

枯草芽孢杆菌YQ-1降解玉米赤霉烯酮膜蛋白酶的提取及性质分析

周于群, 唐语谦*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 是一类常见于发霉谷物、饲料中的真菌毒素, 具有生殖、遗传和致癌性等危害, 在世界各地的谷物中常超标检出。本课题组前期筛选得到一株高效降解 ZEN 的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* YQ-1, 全细胞催化 12 h 后 ZEN (20 $\mu\text{g/mL}$) 的降解率达 98.36%。根据降解酶的细胞定位, 推测 ZEN 降解酶定位于细胞膜表面。本实验以 ZEN 降解率为指标, 提取 YQ-1 细胞膜表面 ZEN 降解酶蛋白, 结合氨基酸序列分析, 推测可能的降解酶。结果显示, 以辛基- β -葡萄糖苷 (OG)、十二烷基- β -D-麦芽糖苷 (DDM)、Triton X-100 和 Triton X-114 作为膜蛋白提取剂比 NaCl 和尿素提取的蛋白量显著增加, 但提取的膜蛋白酶 ZEN 降解活性较差, 以丁醇为提取剂提取得到的水相蛋白粗酶液在 12 h 内对 20 $\mu\text{g/mL}$ ZEN 的降解率为 64.09%, 粗酶液蛋白含量为 9.86 $\mu\text{g/mL}$, 酶活为 0.43 U。该降解酶的提取为后续的 ZEN 降解酶挖掘奠定了实验基础, 枯草芽孢杆菌及其 ZEN 降解酶的研究为霉菌毒素的体外脱毒提供支撑。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 生物降解; 膜蛋白; 丁醇

文章编号: 1673-9078(2024)02-100-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0284

Membrane Protease Studies of the Degradation of Zearalenone by *Bacillus subtilis*

ZHOU Yuqun, TANG Yuqian*

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Zearalenone (ZEN) is a fungal toxin commonly found in moldy cereals and feedstuffs. It has reproductive, mutagenic, and carcinogenic effects and is often detected at levels exceeding the standard levels in cereals worldwide. *Bacillus subtilis* YQ-1 efficiently degrades ZEN (20 $\mu\text{g/mL}$) at a rate of 98.36%. Based on its cellular localization, it was speculated that ZEN was localized to the cell membrane surface. In this experiment, the ZEN degradation rate was used as an indicator of the successful extraction of ZEN from the cell membrane surface of YQ-1, and combined with amino acid sequence analysis, possible degradation enzymes were speculated. The results showed that the amount of protein extracted with octyl- β -glucoside (β -OG), dodecyl- β -D-maltoside (DDM), Triton X-100, and Triton X-114 as membrane protein extractants was significantly higher than the amount extracted with NaCl and urea, but the ZEN degradation activity of the extracted membrane proteases was notably lower. Moreover, the aqueous phase crude enzyme solution obtained when using

引文格式:

周于群,唐语谦.枯草芽孢杆菌YQ-1降解玉米赤霉烯酮膜蛋白酶的提取及性质分析[J].现代食品科技,2024,40(2): 100-108.

ZHOU Yuqun, TANG Yuqian. Membrane protease studies of the degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 100-108.

收稿日期: 2023-03-09

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020A1515010662); 广东省重点研发计划项目 (2019B020213001; 2021B0707010002)

作者简介: 周于群 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 玉米赤霉烯酮的生物降解, E-mail: zhouyq1006@163.com

通讯作者: 唐语谦 (1979-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 真菌毒素的生物降解, E-mail: yqtang@scut.edu.cn

butanol as the extractant was less effective at 12 h. The degradation rate of 20 $\mu\text{g/mL}$ ZEN within 12 h was 64.09%, the protein content of the crude enzyme solution was 9.86 $\mu\text{g/mL}$, and the enzyme activity was measured to be 0.43 U. The amino acid sequence comparison revealed a possible α/β hydrolase in the crude enzyme solution. The extraction of this degradation enzyme laid the experimental foundation for subsequent ZEN degradation enzyme extraction and further investigation of *B. subtilis* as well as its ZEN degradation enzyme in *in vitro* mycotoxin studies. The study of *B. subtilis* and its ZEN-degrading enzyme offers support to the prospect of *in vitro* detoxification of mycotoxins.

Key words: zearalenone; biodegradation; membrane protein; butanol

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 是镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) (主要是禾谷镰刀菌) 产生的真菌毒素之一^[1]。ZEN 广泛存在于发霉的玉米、小麦、燕麦和其他作物以及饲料、农业和副产品中^[2], 是 17- β 雌激素的结构类似物, 可以与人和动物中的 17- β 雌激素受体竞争性结合, 引发一系列生殖毒性、遗传毒性、致癌毒性和免疫毒性^[3]。ZEN 通过食物链蓄积, 通过农产品进入牲畜和人体内, 带来严重的健康风险, 也会造成巨大的经济损失^[4]。如何降低 ZEN 污染带来的风险和损失是当前研究的主要方向。

与传统的物理和化学脱毒方法 (如热处理、漂洗和碱处理) 相比, 生物脱毒因其更高效、更安全、成本更低和无二次污染等特点而更受青睐^[5,6]。生物脱毒是指使用微生物或酶作用于真菌毒素并将其转化为低毒性或无毒代谢物的过程。ZEN 脱毒酶主要包括: 内酯水解酶^[7]、羧基还原酶^[8]、C^{14/16}-OH 加和酶^[9] (葡萄糖基化、磷酸化等)。已知细胞定位的 ZEN 降解酶多以胞外酶为主^[10-12]。降解酶的挖掘途径分为两种, 一是传统的蛋白提取, 传统提取方法步骤繁琐, 蛋白易在提取过程中失活, 蛋白得率低; 二是从已有数据库中挖掘酶, 并通过重组表达等手段验证。现有的 ZEN 降解酶序列多以此途径获得。目前在 ZEN 降解的研究中, 明确降解酶序列的并不多, 而发现酶定位在细胞膜上的更是少见, 定位在细胞膜上的 ZEN 降解酶几乎未见报道。

