

# 可降解玉米赤霉烯酮的重组过氧化物酶 A4-Prx 的纯化与活性研究

钟凤, 吴晖, 刘思利, 唐语谦

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 以来源于不动杆菌 *Acinetobacter* sp. SM04 的过氧化物酶 A4-Prx 的毕赤酵母工程表达菌株 GSI15/pPIC9K-A4-Prx 为研究对象, 从培养液中纯化重组过氧化物酶 A4-Prx, 分析其 ZEA 降解活力, 并研究过氧化物酶 A4-Prx 的酶学特性。本论文首先研究了蛋白的纯化方法, 通过一系列分离纯化手段得到纯的过氧化物酶 A4-Prx, 最终纯化倍数约为 12, HPLC 实验结果表明纯化后的过氧化物酶 A4-Prx 具有 ZEA 降解能力, 且 ZEA 降解率达到 63%。对过氧化物酶 A4-Prx 进行酶学特性研究, 结果表明, pH 和温度均对 A4-Prx 的过氧化物酶酶活有显著影响, pH 9.0 和反应温度 60 °C 时酶活最高, A4-Prx 的最大酶活是 204.1 U, 此时过氧化氢浓度为 9.7 mM。A4-Prx 过氧化物酶反应受 EDTA 的抑制作用明显。本研究为过氧化物酶的酶学研究奠定了基础, 为后续的 A4-Prx 降解机理研究提供先决条件, 推动生物降解 ZEA 研究的进展。

**关键词:** 过氧化物酶; 玉米赤霉烯酮; 毕赤酵母; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2015)8-65-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.012

## Recombinant Peroxidase A4-Prx Purification and Zearalenone Degradation Activity

ZHONG Feng, WU Hui, LIU Si-li, TANG Yu-qian

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Recombinant peroxidase A4-Prx derived from *Acinetobacter* sp. SM04 and expressed by genetically-engineered recombinant *Pichia pastoris* GSI15/pPIC9K-A4-Prx was purified to analyze its enzymatic characteristics and ability to degrade zearalenone (ZEA). Ammonium sulfate precipitation and dextran column elution were used to purify A4-Prx, with a final purification factor of 12. High-performance liquid chromatography (HPLC) showed that purified A4-Prx degraded ZEA at a rate of 63%. Further analysis of A4-Prx enzymatic characteristics showed that pH and temperature had significant effects on peroxidase activity; enzymatic activity peaked at pH 9.0 and 60 °C. Lineweaver-Burk plots of A4-Prx peroxidase reaction showed that when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was 9.7 mM, K<sub>m</sub> was 4.85 mM and V<sub>max</sub> was 204.1 U. A4-Prx also showed significant inhibitory effect on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). These results provide preset conditions for subsequent research on the degradation mechanisms of A4-Prx and further research on ZEA biodegradation.

**Key words:** peroxidase; zearalenone; *Pichia pastoris*; enzymatic characteristics

玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN), 又称 F-2 毒素, 其化学名为 6-(10 羟基-6 氧基-十一碳烯基) $\beta$ -雷锁酸内酯, 是一类由镰刀菌属真菌产生的类雌激素毒素, 具有二羟基苯甲酸内酯结构, 主要存在于玉米、小麦、大麦和黍等农作物及其制品中, 能导致摄入者, 如种

收稿日期: 2014-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201330); 广州市科技攻关项目 (20130000202); 粮食公益性行业科研专项 (201313005)

作者简介: 钟凤(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, 食品微生物

通讯作者: 唐语谦(1979-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, 分子生物学, 工业微生物

猪等家畜或家禽出现早熟、生殖周期紊乱等雌激素紊乱症, 给种植业和养殖业带来巨大损失。ZEN 还具有强致癌性, 能够引起乳腺癌、食管癌等发病率增加, 现已成为引发癌症的主要诱导原因之一<sup>[1-4]</sup>。

过氧化物酶(EC 1.11.1.x)是一类能催化过氧化氢与多种有机、无机氢供体发生氧化还原反应的酶<sup>[5]</sup>。Yu Y 等<sup>[6]</sup>从土壤中分离出一株可将 ZEA (20  $\mu$ g/mL) 完全降解成极低雌激素活性代谢物的不动杆菌 *Acinetobacter* sp. SM04, 并从 SM04 培养液中分离出一种可高效降解 ZEA 的过氧化物酶 Prx, 该酶是硫氧还蛋白依赖性过氧化物酶家族成员。自从第一个 Peroxiredoxin 蛋白 (25 kDa 的酵母蛋白) 被发现以来,

