% 水平下的显著性差异

### 2.2 硫苷降解菌 C1 的鉴定

分离获得的 C1 菌株通过 16S rRNA 检测, 在 NCBI 中进行 Blast 对比以及系统发育分析, 确认 C1 菌株与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的亲缘关系最近, 同源性达到 99% (见图 1)。因此, 确定 C1 菌株是枯草芽孢杆菌。

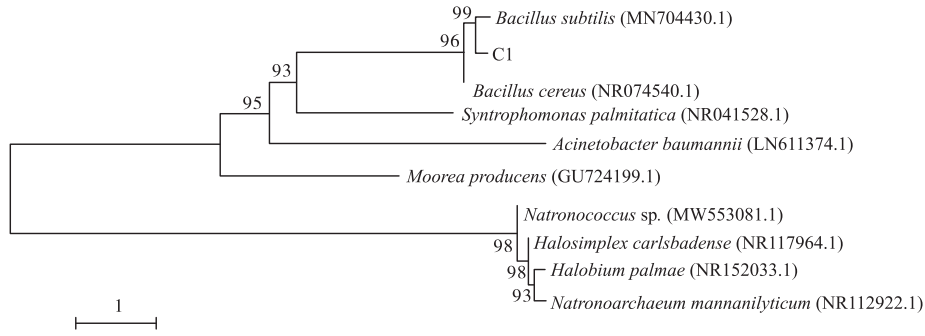


图 1 采用 N-J 法基于 16S rRNA 序列构建的 C1 菌株的系统发育树

2.3 基因组完成图信息

从 C1 菌株样品质控后的有效数据出发,使用 Unicycler 软件(<https://github.com/rwick/Unicycler>)采用二代+三代数据进行基因组组装,筛分染色体与质粒序列,并将染色体序列组装成为一个环状基因组,获得其完成图(见图 2)。确认 C1 菌株的完成图包括 1 个环形染色体,无质粒。如图 2 所示,其染色体全长 4 139 381 bp,鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)含量为 43.88%。编码基因预测显示,预测到的编码基因数为 4 291 个,所有编码基因的总长度为 3 690 009 bp,编码基因的平均长度为 860 bp,编码区总长度占全基因组的比例为 89.14%。

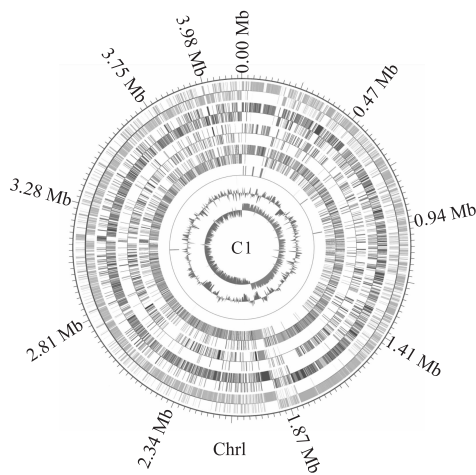


图 2 C1 菌株全基因组圈图

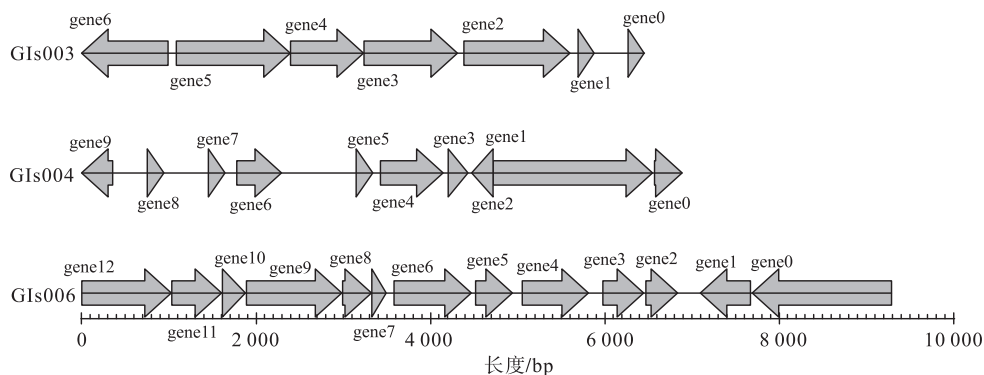


图 3 C1 菌株基因岛中基因分布统计图

2.4 基因组组分分析

非编码 RNA (ncRNA) 是一类执行多种生物学功能的 RNA 分子,其本身并不携带翻译为蛋白质的信息,直接在 RNA 水平对生命活动发挥作用。本试验测定了 C1 菌株 tRNA、rRNA 及 sRNA 的组成情况,如表 2 所示。由表 2 可看出,C1 菌株的非编码 RNA 包括 86 个 tRNA、10 个 5S rRNA、10 个 16S rRNA、10 个 23S rRNA 及 12 个 sRNA。