本课题组前期筛选到一株可以高效降解 ZEN 的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* YQ-1, 12 h 内全细胞催化对 ZEN (20 $\mu\text{g/mL}$) 的降解率达 98.36%, 但该菌株仍缺乏相关降解酶的研究。经初步降解酶细胞定位研究发现 ZEN 降解酶定位在细胞膜上, 因此本实验根据降解酶的细胞定位, 以 ZEN 降解率为指标, 提取 YQ-1 膜上的降解酶, 根据氨基酸序列分析降解酶的相关信息。

膜蛋白分为整合膜蛋白和外周膜蛋白。外周膜蛋白是通过离子键、氢键与膜脂分子的极性头部相结合的蛋白, 这种结合较为松散, 常用高盐 (1 mol/L NaCl 或 KCl) 或变性剂 (8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍) 提取^[13]。整合膜蛋白会嵌入磷脂双分子层中, 与脂肪酸链共价结合, 这种结合更为紧密, 需要有机溶剂或去垢剂破坏磷脂双分子层后, 才能将其释放出来^[14]。PDB (Protein Data Bank) 数据库中成功解析结构的膜蛋白仅占数据库总蛋白的 1%, 膜蛋白的表达量极低, 缺乏有效的纯化技术是膜蛋白结构和功能研究的瓶颈。

本论文为枯草芽孢杆菌降解 ZEN 的机制研究奠定基础, 也为提取枯草芽孢杆菌膜上活性蛋白酶提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胰蛋白胨、葡萄糖、琼脂、无氨基酵母氮源 (YNB)、生物素、酵母提取物、海藻酸钠、壳聚糖、柠檬酸三钠、无水柠檬酸、三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 尿素、丁醇、Triton X-100、Triton X-114、十二烷基- β -D- 麦芽糖苷 (DDM) 和辛基- β - 葡萄糖苷 (β -OG) 购自 Sigma-Merck 公司; 甲醇 (色谱级)、乙腈 (色谱级), 购自广州彼西络科技有限公司; 玉米赤霉烯酮 (99%), 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; FA2204B 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; JW-3021HR 高速冷冻离心机, 安徽嘉文仪器装备有限公司; HWS 型恒温恒湿箱, 宁波东南仪器有限公司; QYC-200 全温空气摇床, 上海福玛实验设备有限公司; Waters 515 高效液相色谱, 沃特世科技 (上海) 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株及培养条件

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* YQ-1 为本实验室保存, 种子培养基 (称取 30 g/L 葡萄糖, 6 g/L 酵母浸提物, 6 g/L NH_4Cl , 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L KH_2PO_4 和 1 g/L K_2HPO_4) 发酵培养基 (46 g/L 葡萄糖, 12 g/L 酵母浸提物, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1 g/L KH_2PO_4)。YQ-1 于发酵培养基条件下 30 °C、180 r/min 培养 20~24 h, 得到菌液。

1.3.2 ZEN降解酶的细胞定位

取 100 mL 按 2.1 方法培养得到的菌液, 低速离心, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液过 0.22 μm 滤膜即得胞外上清液; 无菌水重悬菌体, 共清洗两次, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 10 mL 无菌水重悬菌体, 冰浴条件下超声破碎菌体细胞, 破碎参数设置如下: 超声功率为 200 W, 破碎总时间为 5 min, 工作 2 s, 停 4 s。高速离心细胞破碎液 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液即得胞内组分。剩余的细胞碎片用 10 mL 无菌水重悬, 即得细胞膜组分。

将 20 μL 5 mg/mL ZEN 分别加入 4 980 μL 不同组分液体中, 反应体系总体积为 5 mL, 其中 ZEN 初始质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 °C 摇床转速 180 r/min 条件下反应。实验组分别为全细胞、胞外上清、细胞膜组分和胞内组分, 测定反应 2 h 后各组分的降解情况。

1.3.3 ZEN降解率的测定

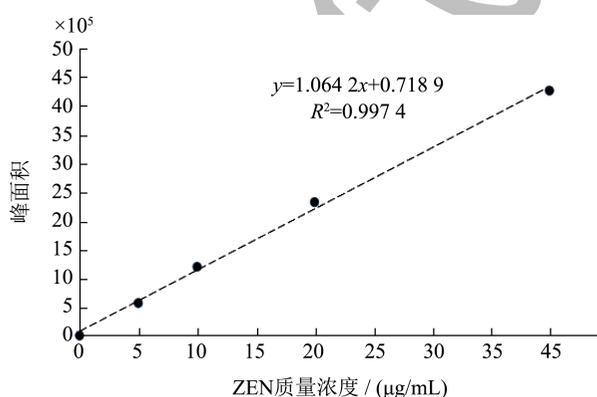


图 1 玉米赤霉烯酮 (ZEN) 标准曲线

Fig.1 The standard curve of zearalenone

分别制备质量浓度为 0、5、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZEN 标准液, 进样 20 μL , 重复测定三次取平均值。横坐标为 ZEN 的质量浓度, 纵坐标为峰面积, 根据质量浓度与峰面积关系绘制得到 ZEN 标准曲线。

ZEN 标准曲线如图 2 所示。标准曲线在 ZEN 质量浓度范围为 0.0~40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时线性关系良好, 可供后续计算 ZEN 的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 时使用。

反应 12 h 后, 取 0.5 mL 反应液加入等量甲醇停止反应后, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 使用 HPLC 检测降解后体系中 ZEN 含量。高效液相色谱检测 ZEN 的条件为: Agilent ZORBAX SB-C18 的色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 使用 Waters 紫外检测器, 检测波长 238 nm, 流动相为乙腈: 甲醇: 水 = 46:8:46 (V/V/V), 柱温 30 °C, 流量 0.9 mL/min, 进样量 20 μL 。以甲醇: 水为 1:1 (V/V) 的溶剂作为空白对照, 采用下列公式计算 ZEN 的降解率:

$$B = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B——ZEN 降解率, %;