这种特殊的过氧化物酶引起很多研究者的兴趣,生物体内有着广泛的分布种类<sup>[7]</sup>。尽管 Peroxiredoxin 蛋白最初在酵母中被鉴定,但大量亚型和特性相继在哺乳动物和其它生物细胞中被发现和研究。肖俊梅将过氧化物酶 Prx 的基因片段克隆至毕赤酵母,得到重组工程菌 GS115/pPIC9k-A4-Prx,并进行了表达条件优化,得出当 pH 7.0、Gly 为 0.11%、温度 30 °C 时,重组蛋白 A4-Prx 表达量最高<sup>[8-9]</sup>。本文将以重组毕赤酵母工程菌 GS115/pPIC9k-A4-Prx 的诱导培养液作为研究对象,纯化出过氧化物酶 A4-Prx,验证其 ZEA 降解活力,并研究 A4-Prx 的酶学特性,包括 pH、温度、底物、抑制剂等对其过氧化物酶酶活的影响,为过氧化物酶的酶学研究以及 ZEA 的生物降解提供基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

重组毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115/pPIC9k-A4-Prx: 携带来源于不动杆菌 *Acinetobacter* sp.SM04 的可降解 ZEA 的过氧化物酶 A4-Prx 的基因片段的重组毕赤酵母工程菌,由本实验室保存。

YPD 培养基: 蛋白胨 2%, 酵母粉 1%, 葡萄糖 2%, 灭菌 15 min。固体培养基添加琼脂 1.5%。

BMGY 培养基: 胰蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%, 100 mmol/L 磷酸钾 pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min 后, 加入 100 mL/L 10×YNB, 1 mL/L 500×生物素, 10 mL/L 甘油。

BMMY 培养基: 胰蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%, 100 mmol/L 磷酸钾 pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min 后, 加入 100 mL/L 10×YNB, 1 mL/L 500×生物素, 0.11% (m/V) 甘氨酸, 5 mL/L 甲醇。

Zearalenone 标品: 购自 Sigma 公司, 用 70% 甲醇制成标准储备液, 浓度为 5 g/L, 于 -20 °C 冰箱中保存。

#### 1.1.2 主要仪器设备

SPX-250B 立式培养箱、YXQ-LS-18S1 高压蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; ESCO 微生物操作柜, 浩瀚有限公司; HFA2004B 电子天平, 上海精密仪器科学有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 移液枪、Centrifuge5804R 台式高速冷冻离心机, Eppendore 公司; DYCP-31DW 电泳槽, 北京六一仪器厂; Milli-Q 纯水机, Millipore; Waters HPLC 仪、荧光和紫外检测器, 美国; 恒温气浴和水浴摇床, 江苏苏昆仪器有限公司; 其他均为实验室常用仪器。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9k-A4-Prx 的活化

取甘油保存菌毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9k-A4-Prx 划线于 YPD 平板, 30 °C 培养 48 h 后, 挑取单菌落在 YPD 平板上再次划线, 30 °C 培养 24 h。

#### 1.2.2 目的蛋白 A4-Prx 在毕赤酵母中的诱导表达

取 YPD 平板二次转化单菌落, 转接到含有 25 mL BMGY 液体培养基中, 30 °C 振荡培养 18 h, (200 r/min)。离心 5 min 弃上清收集上述菌体, 加入 BMMY 液体培养基重悬菌体至 OD<sub>600nm</sub> 值 1.0, 每 24 h 加入 0.5% 甲醇, 30 °C 诱导培养 (200 r/min), 72 h 离心 10 min, 收集上清液。

#### 1.2.3 硫酸铵沉淀

取毕赤酵母的培养上清液, 冰浴中加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 60%, 4 °C 放置过夜, 离心 (4000×g, 15 min, 4 °C), 弃上清, 沉淀用 3 mL 0.02 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 溶解后透析 24 h, 期间换透析液三次。透析是为去除酶液中硫酸铵对酶活力的影响。

