

重组 ZEN 降解酶 Oxa 的纯化及特性研究

朋贤, 杨继国, 朱洁盈, 郭景景, 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: 以表达可高效降解玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN, ZEA) 的氧化酶 Oxa 的毕赤酵母工程菌 GS115/pPIC9K-Oxa 为研究对象, 将发酵液经乙醇沉淀、阴离子交换色谱和超滤纯化后, 检测重组 Oxa 酶降解 ZEN 的活力, 分析其二级结构, 并对相关酶学特性进行研究。结果表明, 氧化酶 Oxa 的纯化倍数达到 20 倍以上, 纯化后的 Oxa 针对 ZEN 的降解率达到 80% 以上, 其二级结构主要由无规卷曲和 β -折叠组成, 辅以少量的 β -转角和 α -螺旋, 该酶的最适作用温度和 pH 分别为 60 °C 和 9.0, 并且在 50~70 °C 和 pH 9.0~11.0 时保持 60% 以上的 ZEN 降解率, 具有典型的耐高温碱性酶的特征, 反应体系中适量的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的加入能提高其降解活力。本论文为进一步研究氧化酶 Oxa 的分子结构及作用方式奠定了基础, 对 ZEN 的生物降解具有显著的实际意义。

关键词: ZEN; 生物降解; 氧化酶 Oxa; 纯化; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2019)05-167-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.024

Purification and Enzymatic Characters of Recombinant Oxidase Responsible for Zearalenone Biodegradation

PENG Xian, YANG Ji-guo, ZHU Jie-ying, GUO Jing-jing, TANG Yu-qian

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

Abstract: The recombinant *Pichia pastoris* strain GS115/pPIC9K-Oxa expressing oxidase Oxa derived from *Acinetobacter sp.* SM04 was studied, including purification of fermentation supernatant, identification of secondary structure of recombinant Oxa, ZEN-degrading ability and enzymatic characteristics. After ethanol precipitation, anion-exchange chromatography and ultrafiltration, recombinant Oxa was purified more than 20 folds and exhibited remarkable efficiency in ZEN removal by over 80% degradation rate. Its secondary structure is mainly composed of random coils and β -sheet, supplemented by less β -turn and α -helix. Oxa acted as a typical thermostable alkalase by which the ZEN degradation rate was maintained above 60% in pH 9.0-11.0 buffer from 50 to 70°C. In addition, the optimum temperature and pH were 60°C and 9.0, respectively. Some proper concentration of Cu^{2+} , Fe^{2+} and Fe^{3+} individually in environment would accelerate degradation of Oxa. The results could be helpful to evaluate the molecular structure and mode of action of Oxa in future. It would make significant practical sense for the biodegradation of zearalenone.

Key words: zearalenone; biodegradation; oxidase oxa; purification; enzymatic characteristics

玉米赤霉烯酮又称 F-2 毒素, 是谷物及其制品中最常见的一类污染性真菌毒素, 可通过饲料进入动物体内而导致肉制品的污染^[1,2]。奥迈公司对我国 2018 年 1~6 月饲料及饲料原料中霉菌毒素检测发现, 饲料中 ZEN 检出率为 99.73%, 阳性样本平均值为 190.20

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602106; 2017YFC1601005); 广东省科技发展计划项目 (2014A010107004); 中央高校基本科研业务费面上项目 (D2171300); 华南理工大学校级本科教研教改项目 (J2JWY9161000); 华南理工大学学生研究计划项目 (105612018S542)

作者简介: 朋贤 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, 微生物学

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

$\mu\text{g}/\text{kg}$, 最高值为 2830.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 同比增加了 25.82%^[3], 然而我国在 GB 13078-2017 中规定仔猪配合饲料中 ZEN 的允许限量 $\leq 150 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。同时, ZEN 易在人体内积蓄诱发肿瘤, 具有强致癌性、免疫毒性和遗传毒性等^[5-7], 此类真菌毒素超标将对我国食品安全和农产品出口构成严重负面影响。

因此, 如何有效脱毒成为了亟待解决的重大社会问题。目前已报道了大量降低 ZEN 毒性的传统物理和化学手段。物理法主要采用漂洗、热处理、辐射处理及添加吸附剂等手段^[8-10], 化学法多采用臭氧氧化或 H_2O_2 、次氯酸盐等化学试剂处理^[11], 然而都存在安全性低、营养价值损失、成本高等局限性。生物降解主要采用微生物细胞吸附或释放的胞外酶来降解 ZEN, 具有成本低、效率高、营养物质损失少, 无二次污染