A_1 ——反应体系中 ZEN 的初始质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

A_2 ——反应体系中 ZEN 的终止质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3.4 膜定位降解酶的初步提取

将 1.3.2 方法制备得到的膜组分分为数组, 分别缓慢添加不同的提取试剂, 维持 4 °C 条件搅拌提取过夜。不同提取试剂添加情况如表 1。

表 1 膜蛋白提取试剂添加量

Table 1 Addition amount of membrane protein extraction reagent

膜蛋白提取试剂	添加量	活性组分
NaCl	1 mol/L	上清
尿素	8 mol/L	上清
丁醇	膜组分液体的两倍体积	下层水相
Triton X-100	1 mmol/L	上清
Triton X-114	0.7 mmol/L	上清
DDM	1 mmol/L	上清
β -OG	40 mmol/L	上清

得到的活性组分作为粗酶液, 验证其 ZEN 降解能力, 反应体系同 1.3.2, 反应 12 h 后, 经 HPLC 检测 ZEN 质量浓度, 计算降解率。

1.3.5 酶活测定及蛋白质定量

酶反应混合物含有 100 μL 稀释酶溶液、4 μL ZEN 标准储备溶液 (5 mg/mL) 和 896 μL PBS 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值 7.0)。将反应混合物在 30 °C 下孵育 30 min。孵育后, 向反应体系中加入 500 μL 甲醇以终止反应。用高效液相色谱法检测 ZEN 的残留浓度。酶活定义为: 每 mL 液体每分钟降解 1 μg

ZEN 为 1 单位酶活 (U)。

采用 BCA 法对粗酶液中的蛋白质进行定量。

1.3.6 蛋白酶解及N-端测序

选择体积分数 10% 的预制胶, 取 20 μL 粗酶液样品与 80 μL loading buffer 混匀, 煮沸 5 min, 取 10 μL 上样, 电泳电压为 120 V, 电泳时长 90 min。经染色脱色后, 观察结果。

将胶条切成大小约 1 mm^3 的小块置于 1.5 mL 离心管中, 加脱色液, 匀速摇晃, 重复多次脱色至透明; 加乙腈脱水至胶粒变白, 真空抽干, 加入终浓度为 10 mmol/L DTT 的工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 随后加乙腈脱水至胶粒变白, 真空抽干, 加入终浓度为 55 mmol/L IAM 的工作液, 置于暗室孵育 30 min; 再次加入乙腈脱水至胶粒变白, 真空抽干, 再加入去离子水清洗, 该步骤重复 1 次; 加入 50 mmol/L 碳酸氢铵孵育 10 min, 之后再加入 Trypsin 工作液, 让酶液与胶粒充分接触, 待酶液被胶粒完全吸收, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜 12 h; 离心收集酶解上清液, 置于新的离心管中。使用 C18 脱盐柱对样本进行脱盐, 体积分数 100% 乙腈活化脱盐柱, 0.1% (V/V) 甲酸平衡柱子, 加载样本到柱子上, 随后使用 0.1% 甲酸洗涤柱子, 洗掉杂质, 最后使用体积分数 70% 乙腈洗脱, 收集流穿液, 冻干。蛋白样品酶解的肽段在 HPLC 中分离后再进入质谱进行离子化然后经过质谱质量分析器将离子碎片按质量数分开, 经检测器得到谱图。将谱图拼接, 得到肽段序列, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行序列检索。

1.3.7 粗酶液降解ZEN的影响因素

将 8 μL 5 mg/mL ZEN 分别加入 1 992 μL 丁醇粗酶液中, 反应体系总体积为 2 mL, 分别在不同温度 (20、30、40、50 和 60 $^{\circ}\text{C}$) 和 pH 值 (3、4、5、6、7、8、9 和 10) 条件下反应, 其中, pH 值 2.0~5.0 为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 值 6.0~7.0 为 PBS 缓冲液, pH 值 8.0~9.0 为 Tris-HCl 缓冲液, pH 值 10.0~12.0 为 NaHCO_3 -NaOH 缓冲液。在金属离子反应中, 在体系中加入 200 μL 1 mol/L 金属离子母液 (Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 和 EDTA), 使离子终浓度为 100 mmol/L, 加入 8 μL 5 mg/mL ZEN, 加入粗酶液补齐体积至 2 mL。反应 12 h 后, 取等体积甲醇终止反应, 每组设三个平行, 液相测定 ZEN 降解率。

1.4 数据处理及分析

所有的实验均重复三次, 取结果的平均值和标

准差进行分析。采用 Origin 2018 分析结果并作图。

2 结果与讨论

2.1 ZEN降解酶的细胞定位

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* YQ-1 全细胞对 ZEN 有显著的降解作用, 其中全细胞在反应 2 h 后对 ZEN (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的降解率达到 71.23%。比较胞外上清、细胞膜组分和胞内蛋白的活性, 发现反应 2 h 后培养上清液对于 ZEN 的降解率仅为 17.15%, 胞内组分降解率 13.96%, 膜组分降解率 57.74% (见图 2), 这表明枯草芽孢杆菌 YQ-1 中发挥催化作用的活性物质主要在细胞膜上。

已发现的 ZEN 降解酶多是定位在胞外或细胞内。黑曲霉 ZEN-S-FS10 以其分泌到胞外的蛋白降解 ZEN, Sun 等^[15]采用 ÄKTA 蛋白纯化分离系统获得具有 ZEN 降解活性的胞外蛋白 FSZ, 氨基酸序列分析表明其是一种新型降解酶 (与已有的 ZEN 降解酶序列比较, 相似度 < 10%)。同样是胞外蛋白的 ZEN 降解酶还有不动杆菌 *Acinetobacter* SM04 的过氧化物蛋白 Prx^[16], 玫瑰华枝曲霉 *Clonostachys rosea* GRZ7 的内酯水解酶 PR-ZHD^[17]等。随着蛋白提取技术和方式的更新, 膜蛋白的提取研究也日益增多, 结合国内外文献来看, 本文所报道的膜定位 ZEN 降解酶尚是首例。