#### 1.2.4 Sephadex G-100 凝胶柱纯化

取透析后酶液加入到用 pH 8.0 0.05 M Tris-HCl 缓冲液预平衡的 Sephadex G-100 (1.6 cm×40 cm) 柱中; 用 pH 8.0 0.02 M Tris-HCl 缓冲液洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 每管 3 mL, 收集并测定每管 OD<sub>280nm</sub> 值和过氧化物酶活力。

#### 1.2.5 Sephadex DEAE-52 柱纯化

取 Sephadex G-100 纯化后样品, 浓缩, 加入到用 pH 8.0 0.02 M Tris-HCl 缓冲液预平衡的 Sephadex DEAE-52 (3.5 cm×20 cm), 再依次用 0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 梯度洗脱, 后用 1 M NaCl 洗脱残余蛋白, 流速为 1 mL/min, 用酶标仪测定每管的 OD<sub>280nm</sub> 值和过氧化物酶活力。

#### 1.2.6 蛋白含量和 ZEN 降解活力测定

蛋白含量采用 Folin-酚试剂法 (Lorry) 测定<sup>[10]</sup>。

ZEA 降解活力采用 HPLC 外标法测定<sup>[8]</sup>。

过氧化物酶的酶活测定方法如下: 将 1 mL 的过氧化物酶水溶液, 920 μL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液, 20 μL 0.2 mol/L 4-氨基安替吡啉水溶液, 20 μL 的 0.3 mol/L 苯酚溶液 (用无水乙醇溶解) 混合均匀; 放置在 50 °C 的恒温水浴锅中保持 2 min 后, 添加 20 μL 1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应; 反应 10 min 后, 用紫外-

可见分光光度计测定 500 nm 波长处的吸光值。用 1 mL 的去离子水代替待测样品作为参比对照。

### 1.2.7 pH 和温度对 A4-Prx 过氧化物酶酶活的影响

**pH:** 以过氧化物酶酶活的测定方法为基础, 将缓冲液替换成 0.1 M 醋酸-醋酸钠 (pH 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5) 缓冲液、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5、8.5、9、9.5、10.5、11.5), 在 50 °C 得恒温水浴锅中反应

**温度:** 以过氧化物酶酶活的测定方法为基础, 将水浴锅温度调节为 15、20、30、40、50、60、70、80、90 °C 进行反应。

### 1.2.8 底物对 A4-Prx 过氧化物酶酶活的影响

过氧化物酶酶活测定的基本步骤如 1.2.6 所示。底物包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、苯酚、4-氨基安替吡啉。测定浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、苯酚、4-氨基安替吡啉对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响。

### 1.2.9 抑制剂对 A4-Prx 过氧化物酶酶活的影响

向过氧化物酶溶液中分别添加一定体积的 0.25 M EDTA 储备液和 0.25 M 叠氮钠储备液, 保持 10 min 后进行过氧化物酶酶活测试。添加等体积的去离子水作为对照。0.25 M EDTA 储备液用去离子水配制, 并用 5 M NaOH 溶液调节其 pH 值为 7.0。结果以抑制率表示, 抑制率 (%) = (1 - 处理组酶活力 / 对照组酶活力) × 100%。结果取三次的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 透析酶液的 Sephadex G-100 柱纯化

毕赤酵母 GS115/pPIC9K-A4-Prx 诱导培养上清液经硫酸铵沉淀、透析后经 Sephadex G-100 柱纯化, 分 30 管收集, 测定每管的 OD<sub>280nm</sub> 值和过氧化物酶酶活。结果如图 1 所示, PEAK 1 组分表现出较强的过氧化物酶活力, 达到 70 U/mg, 而其他组分未表现出明显的过氧化物酶活力, 因此断定 PEAK 1 为 A4-Prx 所在峰。收集 PEAK 1 组分, 冷冻干燥, 用于下一步实验。

### 2.2 Sephadex DEAE-52 柱纯化

收集 2.1 纯化后的 PEAK 1 组分, 上样至用 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0) 预平衡过的 Sephadex DEAE-52 柱中, 用 0.02 M、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 进行梯度洗脱纯化, 分 180 管收集, 测定每管的 OD<sub>280nm</sub> 值和过氧化物酶酶活。结果如图 2 所示, 用 0.1 M Tris-HCl 洗脱时的 PEAK 2 组分表现