等优点,因此寻找高效降解ZEN的酶成为研究热点。

到目前为止,研究比较透彻的ZEN降解酶是同源性很高的基因编码的ZHD类酶:最早由Takahashi-Ando^[12]从粉红粘帚霉*Clonostachys rosea* IFO 7063中纯化所得的内酯水解酶ZHD 101,其编码基因和ZEN降解产物均较为明确,该酶可在24 h内将ZEN及其衍生物降解成毒性较小产物;郭瑞庭等^[13]已针对该酶的相关特性做了系统研究,分析了其三维结构和活性位点,并对关键氨基酸进行突变以提高该酶的耐温性能。Utermark^[14]等从粉红粘帚霉中分离的内酯酶Zes 2与ZHD 101的氨基酸序列几乎相同。Liu^[15]基于ZHD 101编码基因,合成了ZEN-jjm和zlh-6基因,经毕赤酵母表达的粗酶具有较好的ZEN降解活性。胡翔颖等^[16]从麦氏喙枝孢霉*Rhinocladiella mackenziei*中分离的水解酶RmZHD,与ZHD氨基酸序列相似性为65%。此外,Altalhia^[17]从恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida*分离了能够降解ZEN的质粒,能在24 h内将ZEN降解完全,生成毒性更小的化学物。

本文作者的研究团队从*Acinetobacter* sp.SM04中分离出过氧化物酶(Prx)和氧化酶(Oxa),其中Oxa与ZHD蛋白同源性仅为37%,Prx可将ZEN苯环裂解并氧化成含羧基的雌激素毒性较小的产物^[18]。课题组前期成功构建了高效分泌ZEN降解酶Oxa的工程菌,为更好地探究酶的结构与特性,在此基础上,将粗酶纯化后研究纯酶Oxa的降解活力和二级结构,并考察了温度、pH、EDTA和金属离子等对Oxa的活性影响,这为ZEN降解酶的应用提供了新的研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组毕赤酵母GS115/pPIC9K-Oxa,本实验室构建保存;ZEN标准品,购自Sigma公司,溶于色谱级甲醇作为储备液(1 mg/mL),置于-20℃下保存;其他试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 培养基

MD培养基:葡萄糖2%(固体培养基加1.5%~2%琼脂粉),115℃灭菌20 min备用,酵母无氮基氮源(Yeast Nitrogen Base, YNB)1.34%,生物素(Vitamin H, VH) $4 \times 10^{-5}\%$,过滤灭菌后加入。

BMGY液体培养基:胰蛋白胨2%,酵母提取物1%,100 mmol/L PBS (pH 7.0),115℃灭菌20 min备用,YNB 1.34%,VH $4 \times 10^{-5}\%$,甘油1%,过滤灭菌后加入。

BMMY液体培养基:胰蛋白胨2%,酵母提取物1%,100 mmol/L PBS (pH 7.0),115℃灭菌20 min备用,YNB 1.34%,VH $4 \times 10^{-5}\%$,甲醇2%,过滤灭菌后加入。

1.3 仪器设备

DHP-9162型恒温培养箱及TH2-C型恒温摇床,购自太仓市科教仪器所;Waters高效液相色谱仪、2745荧光检测器购自美国Waters公司。

1.4 实验方法

1.4.1 ZEN降解酶的制备

取甘油保存的重组毕赤酵母于MD平板上活化(28℃),挑取长势较好的单菌落接入50 mL BMGY中培养(28℃、180 r/min)至 $OD_{600\text{nm}}=0.6$ 后收集菌体,转移至100 mL BMMY中诱导培养3 d(28℃、180 r/min),每24 h添加甲醇使其浓度为2%,诱导结束后离心收集上清粗酶液。

1.4.2 ZEN降解酶的纯化

采用层析技术和超滤结合的方法纯化Oxa。向粗酶液中加入乙醇使其浓度达60%,静置2 h后离心(12000 r/min, 10 min, 4℃),沉淀溶于蒸馏水后上样到DEAE Sepharose FF阴离子交换柱中,利用50 mM、100 mM、1 M NaCl溶液梯度洗脱(10 mL/管),合并高酶活力组分,通过10 ku的超滤膜超滤浓缩,收集浓缩液冻干,进行HPLC和SDS-PAGE分析,并于-20℃条件下冷藏备用。