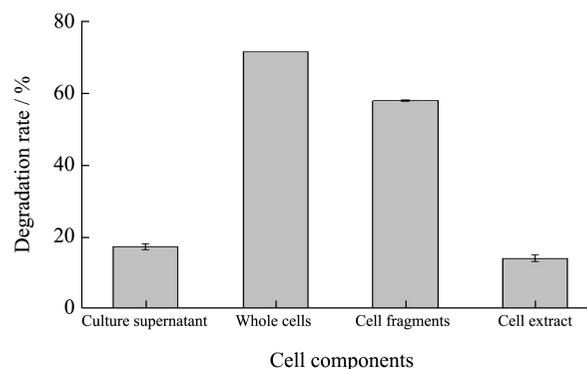


图 2 不同组分对 ZEN 降解的测定

Fig.2 Determination of the degradation of ZEN by different components

2.2 ZEN降解酶的提取

基于降解酶在膜上的定位, 根据膜蛋白的种类选择四种不同的试剂 (1 mol/L NaCl、8 mol/L 尿素、丁醇和 Triton X-114) 进行提取。其中 1 mol/L NaCl、8 mol/L 尿素针对性溶解外周膜蛋白, 丁醇和 Triton X-114 针对性溶解整合膜蛋白。提取得到

的粗酶液进行 ZEN 降解活性验证 (表 2), 并通过 SDS-PAGE 观察结果 (图 3)。

表 2 不同试剂提取所得粗酶液的 ZEN 降解活性

Table 2 ZEN degradation activity of crude enzyme solutions extracted with different reagents

	NaCl	尿素	丁醇	Triton X-114
ZEN 降解活性	-	-	+	-

注: “-”表示无活性; “+”表示有活性。

结果如图 3 所示, NaCl 和尿素对酶的溶解效果并不理想, 提取蛋白量少且缺乏 ZEN 降解活性。高盐环境通过破坏酶与膜之间的氢键和静电相互作用使得酶从膜上脱落, 但这种作用同样会对酶本身的折叠产生影响, 因此用高盐法提取降解酶时要考虑提供一个温和的缓冲环境, 以保护降解酶的活性^[18]。丁醇提取得到的粗酶液具有 ZEN 降解活性, 且 SDS-PAGE 结果显示其蛋白含量较其它三组都高。丁醇具有亲水和亲脂的两亲性, 对酶的结构和活性影响较小, 是一类友好的膜降解酶提取试剂^[18], 由此可推测 YQ-1 膜上 ZEN 降解酶属于整合型膜蛋白。

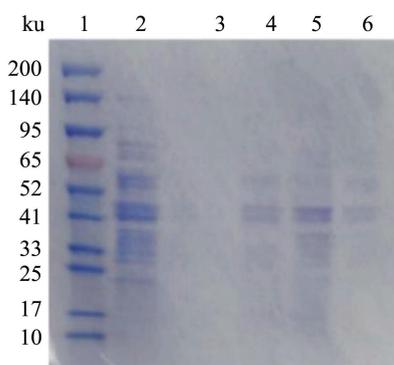
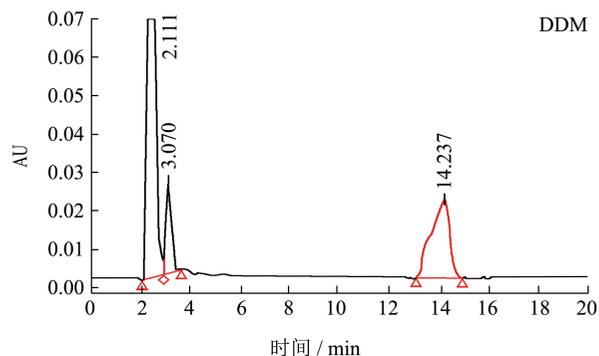
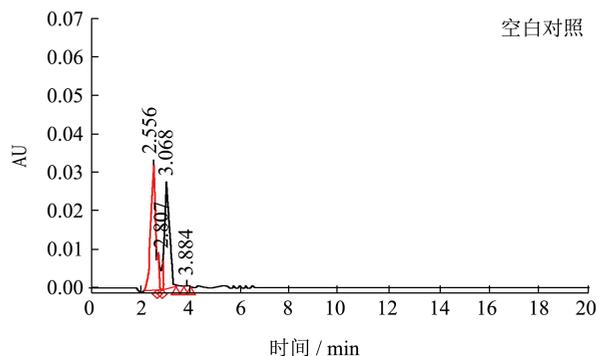
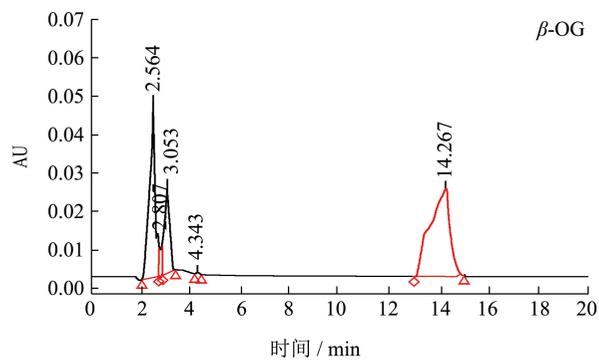
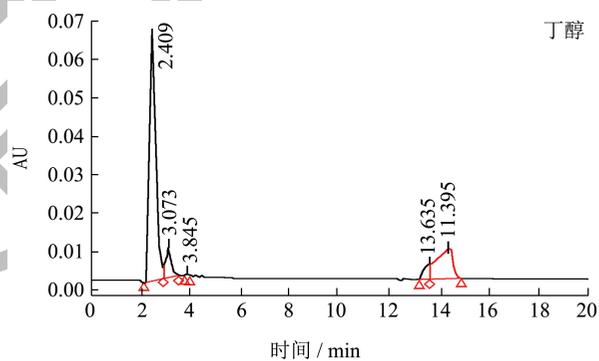
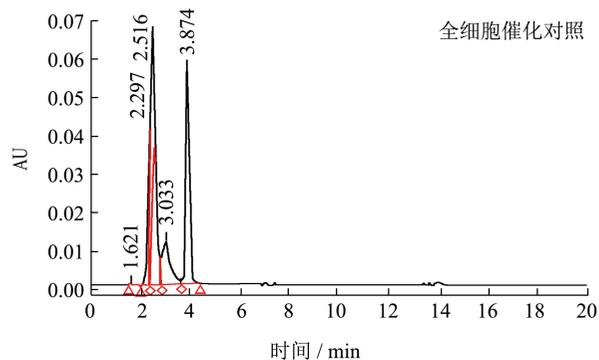
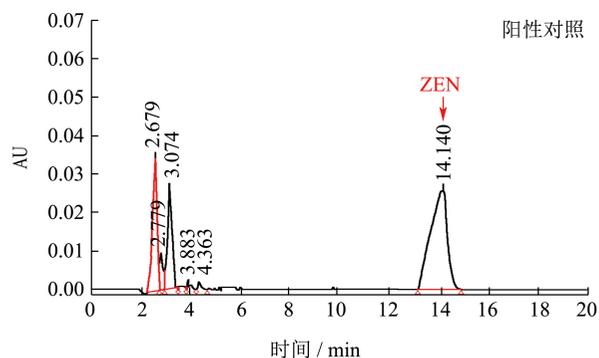