出较强的过氧化物酶活力, 达到 50 U/mg, 而其他组分未表现出过氧化物酶活力, 因此 PEAK 2 为 A4-Prx 所在峰。收集 PEAK 2 组分, 冷冻干燥, 用于下一步实验。

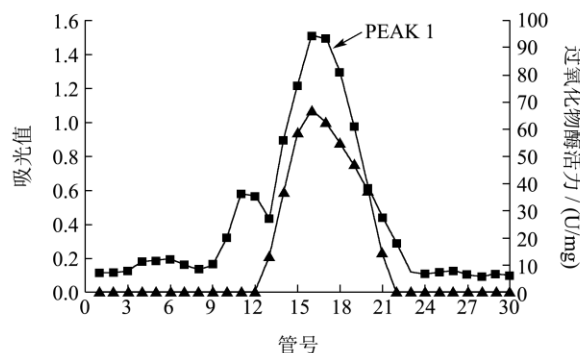


图 1 GS115/pPIC9K-A4-Prx 培养物上清液的处理后酶液的 Sephadex G-100 柱洗脱曲线 (■) 和各组分的过氧化物酶活力 (▲)

Fig.1 The eluted curve of Sephadex G-100 column isolation of strain GS115/pPIC9K-A4-Prx extracellular extracts (■) and peroxidase activity (▲)

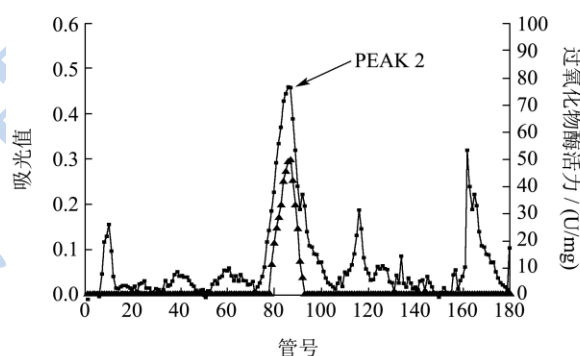


图 2 Sephadex G-100 纯化后组分的 Sephadex DEAE-52 洗脱曲线 (■) 和各组分的过氧化物酶活力 (▲)

Fig.2 The eluted curve of Sephadex DEAE-52 column isolation for the isolation of Sephadex G-100 (■) and peroxidase activity (▲)

### 2.3 A4-Prx 的 SDS-PAGE 电泳

收集 2.2 纯化后的 PEAK 2 组分, 冷冻干燥, 进行 12% SDS-PAGE 电泳试验, 结果如图 3 所示, 图中以不含目的蛋白基因片段的毕赤酵母 GS115/pPIC9K 培养上清液作为对照, 纯化后的蛋白不存在于对照的条带中, 因此可确定纯化蛋白即为目的蛋白 A4-Prx。纯化蛋白只有一条清晰的条带, 分子量约为 41 kDa, 与 A4-Prx 的分子量理论值一致。

运用 HPLC 方法测定过氧化物酶 A4-Prx 的 ZEA 降解能力。结果显示反应 12 h 后 ZEA 含量明显降低, 表明过氧化物酶 A4-Prx 具有 ZEA 降解活力, 且 ZEA

降解率达到 63%。

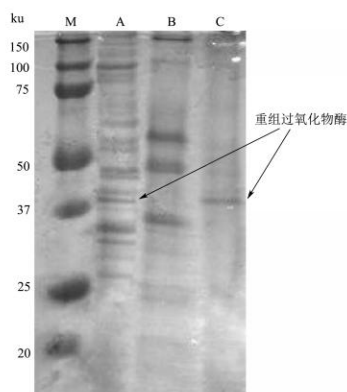


图 3 12%SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 Identification of recombinant A4-Prx by SDS-PAGE.