1.4.3 Oxa降解活性的分析

目的蛋白的浓度采用Folin-酚试剂法测定^[19]。ZEN降解活力采用HPLC外标法测定^[20]。反应体系参照Tang^[21]报道的方法,使用0.25 M Tris-HCl缓冲液(pH 9.0)代替 H_2O_2 。

ZEN降解率=(对照组含量-样品组的含量)/对照组的含量 $\times 100\%$

1.4.4 酶二级结构分析

Oxa的二级结构采用CD光谱分析。以纯化后的Oxa酶和粗酶用PBS缓冲液(10 mM, pH 7.4)稀释处理至0.2 mg/mL,选择190~260 nm(远紫外区)作为波长扫描范围,对CD谱图进行处理得到Oxa的二级结构组成,空白对照为PBS缓冲液。

1.4.5 温度对重组酶活性的影响

以ZEN降解率测定的方法为基础,设定反应温度为20、30、40、50、60、70℃,在Tris-HCl缓冲液(0.25 M, pH 9.0)中反应12 h,探究最佳反应温度。

1.4.6 pH对重组酶活性的影响

参照 1.4.5 的方法, 设定 Tris-HCl 缓冲液 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 在 50 ℃ 下反应 12 h, 探究最佳反应 pH。

1.4.7 EDTA 对重组酶活性的影响

在反应体系中加入 EDTA 使其终浓度为 10、20、30、40、50 mM, 置于 50 ℃ 反应 12 h, 探究不同浓度 EDTA 对酶活性的影响, 对照为去离子水代替 EDTA。

1.4.8 金属离子对重组酶活性的影响

在反应体系中分别加入 Ca²⁺, Mn²⁺, Li⁺, Co²⁺, Na⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, K⁺ 使其终浓度为 1 mM 和 5 mM, 置于 50 ℃ 反应 12 h, 探究 13 种金属离子对酶活性的影响, 对照为去离子水代替金属离子。

1.4.9 数据统计分析

以上数据重复测定三次取平均值, 测试结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Origin 8.0 对实验数据进行统计分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 重组表达 Oxa 酶的纯化

2.1.1 酶 Oxa 的疏水性

使用 ExPASy 在线分析软件输入 Oxa 氨基酸序列分析其疏水性。氨基酸的疏水性主要由其侧链 R 基的极性决定, Oxa 的氨基酸组成中疏水性氨基酸占 33.73%。如图 1 所示, 波谱值为负值的氨基酸具有更好的亲水性, 而波谱值超过 1.5 时则为强疏水性氨基酸, 前 20 个和 130~150 个氨基酸均为疏水性氨基酸, 20~130 和 150~253 个氨基酸中主要以亲水性氨基酸为主, 占氨基酸总数的 80%, Oxa 的亲水性平均系数大小为-0.49, 因此推测 Oxa 是一个可溶性蛋白, 经毕赤酵母 GS115 分泌表达后能较好溶解在胞外上清液中。

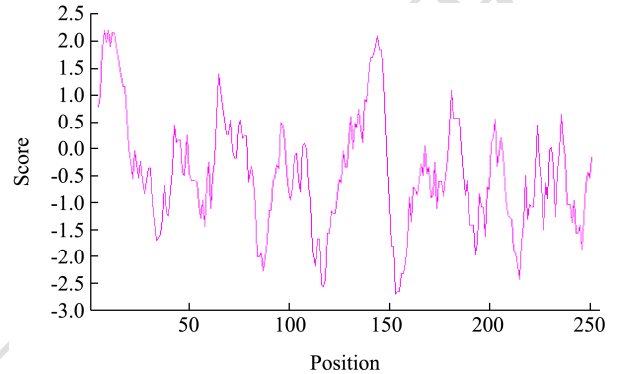


图 1 Oxa 疏水性分析

Fig.1 HPLC analysis of ZEN degradation

2.1.2 酶 Oxa 的纯化效果鉴定

表 1 重组酶 Oxa 的纯化

Table 1 Purification of recombinant Oxa

纯化步骤	活力体积/mL	总活力/U	总蛋白/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数
粗酶液	500	10	350	0.03	1
阴离子交换色谱	100	8.17	50.14	0.16	5.33
超滤	30	6.28	9.81	0.64	21.33