图 3 不同试剂对 YQ-1 膜上 ZEN 降解酶的提取
Fig.3 Extraction of ZEN-degrading enzymes on YQ-1 membranes by different reagents

注: 1 为 Marker; 2 为胞内蛋白; 3 为 NaCl; 4 为尿素; 5 为丁醇; 6 为 Triton X-114。



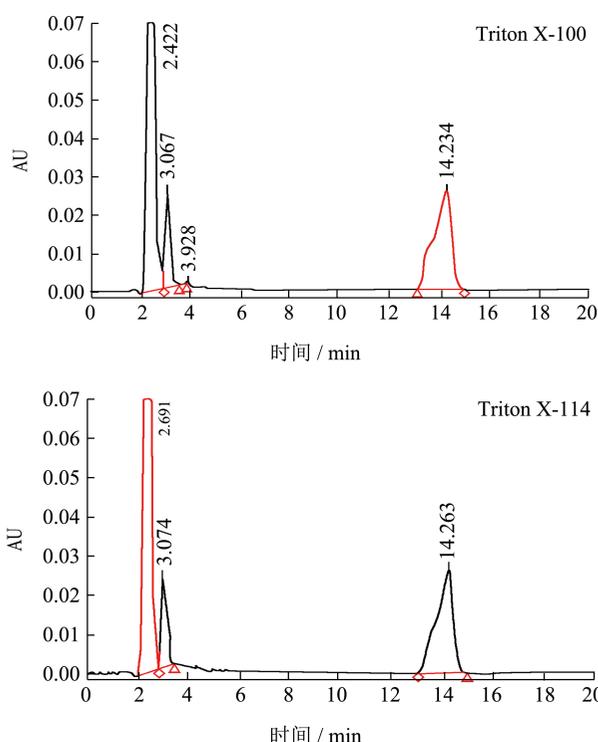


图4 丁醇和去垢剂提取所得膜蛋白粗酶液的 ZEN 降解活性
Fig.4 ZEN degradation activity of membrane protein crude enzyme solution obtained by butanol and detergent extraction

整合膜蛋白与膜的结合更紧密，本实验尝试选用不同提取试剂，包括丁醇和 4 组去垢剂 (β -OG、DDM、Triton X-100 和 Triton X-114)，比较它们对降解酶活性的影响。不同试剂提取得到的粗酶液活性如图 4 和表 3 所示，反应 12 h 后，丁醇组表现出了显著的降解活性，而其它四组粗酶液则没有 ZEN 降解活性。这可能是降解酶从膜中溶解出来时，丁醇的两亲性能较好的保持酶的空间结构，维持酶的活性，而另外 4 组去垢剂提取的膜蛋白量与丁醇所提的相差不明显，但它们会在酶周围提供一个疏水环境，形成胶束（如图 5 所示），可能会掩盖了酶表面的活性位点，而使得酶表现出了失活的性状^[18]。不同去垢剂对不同酶活性的影响不同，在漆酶转化双酚 A 的反应中，Triton X-100 的存在会促进双酚 A 的转化，这是因为 Triton X-100 的存在有利于漆酶的折叠和稳定，同时 Triton X-100 与漆酶表面的结合也减轻了自由基和聚合物引起的失活效应^[19]。

膜上的蛋白质在提取过程中易发生去折叠和聚集沉淀，这可能导致蛋白质天然结构的改变和蛋白质-蛋白质相互作用被破坏，影响酶的生物活性。不同的膜蛋白提取试剂会溶解出不同的蛋白。图 6 的 SDS-PAGE 图中可以看出蛋白条带集中在 30~50 ku 范围，丁醇和四种去垢剂提取得到的条带接近。

表 3 不同试剂对膜定位 ZEN 降解酶活性的影响

Table 3 Effect of different reagents on the activity of membrane localized ZEN degrading enzymes