注：其中 A 为 GS115/pPIC9k-A4-Prx 培养物上清液，B 为 GS115/pPIC9k 培养物上清液，C 为重组过氧化物酶 A4-Prx，M 为 Marker。

## 2.4 纯化过程中的蛋白含量和过氧化物酶活力的变化

力的变化

测定毕赤酵母 GS115/pPIC9K-A4-Prx 的培养物上清液及每一步纯化后蛋白的蛋白含量和过氧化物酶活力，结果如表 1 所示，纯化过程中蛋白含量降低，但单位过氧化物酶活力提高，纯化倍数为 12。

## 2.5 pH 和温度对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

影响

以过氧化物酶活力的测定方法为基础，测定不同 pH 条件下过氧化物酶活力变化，结果表明，在中性及酸性条件下，过氧化物酶 A4-Prx 的过氧化物酶活力很

表 1 A4-Prx 纯化过程中蛋白含量和过氧化物酶活力变化

Table 1 Change in protein and peroxidase activity during A4-Prx purification

步骤	蛋白含量 /mg	总过氧化物酶活力/U	单位过氧化物酶活力(U/mg)	纯化倍数
GS115/pPIC9K-A4-Prx 培养物上清液	140.80±20.2	960.35±120.75	6.86±1.25	
硫酸铵沉淀(>60%)	56.45±5.55	535.50±50.50	9.55±1.82	1.00
Sephadex G-100	15.66±1.80	476.48±38.24	31.33±0.56	9.70±0.50
Sephadex DEAE-52	3.82±0.80	440.55±48.21	116.54±8.40	12.26±0.89

## 2.6 底物对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

过氧化物酶反应的底物包括过氧化氢、苯酚、4-氨基安替吡啉。过氧化氢浓度对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响如图 6 所示，在低浓度时，随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度

低，但在碱性条件下过氧化物酶表现出了较强的过氧化物酶活力，pH 值为 9.0 过氧化物酶活力最高(图 4)，同样方法测定不同温度条件下过氧化物酶活力的变化，结果表明，15~60 °C 时随着温度的升高 A4-Prx 的过氧化物酶活力升高，当温度高于 60 °C，温度的升高导致酶的开始变性，A4-Prx 的过氧化物酶活力下降，60 °C 时 A4-Prx 的过氧化物酶活力最高(图 5)。

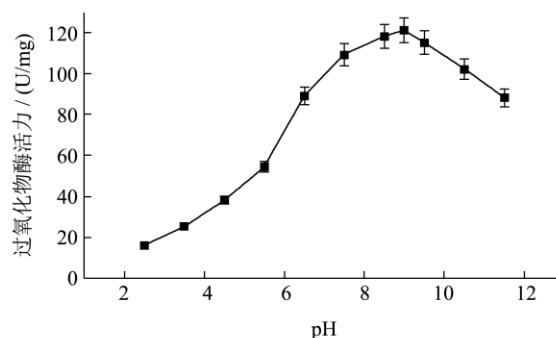


图 4 pH 对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on the peroxidase activity of A4-Prx (at 50 °C)

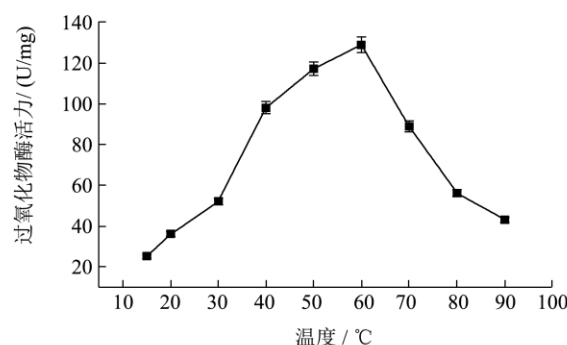


图 5 温度对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

Fig.5 Effect of temperature on the peroxidase activity of A4-Prx (at pH 8.5)

的升高，过氧化物酶活力明显升高，当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度接近 10 mM 时，过氧化物酶活力升高开始变缓慢。

在高浓度(≥50 mM)时，过氧化氢浓度对过氧化物酶活力有抑制作用。上述反应符合一级反应特性，利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法，推算出底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