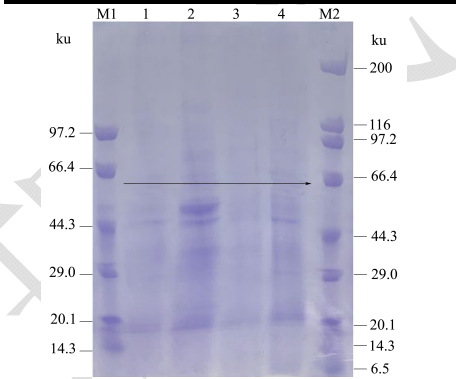


图 2 纯酶 Oxa 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified Oxa

注: M1&M2: Protein Marker(14.3~97.2 ku & 6.5~200 ku); 1&4: GS115/pPIC9K; 2: GS115/pPIC9K-Oxa; 3: GS115。

胞外发酵液经乙醇沉淀, QFF 阴离子交换色谱, 超滤浓缩 3 步纯化后, 结果如表 1 所示, 原上清液蛋白总含量为 350 mg, 总酶活为 10 U, 纯化后蛋白总含量为 9.81 mg, 总酶活为 6.28 U, 酶总活力随着纯化过

程不断降低, 而比活力却逐渐升高, 纯化后 ZEN 降解酶 Oxa 的比活力为 0.64 U/mg, 纯化倍数为 21.33 倍。

通过 SDS-PAGE 分析纯酶发现, 与对照 GS115(泳道 3) 和 GS115-pPIC9K(泳道 1 和 4) 菌株表达上清液相比, GS115-pPIC9K-Oxa(泳道 2) 有一条清晰的蛋白条带, 与理论值大小接近, 可确定该蛋白条带为纯化后的 ZEN 降解酶 Oxa。柱层析结合超滤的纯化方法易操作、周期短, 使酶的比活力可提高 20 倍, 且获得的纯酶经电泳分析未见明显杂蛋白条带, 可见此方法纯化效果良好。

2.2 纯酶 Oxa 降解 ZEN 活性测定

通过 HPLC 检测纯化后的 Oxa 对 ZEN 的降解活性, 与 ZEN 标品相比, 降解后 ZEN 出峰时间略微提前, 约在 12 min (图 3), 这可能是降解前后酶液组分的变化引起的, 同时峰面积随着降解时间增长而逐渐减小, 表明 Oxa 对 ZEN 具有明显的降解活性。以 GS

115 和 GS 115-pPIC9K 为阴性对照,分别测定 0 h,4 h,6 h,8 h 的 ZEN 降解率,结果如图 4 所示,Oxa 对 ZEN 的降解活性随着时间延长而逐渐增强,经 4 h 和 6 h 降解后,降解率分别达 39.85%和 69.84%,8 h 后则高达 88.92%,而阴性对照无明显降解效果,少量的降解可能是菌体吸附导致 ZEN 可检测浓度降低。