	全细胞	丁醇	β -OG	DDM	Triton X-100	Triton X-114
ZEN 降解活性	+	+	-	-	-	-

注：“-”表示无活性；“+”表示有活性。

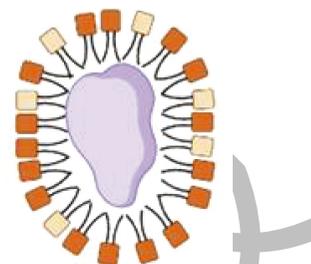


图 5 去垢剂-膜蛋白-脂质胶束

Fig.5 Detergent membrane protein lipid micelles

注：黄色方块为脂质，橙色方块为去垢剂，中间包裹着膜蛋白。

丁醇组粗酶液蛋白质量浓度为 9.86 μ g/mL，比酶活为 0.044 U/mg 蛋白。自海桑内生菌 *Bionectria ochroleuca* 31535 中提取得到的 ZEN 降解酶 ZLHY-6 的酶活为 2.2 U/mL^[20]，与该降解酶相比，本实验提取所得的粗酶液酶活偏低。低酶活与酶的膜定位有关，膜蛋白丰度低，加上提取过程中不可避免的损耗，最终酶浓度低于其它提取所得的胞内外蛋白；此外，膜蛋白从膜上脱落后，酶的三维结构不像其锚定在膜上那么稳定^[21]，酶活性也会受到影响。刘庆瑞等^[22]自链霉菌膜上提取膜蛋白 ϵ -聚赖氨酸降解酶，测得粗酶液酶活为 0.547 U/mg。综上所述，采用丁醇作为提取试剂可从枯草芽孢杆菌 YQ-1 膜上将 ZEN 降解酶溶出，所得粗酶液在 49.3 μ g 添加量下，30 $^{\circ}$ C 反应 12 h 可以降解 64.09% ZEN (20 μ g/mL)。

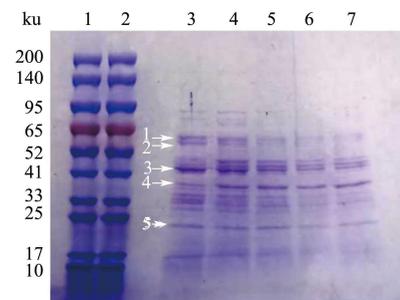


图 6 丁醇和去垢剂对 YQ-1 膜降解蛋白的提取

Fig.6 Extraction of YQ-1 membrane degradation protein by butanol and detergent

注：1 和 2 为 Marker；3 为丁醇；4 为 β -OG；5 为 DDM；6 为 Triton X-100；7 为 Triton X-114。

表 4 不同肽段序列比对结果

Table 4 Sequence comparison results of different peptides

	肽段序列	NCBI 比对序列	种属	相似度/%	
Lane 1	P1	EAYPGDVFYLHSR	ATP 合酶 α 亚基	枯草芽孢杆菌	100
	P2	EHALLAYTLGVK	GTP- 结合蛋白	苏云金芽孢杆菌	100
	P3	GQLLSTWVFGGTHSFKYELIDGDK	DnaD (膜附着) 蛋白	芽孢杆菌属	100
	P4	HFSVEGQLEFR	假设蛋白	金黄色葡萄球菌	100
	P5	HKIETYNFNNIATVICMTCIIIITLAIASISLIIEGYLDESI	假设蛋白	假丝酵母属	65
	P6	LGEIIGK	PAS S-box 蛋白结构域	芽孢杆菌属	100
	P7	IGLFGGAGVGK	ATP 合酶 β 链	巴迪芽孢杆菌	100
	P8	LNEQNMLHILYPKFFPNIDSDDLADQSLGR	假设蛋白	巴氏酵母属	90.62
	P9	IWHHTFYNELR	肌动蛋白	苏云金芽孢杆菌	100
	P10	SLDMDRTSSSNATSIIISPVQVTGQMTT	黄酮毒素家族蛋白	芽孢杆菌属	65
	P11	SVTSMWNFDDKENEQNQSDGTSMK	LytR 转录调节蛋白	海口芽孢杆菌	80
	P12	SYSSPNNKRTIDLK	α/β 水解酶	嗜酸芽孢杆菌	83.33
Lane 2	P1	ASLDGAAK	M60 家族金属肽酶	芽孢杆菌	100
	P2	KDAEAAK	M23 家族金属肽酶	芽孢杆菌	100
	P3	NVAAIK	含 DUF11 结构域蛋白	蜡样芽孢杆菌	100
Lane 3	P1	DIILMIPFVRQCAGNIAPSFQAIR	假设蛋白	河水短芽孢杆菌	47.22
	P2	HHKLLSALQWILVAASGAIISGLSIVVK	D-2- 羧基酸脱氢酶	芽胞八叠球菌属	46.43
	P3	KRPIKVSQGLIIKPNVFNPK	多糖生物合成蛋白	唾液酸芽孢杆菌	83.33
	P4	IGGIGTVPVGR	EF Tu/IF-2/RF-3 家族 GTP 酶	芽孢杆菌属 AGSP1	100
Lane 4	P1	FVIGGPQGDAGLTGR	S- 腺苷甲硫氨酸合成酶	短小芽孢杆菌	100
	P2	IGLFGGAGVGK	ATP 合成酶 β 链	栗褐芽孢杆菌	100
Lane 4	P3	MGDTSWPADIDEDKNNNSISDDNFFFNK	SpaA 异肽形成菌毛蛋白 相关蛋白	威氏芽孢杆菌	60.0
	P4	MIEEHKTSYWYEEDSIVCEEERLDAVR	糖基转移酶家族	依利诺类芽 孢杆菌	83.33
Lane 5	P1	NSESIDKSNA	葡萄糖醇 / 山梨醇转运 蛋白亚基 IIB	芽孢杆菌属	88.89

表 5 肽段与水解酶之间的序列相似性比较

Table 5 Comparison of sequence similarity between peptides and hydrolases

序列	种属	相似度	E-value
Lane 1 P12	枯草芽孢杆菌	83.33%	6.9
α/β 水解酶 1	嗜酸芽孢杆菌	29.15%	3e-16
α/β 水解酶 2	贝氏芽孢杆菌 ANSB01E	23.15%	9e-06
ZHD101	粉红粘帚霉	66.67%	0.84

2.3 ZEN降解酶的氨基酸序列分析

从图 6 所得的 SDS-PAGE 胶上回收箭头所指向的五条明显条带, 随机酶解后 N- 端测序。Lane 1 得到了 12 条肽段, Lane 2 得到 3 条肽段, Lane 3 和 4 得到 4 条肽段, Lane 5 得到 1 条肽段。将这些肽段结果同 NCBI 数据库中已有的蛋白进行比对, 比对结果见表 4。检索的结果显示, 其中 Lane 1 的肽段 P12 与嗜酸芽孢杆菌的 α/β 水解酶序列有 83.33%