表 2 C1 菌株 ncRNA 去冗余后的统计结果

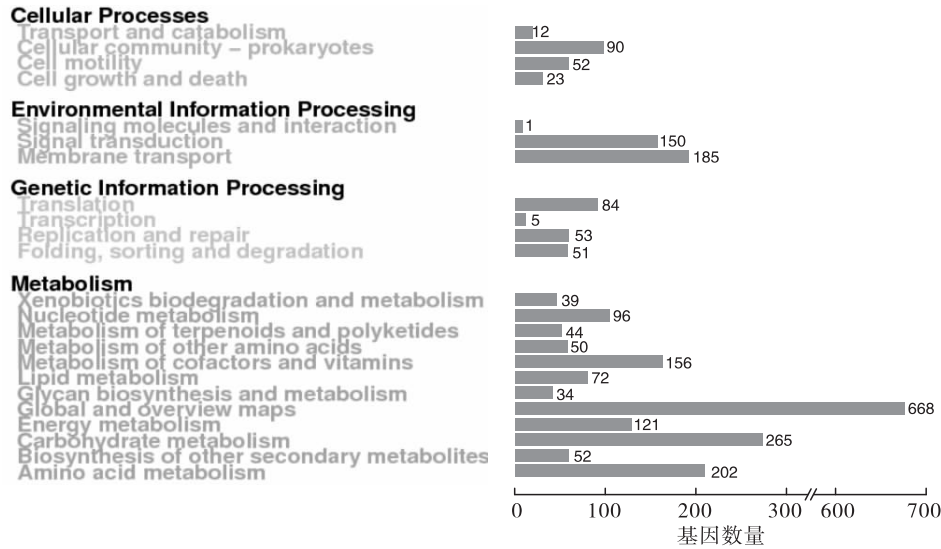
类型	数目	平均长度/bp	总长度/bp
tRNA	86	77	6 649
5S rRNA	10	115	1 150
16S rRNA	10	1 538	15 380
23S rRNA	10	2 926	29 260
sRNA	12	94	1 137

基因岛 (Genomics Islands, GIs) 是一些细菌、噬菌体或质粒中通过基因水平转移整合到微生物基因组中的一个基因组区段。一个基因岛能与病原机理、生物体的适应性等多种生物功能相关。分析发现,C1 菌株共有 8 个基因岛,总长度为 189 600 bp,平均长度为 23 700 bp。C1 菌株基因岛中基因分布统计图如图 3 所示。此外,还鉴定出 C1 菌株共有 13 个前噬菌体,总长度 539 334 bp,平均长度 41 487.2 bp。

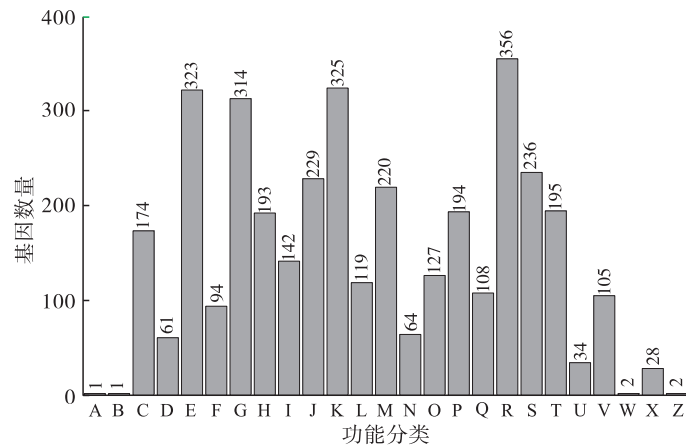
## 2.5 功能基因注释

选择 GO、KEGG、COG、NR、EggNOG、ARDB 及 CAZy 数据库进行注释分析,标注 C1 菌株的功能基因<sup>[17]</sup>。通过 GO 数据库的注释,将全部基因分为了 3 类,包括细胞组分、分子功能及生物过程。KEGG 数据库的注释表明,C1 菌株基因组中涉及新陈代谢