的  $K_m$  值为 4.85 mM,  $V_{max}$  为 204.1 U。

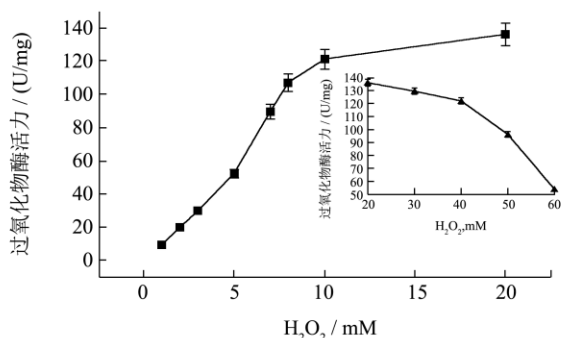


图 6 过氧化氢浓度对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

Fig.6 Effect of  $H_2O_2$  concentration on the peroxidase activity of A4-Prx

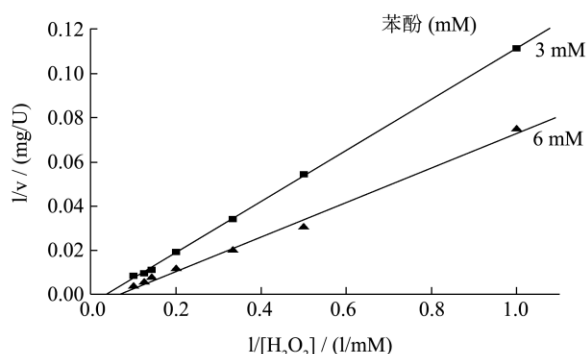


图 7 A4-Prx 在不同的苯酚浓度 (2 mM、4 mM) 下  $H_2O_2$  对过氧化物酶活力的 Lineweaver-Burk 双倒数图(4-氨基安替吡啉 2 mM)

Fig.7 Lineweaver-Burk plots of A4-Prx peroxidase activity vs the  $H_2O_2$  concentrations at two phenol concentrations 2 and 4 mM (2 mM 4-aminoantipyrine)

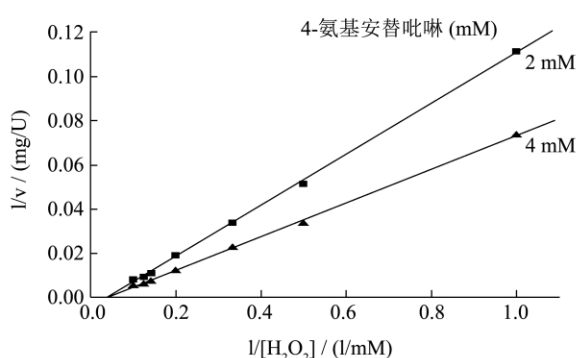


图 8 A4-Prx 在不同的 4-氨基安替吡啉浓度 (3 mM、6 mM) 下  $H_2O_2$  对过氧化物酶活力的 Lineweaver-Burk 双倒数图 (苯酚 3 mM)

Fig.8 Lineweaver-Burk plots of A4-Prx peroxidase activity vs the  $H_2O_2$  concentrations at two 4-aminoantipyrine concentrations, 3 and 6 mM (3 mM phenol)

苯酚和 4-氨基安替吡啉的浓度也对 A4-Prx 过氧化物酶活力有影响, 如图 7、图 8 所示, 两者都具有促进作用, 苯酚和 4-氨基安替吡啉的浓度越高,  $K_m$  值越小,  $V_{max}$  值一致。

## 2.7 抑制剂对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响

实验选取常见的酶活抑制剂 EDTA 和叠氮钠, 探究其对 A4-Prx 的过氧化物酶活力的影响, 结果如图 9 所示, EDTA 对 A4-Prx 的过氧化物酶活力有明显抑制作用, 当 EDTA 浓度大于 10 mM 时, 抑制率大于 80%。叠氮钠对 A4-Prx 的过氧化物酶活力也存在抑制作用, 但抑制能力较 EDTA 弱。EDTA 对过氧化物酶活力的影响来源于 EDTA 与 A4-Prx 中的金属螯合, 从而破坏 A4-Prx 的蛋白结构, 影响过氧化物酶活力。

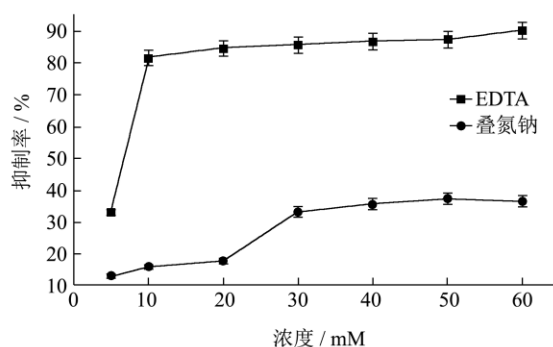


图 9 EDTA 和叠氮钠对重组过氧化物酶的过氧化物酶活力的抑制作用

Fig.9 Inhibitory action of EDTA and sodium azide on the peroxidase activity of A4-Prx