的相似性, 与贝氏芽孢杆菌的 α/β 水解酶也具有 66.67% 的相似性^[23](相似性结果比较见表 5), 后两者的 α/β 水解酶均具有羧酸酯酶结构域。具有 ZEN 降解能力的贝氏芽孢杆菌分泌的 α/β 水解酶与 ZHD 101 的序列间具有 23.15% 的相似性。基于上述分析, 推测 Lane1 可能是 α/β 水解酶, 催化 ZEN 结构中大环内酯的酯键的裂解, 形成开环的无毒二羟基苯基产物, 实现快速降解 ZEN。

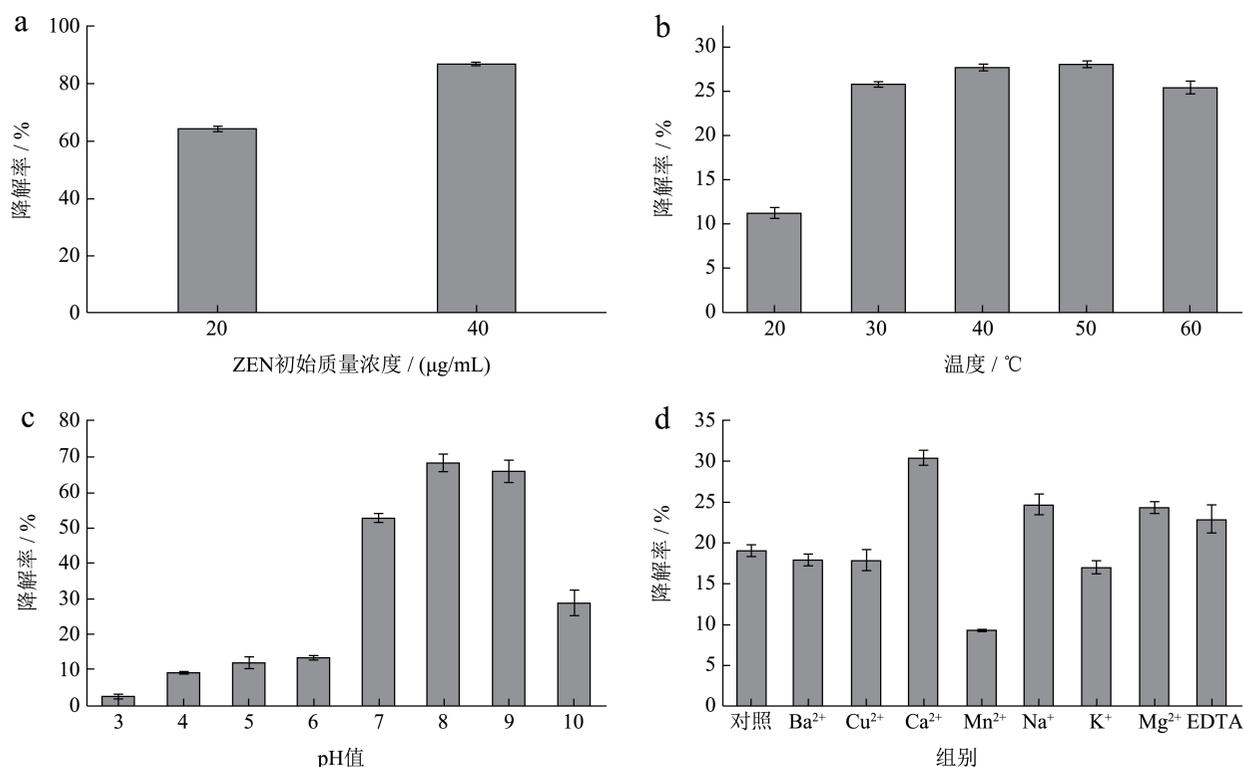


图7 不同ZEN质量浓度(a)、温度(b)、pH值(c)和金属离子(d)对粗酶液降解ZEN的影响

Fig.7 Effect of different ZEN mass concentrations (a), temperature (b), pH value (c) and metal ions (d) on the degradation of ZEN by crude enzyme solution

2.4 影响粗酶液降解ZEN的因素

分别验证不同ZEN初始浓度、温度、pH值和金属离子条件下,丁醇组粗酶液对ZEN的降解效果。在丁醇组粗酶液中,分别加入不同初始质量浓度(20 $\mu\text{g/mL}$ 和40 $\mu\text{g/mL}$)的ZEN进行反应。结果显示(图7a),反应12 h后,初始质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的实验组降解率为64.09%,初始质量浓度40 $\mu\text{g/mL}$ 的实验组降解率为86.50%,ZEN质量浓度的增加有助于降解反应的发生。

粗酶液的活性受温度影响(图7b),在20~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,随着温度的升高,酶活逐渐增加,到40 $^{\circ}\text{C}$ 时相对酶活达到最大,为107.58%,温度上升到60 $^{\circ}\text{C}$ 后,酶活缓慢下降,但仍维持在90%以上,表明60 $^{\circ}\text{C}$ 高温对酶活性影响很小,这有利于扩大酶的应用范围。

同样的,不同pH值下酶活性有显著差异(图7c),酸性条件下(pH值3.0~6.0),酶的活性受到显著抑制(活性<30%),在pH值7.0~9.0的范围内保持较好的稳定性在pH值8.0时达到最佳(130.03%),这一点与大多数ZEN降解酶一致^[15-17,20]。而当pH值达到10.0时,酶活受强碱环境的影响显著下降,相对酶活降至54.12%。

在不同的金属离子溶液中(图7d), Na^{+} (129.33%)、 Ca^{2+} (159.11%)、 Mg^{2+} (127.47%)和EDTA(119.97%)会促进酶活, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 是脱羧酶的已知辅因子和活化剂, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的存在大大促进了ZEN的降解,表明这两个离子在丁醇粗酶液对ZEN的降解反应中发挥了作用^[24]。 Mn^{2+} (48.69%)部分抑制酶活, Ba^{2+} (93.56%)、 Cu^{2+} (93.54%)和 K^{+} (89.19%)对酶活影响不大。