的基因较多,其中,涉及碳水化合物代谢的基因有 265 个,涉及氨基酸代谢的基因有 202 个(见图 4a)。COG 数据库的注释信息显示(见图 4b),C1 菌株能编码大量的功能蛋白,其中主要包括氨基酸转运与代谢、碳水化合物转运与代谢及次级代谢产物合成与转运。



a) KEGG数据库注释



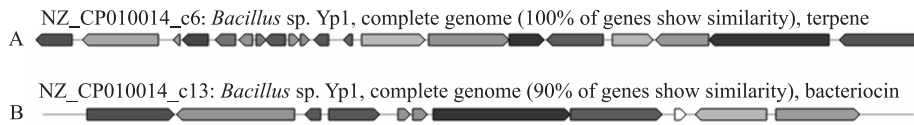
b) COG数据库注释

注:b)图中横坐标功能单元依次表述为 A. RNA processing and modification; B. Chromatin structure and dynamics; C. Energy production and conversion; D. Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E. Amino acid transport and metabolism; F. Nucleotide transport and metabolism; G. Carbohydrate transport and metabolism; H. Coenzyme transport and metabolism; I. Lipid transport and metabolism; J. Translation, ribosomal structure and biogenesis; K. Transcription; L. Replication, recombination and repair; M. Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N. Cell motility; O. Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P. Inorganic ion transport and metabolism; Q. Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R. General function prediction only; S. Function unknown; T. Signal transduction mechanisms; U. Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V. Defense mechanisms; W. Extracellular structures; X. Mobile element (prophages, transposons); Z. Cytoskeleton

图 4 C1 菌株的功能基因注释

基于以上分析,进一步借助于 CAZy 数据库进行碳水化合物活性酶的注释,结果发现,涉及与碳水化合物 (CMB) 相关的 modules 的基因 49 个、糖苷水解酶基因 (GH) 67 个、糖基转移酶基因 (CE) 60 个、多糖裂解酶基因 (GT) 7 个、糖类酯酶基因 (PL) 14 个,未发现氧化还原酶基因 (AA)。

进一步进行了 C1 菌株的次级代谢基因簇分析。结果发现,C1 菌株中共预测到 13 个可能的次级代谢合成基因簇,其中,涉及萜类合成的有 2 个,涉及细菌素合成的有 1 个(见图 5)。萜类和细菌素在抑菌、降解等生物活性上具有重要作用<sup>[18]</sup>。



注: A. 萜类; B. 细菌素

图5 C1菌株萜类和细菌素基因簇

## 2.6 比较基因组学分析

选择NCBI中标准枯草芽孢杆菌(NC000964.3)作为参比菌株,与C1菌株进行共线性分析,结果发现,在C1菌株的序列中,未发现易位(Translocation/Tran),倒置(Inversion/Inver)以及易位+倒置(Tran+Inver)的区域(见图6)。

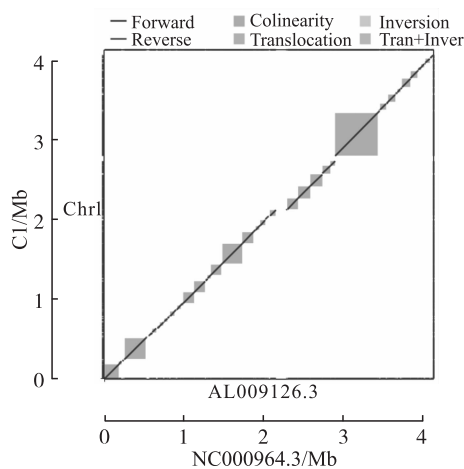


图6 C1菌株与枯草芽孢杆菌(NC000964.3)的共线性分析

进一步对基因组水平上的单核苷酸多态性(SNP)分析发现,与模式菌株NC000964.3相比较,C1菌株在密码子水平出现了突变,会影响后续翻译及功能蛋白质的合成。其中,起始密码子同义突变占总SNP比例很小,为0.0072%,起始密码子非同义突变占比较大,为0.0772%(见表3)。此外,在C1菌株的基因组中,也出现了小片段的插入和缺失,其中,在起始密码子的插入共有6个序列,位于起始密码子的缺失共有13个序列。