## 3 结论

3.1 本研究利用毕赤酵母工程菌诱导表达过氧化物酶 A4-Prx, 经硫酸铵沉淀以及葡聚糖柱纯化后得到纯的 A4-Prx, 测定并证实了其具有 ZEA 降解活力。

3.2 对过氧化物酶 A4-Prx 的酶学特性研究表明, pH、温度、底物中的过氧化氢、苯酚、4-氨基安替吡啉均影响其过氧化物酶活力。EDTA 对其过氧化物酶活力的抑制作用显著。

3.3 在关于 ZEA 生物降解的已有报道中, ZEA 降解的有效降解方式只有两种<sup>[11]</sup>, 第一种为 ZEA 内酯键的断裂, 主要在酯水解酶的作用下, 先断裂 ZEA 的内酯键, 使其球形结构打开变成直链形结构<sup>[12]</sup>, 第二种是酶作用于 ZEA 内酯环 C'-6 上面的羧基, 在 C'-6 位置加氧后进行酯键的水解, 生成具有羧基和羟基的降解产物<sup>[13]</sup>。通过基因工程表达获得纯酶并进行酶学特性分析是研究降解机理的关键环节。我们也在进一步研究过氧化物酶 A4-Prx 降解 ZEA 的作用机理。这对于过氧化物酶和 ZEA 降解均具有重大意义。

3.4 已报道的关于过氧化物酶的研究中, 过氧化物酶

广泛应用于工业生产和物质的分析检测, 主要用于作为染料的脱色剂、催化合成有机物和聚合物、催化降解木质纸浆, 也可作为包含电化学的生物传感器, 在处理农业废弃物上亦有相关应用<sup>[4]</sup>。但未见报道有其他种类的过氧化物酶可降解 ZEA。因此 A4-Prx 的纯化对于过氧化物酶的酶学研究也具有重大的意义。

### 参考文献

- [1] 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  
LONG Miao, LI Peng, ZHU Lian-qin, et al. Advance in microbial degradation of zearalenone toxin and its mechanism [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32, 116-119
- [2] Guan S, Ji C, Zhou T, et al. Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium [J]. Int. J. Mol. Sci., 2008, 9: 1489-1503
- [3] Bennett J W, Klich M. Mycotoxins [J]. Clin. Microbial. Rev., 2003, 16: 497-516
- [4] Amézqueta S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review [J]. Food Control, 2012
- [5] Hofmann B, Hecht H J, Flohe L. Peroxiredoxins [J]. Biological Chemistry, 2002, 383: 347-364
- [6] YU Yuan-shan, WU Hui, TANG Yu-qian, et al. Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter sp.* SM04 into smaller estrogenic products [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 27: 2675-2681
- [7] Zachary A W, Ewald S J, Robin H, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28: 32-40
- [8] 肖俊梅.ZEN 降解酶 A4-Prx 在酵母中的分泌表达及其应用研究[D].广州:华南理工大学,2013  
XIAO Jun-mei. The secretary expression of recombinant protein A4-Prx in yeast and its application [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [9] TANG Yu-qian, XIAO Jun-mei, WU Hui, et al. Secretary expression and characterization of a novel peroxiredoxin for zearalenone detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiological Research, 2013, 168(1): 6-11
- [10] 付玉梅,许锦珍,廖群,等.Lowry 法测定寡肽的研究[J].药物分析杂志,2011,31(4):739-741  
FU Yu-mei, Xu Jin-zhen, Liao Qun, et al. Research of lowry determination of glycopeptides [J]. Chin. J. Pharm. Anal., 2011, 31(4): 739-741
- [11] 唐语谦.钟凤.陈艺.等.玉米赤霉烯酮生物脱毒及关键酶作用机理的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(7):1742-1746  
TANG Yu-qian, ZHONG Feng, CHEN Yi, et al. Review on biological detoxification of zearalenone and mechanism of key enzymes [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1742-1746
- [12] Takahashi-Ando N, 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: 3239-3249
- [13] Orsolya M, Gerd S, Elisabeth F, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., A new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(6): 661-671
- [14] 孙立水,高强.过氧化物酶的应用研究进展[J].化工技术与开发,2006,35(12):13-16  
SUN Li-shui, GAO Qiang. Biotechnological applications of peroxidases [J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2006, 35(12): 13-16