综上所述,粗酶液在ZEN降解反应中呈现如下特性:与20 $\mu\text{g/mL}$ 相比,在40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的ZEN条件下,粗酶液降解率更高,粗酶液的最适反应温度为40 $^{\circ}\text{C}$,最适反应pH值为8.0, Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和EDTA的存在对酶活有促进作用, Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 和 K^{+} 对酶活影响较小,而 Mn^{2+} 的存在会抑制酶活。

3 结论

本文根据枯草芽孢杆菌*B. subtilis* YQ-1膜上的ZEN降解酶定位,以ZEN降解率为指标,提取YQ-1细胞膜上的ZEN降解酶蛋白。不同提取试剂比较结果发现,丁醇提取效果最佳,蛋白含量最高且粗酶液仍保持了ZEN降解活性;其次是 β -OG、

DDM、Triton X-100 和 Triton X-114, 蛋白浓度和丁醇组相近, 但酶活缺失; NaCl 和尿素的提取效果最差, 蛋白含量低且无降解酶酶活。12 h 内丁醇组粗酶液对 20 $\mu\text{g/mL}$ ZEN 的降解率为 64.09%, 粗酶液蛋白含量为 9.86 $\mu\text{g/mL}$, 酶活为 0.43 U。分析氨基酸序列, 推测粗酶液中发挥 ZEN 降解作用的是 α/β 水解酶, 通过作用于 ZEN 大环结构上的酯键, 脱羧形成开环产物, 实现 ZEN 的有效脱毒。该降解酶的提取为枯草芽孢杆菌 ZEN 降解酶挖掘奠定了实验基础, 枯草芽孢杆菌及其 ZEN 降解酶的性质分析为霉菌毒素的体外脱毒研究提供支撑。

参考文献

- [1] ABDALLAH M F, BOEVRE M D, LANDSCHOOT S, et al. Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize [J]. *Toxins*, 2018, 10(12): 493-511.
- [2] MAHATODK, DEVI S, PANDHI S, et al. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review [J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 92-116.
- [3] ZHENG W, WANG B, LI X, et al. Zearalenone promotes cell proliferation or causes cell death? [J]. *Toxins*, 2018, 10(5): 184-201.
- [4] GOTT PN, HENDEL EG, RAMIREZ SM, et al. Recent mycotoxin contamination trends in us corn grain and corn by product [J]. *Feed Journal Dairy Science*, 2020, 103: 126.
- [5] BULGARU C V, MARIN D E, PISTOL G C, et al. Zearalenone and the immune response [J]. *Toxins*, 2021, 13(4): 248-268.
- [6] YANG K, LI K, PAN L H, et al. Effect of ozone and electron beam irradiation on degradation of zearalenone and ochratoxin A [J]. *Toxins*, 2020, 12: 138.
- [7] TAKAHASHI-ANDO N, KIMURA M, KAKEYA H, et al. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning [J]. *Biochemical Journal*, 2002, 365: 1-6.
- [8] HE W J, ZHANG L M, SHU Y, et al. An aldo-keto reductase is responsible for *Fusarium* toxin-degrading activity in a soil *Sphingomonas* strain [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 9549.
- [9] ANTJE B, TATJANA D, JULIA K, et al. Biosynthesis and characterization of zearalenone-14-sulfate, zearalenone-14-glucoside and zearalenone-16-glucoside using common fungal strains [J]. *Toxins*, 2018, 10(3): 104-119.
- [10] 吴宗芮, 丁轲, 余祖华, 等. 降解玉米赤霉烯酮菌株的筛选、降解机制及特性研究 [J]. *中国粮油学报*, 2022, 37(9): 27-33.
- [11] 刘晨, 谢岩黎, 曹荣耀, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及降解酶初步提取 [J]. *现代食品科技*, 2022, 38(8): 73-79.
- [12] TINYIRO S E, WOKADALA C, XU D, et al. Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains [J]. *Folia Microbiol*, 2011, 56(4): 321-327.
- [13] MARTIN J, SAWYER A. Elucidating the structure of membrane proteins [J]. *Biotechniques*, 2019, 66(4): 167-170.
- [14] WALLS D, LOUGHRAN S T, CAMPION E M. Protein quantitation and analysis of purity [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 681: 229-258.
- [15] JI J, YU J, XU W, et al. Isolation and mechanistic characterization of a novel zearalenone-degrading enzyme [J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2908.
- [16] YU Y, WU H, TANG Y, et al. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification [J]. *Microbiol Res*, 2012, 167(3): 121-126.
- [17] SHCHERBAKOVA L, ROZHKOVA A, SINITSYN A, et al. Effective zearalenone degradation in model solutions and infected wheat grain using a novel heterologous lactonohydrolase secreted by recombinant *Penicillium canescens* [J]. *Toxins*, 2020, 12: 475.
- [18] ROSENBERG I M. Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques, 2nd edn [M]. Birkhauser Basel, 2005.
- [19] JI GL, ZHANG HB, HUANG H R, et al. Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(11): 1486-1490.
- [20] 符浩东. 玉米赤霉烯酮降解酶基因 ZLHY-6 在枯草芽孢杆菌中的表达 [D]. 北京: 中国农业科学院农产品加工研究所, 2021.
- [21] BOES D M, GODOY H A, MCMILLAN D G G. Peripheral membrane proteins: promising therapeutic targets across domains of life [J]. *Membranes*, 2021, 11(5): 346.
- [22] 刘庆瑞, 陈旭升, 曾昕链, 等. 链霉菌 M-Z18 膜蛋白 ϵ -聚赖氨酸降解酶的分离纯化、酶学性质及应用 [J]. *微生物学报*, 2014, 54: 1022-1032.
- [23] GUO Y, ZHOU J, TANG Y, et al. Characterization and genome analysis of a zearalenone-degrading *Bacillus velezensis* strain ANSB01E [J]. *Curr Microbiol*, 2020, 77(2): 273-278.
- [24] ANDREINI C, BERTINI I, CAVALLARO G, et al. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13(8): 1205-1218.