表3 C1菌株SNP统计

参比序列	起始密	终止密	起始密	终止密	总SNP
	码子同	码子同	码子非	码子非	
	义突变	义突变	同义突变	同义突变	
NC000964.3	3	34	32	13	41 474

进一步挖掘C1与模式菌株NC000964.3在全基因组水平上大片的插入、缺失、倒置及易位等结构性变异情况,结果发现,C1菌株基因组在2.7 Mb处出现了一个小片段的插入,在2.1~2.4 Mb处缺失了另外一个小片段序列(见图7)。通过查阅NCBI对比发现,C1菌株的2.1~2.4 Mb的缺失突变中部分涵盖了黑芥子酶的相关基因ABQ42337.1

(146572852)的序列,而2.7 Mb的插入突变中,完全包含了黑芥子酶的相关基因CAA42775.1(22595)的序列,证明C1基因组的一小段插入和缺失的突变,使得其氨基酸代谢与模式菌株出现差异,进一步影响相应蛋白的表达,进而影响了C1菌株对硫苷的分解利用效率<sup>[19]</sup>。

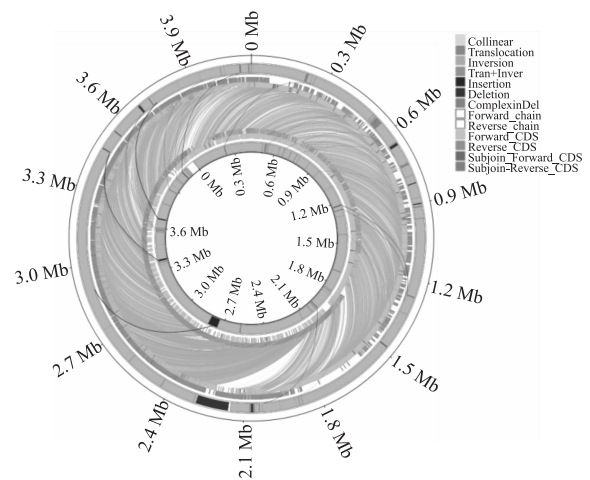


图7 C1菌株与枯草芽孢杆菌(NC000964.3)

全基因组结构变异类型配对图

## 2.7 C1硫苷降解机制分析

黑芥子酶(又称硫苷酶),最早在十字花科植物中发现,是植物体中一类具有硫苷降解活性的酶,黑芥子酶在水环境中与硫苷反应,生成葡萄糖和不稳定的中间产物硫代氢胺酸磺酸盐,进而会形成一系列的产物<sup>[20]</sup>。基于黑芥子酶的水解活性是硫苷降解的重要途径之一<sup>[21]</sup>。随着研究的深入,在某些昆虫及微生物体内也发现了黑芥子酶,例如人的肠道微生物中检测到黑芥子酶活性,真菌中的黑曲霉也检测到黑芥子酶的活性<sup>[22]</sup>。本研究所分离到的菌株C1是一株枯草芽孢杆菌,已有相关报道证实枯草芽孢杆菌或者本身具有黑芥子酶的活性<sup>[23]</sup>,或者能够分泌强化黑芥子酶的物质<sup>[24]</sup>,最终的效果是使得枯草芽孢杆菌能够有效降解菜籽饼粕中的硫苷。结合上述基因组学分析,推测C1高效降解硫苷的可能机制为能够高效分泌黑芥子酶,但更详细的作用机制有待进一步研究。

## 3 结论

本研究从堆放菜籽饼粕的土壤中分离到能够高效降解硫苷的菌株C1,其硫苷降解率达到(68.98 ±

4.74)%。通过全基因组测序,确认 C1 与枯草芽孢杆菌模式菌株共线性程度高,基因组序列未见大片的插入、缺失、倒置及异位等结构性变异,但发现 C1 菌株基因组在 2.7 Mb 处出现了一个小片段的插入,在 2.1~2.4 Mb 处出现了一个小片段序列的缺失,分别涵盖了黑芥子酶的相关基因,推测 C1 的降硫苷机制为 C1 可高效分泌黑芥子酶。此外,测序确认分离到的 C1 菌株是一株略有结构变异的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*),而枯草芽孢杆菌是允许在饲料中添加的微生物。因此,后续试验可以进一步探究 C1 的发酵条件,形成配套的发酵工艺,为其在菜籽饼粕脱毒上应用创造条件。

#### 参考文献:

- [1] MOHAMMED A, CHOCKRY B. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity: a practical and critical review [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2011, 22(1): 21–39.
- [2] NADATHUR S R, WANASUNDARA J P D, SCANLIN L. Sustainable protein sources [M]. London: Academic Press, 2016: 285–304.
- [3] COUTO S R, SANROMAN M A. Application of solid – state fermentation to food industry: a review [J]. *J Food Eng*, 2006, 76(3): 291–302.
- [4] ARO S. Improvement in the nutritive quality of cassava and its by – products through microbial fermentation [J]. *Afr J Biotechnol*, 2008, 25(7): 4789–4797.
- [5] FRANCIS F, LOGNAY G, WATHELET J P, et al. Effects of allelochemicals from first (*Brassicaceae*) and second (*Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*) trophic levels on *Adalia bipunctata* [J]. *J Chem Ecol*, 2001, 27(2): 243–256.
- [6] 韩配配, 胡小加, 廖祥生, 等. 盛花期油菜绿肥还田对土壤微生物和后茬花生的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(4): 638–642.
- [7] DAS P M, DAS S, MANHAR A K, et al. Removing antinutrients from rapeseed press – cake and their benevolent role in waste cooking oil – derived biodiesel: conjoining the valorization of two disparate industrial wastes [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(45): 10746–10756.
- [8] 潘雷, 李爱科, 程茂基, 等. 菜籽饼粕脱毒方法研究进展 [J]. *中国油脂*, 2009, 34(10): 32–35.
- [9] 李晨, 薛峰, 缪文华, 等. 硫甙葡萄糖苷降解研究进展 [J]. *食品科学*, 2010, 31(9): 320–324.
- [10] 丁艳, 李丽倩, 曹蓉, 等. 油菜籽饼粕中硫甙的酶解条件优化及降解产物分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(2): 383–393.
- [11] 徐鑫, 李吕木, 吴东. 菜籽饼硫甙降解菌株筛选、鉴定及其发酵条件优化 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(11): 22–27.
- [12] JANDA J M, ABBOTT S L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9): 2761–2764.
- [13] 甘莉, 金良, 邹国岭. 氯化钡法测定硫代葡萄糖含量的最佳测定条件探讨 [J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(6): 592–595.
- [14] 李雪萍, 许世洋, 范雨轩, 等. 木贼镰孢基因功能注释及比较基因组学分析 [J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(1): 8–15.
- [15] 刘建利, 陈琛. 1 株硫甙降解菌的分离鉴定 [J]. *草业科学*, 2013(11): 1862–1865.
- [16] 蒋边, 潘进权, 谢瑞敏, 等. 固态发酵菜籽粕生产多肽及降解硫甙菌种的筛选 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 164–168.
- [17] GALPERIN M Y, MAKAROVA K S, WOLF Y I, et al. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 261–269.
- [18] ZHAO P Y, HAN L Z, WANG Y L, et al. *Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc.: a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(5): 646–659.
- [19] BONES A M, ROSSITER J T. The myrosinase – glucosinolate system, its organisation and biochemistry [J]. *Physiol Plantarum*, 2010, 97(1): 194–208.
- [20] DAN J K, KROYMANN J, MITCHELL – OLDS T. The glucosinolate – myrosinase system in an ecological and evolutionary context [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 264–271.
- [21] RASK L, ANDREASSON E, EKBOM B, et al. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 93–114.
- [22] MALKA O, SHEKHOV A, REICHEL T, et al. Glucosinolate desulfation by the phloem – feeding insect *Bemisia tabaci* [J]. *J Chem Ecol*, 2016, 42(3): 230–235.
- [23] 付敏. 菜籽饼混菌固态发酵工艺及发酵产品在生长猪上的营养价值评定 [D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [24] 张照然, 何朋杰, 李兴玉, 等. 枯草芽孢杆菌 XF – 1 对十字花科作物体内异硫氰酸苯乙酯含量的影响 [J]. *江西农业学报*, 2021, 33(1): 23–27.