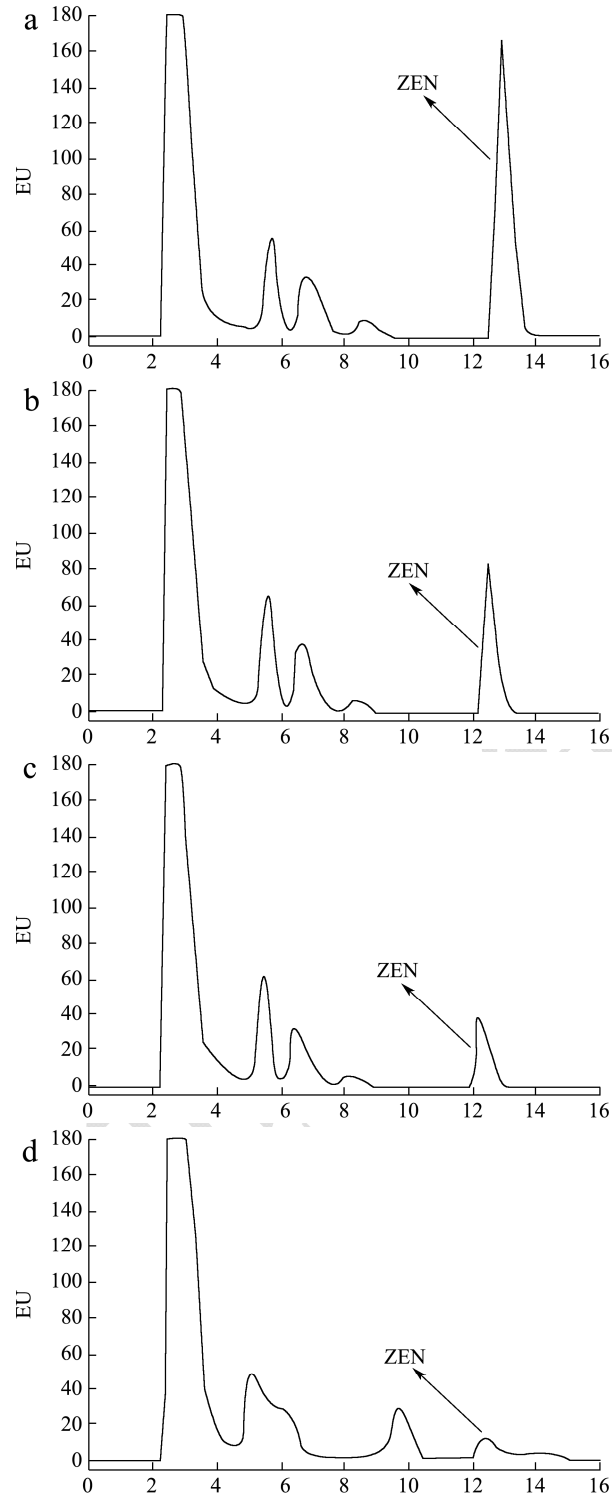


图3 HPLC 检测不同反应时间 ZEN 含量

Fig.3 HPLC analysis of ZEN concentration

注: a: 0 h; b: 4 h; c: 6 h; d: 8 h.

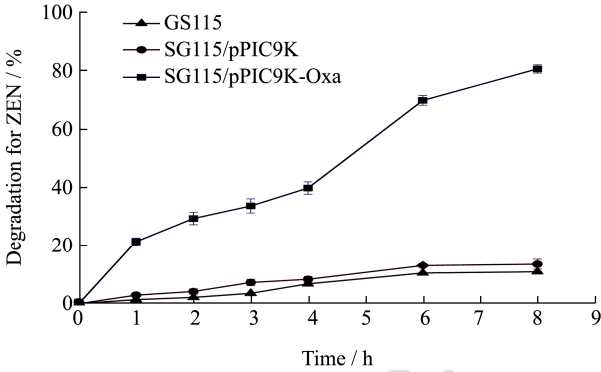


图4 Oxa 的降解活性分析

Fig.4 Analysis of Oxa's degradation activity

2.3 酶 Oxa 的二级结构

2.3.1 酶 Oxa 的二级结构组成类型预测

表 2 Oxa 蛋白二级结构组成类型预测分析

Table 2 The types of protein secondary structure of Oxa

组成类型	氨基酸残基数	百分比/%
α -螺旋	49	19.22
β -转角	13	5.10
延伸链	81	31.76
无规卷曲	112	43.92

通过 NPS 网络蛋白质序列分析网站对 Oxa 的二级结构进行预测,如表 2 所示,Oxa 由 255 个氨基酸组成,112 个氨基酸形成无规卷曲,占二级结构的 43.92%,其次延伸链占二级结构的 31.76%,再辅以少量的 α -螺旋和 β -转角,因此可推测无规卷曲是 Oxa 的二级结构中最主要的构成类型。

2.3.2 CD 光谱检测

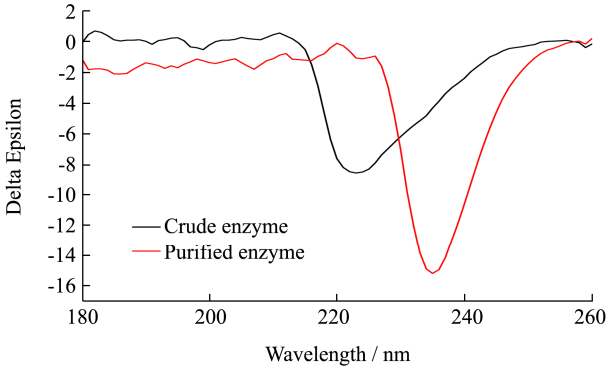


图5 CD 光谱分析 Oxa 二级结构

Fig.5 The CD spectra of Oxa

由图 5 可知,Oxa 从粗酶纯化的过程中,CD 谱图出现了明显变化,220 nm 处的最低吸收峰明显红移,在 236 nm 处出现一负的吸收峰,代表无规卷曲含量有所升高,同时 240 nm 附近的肩峰明显下移,表明 α -螺旋结构含量的增加。

通过 CDNN 软件对 CD 谱图进行处理,得到 Oxa

的二级结构组成类型,如表3所示,Oxa的二级结构主要由无规则卷曲和 β -折叠组成,而 α -螺旋和 β -转角组成较低,这可能是由于Oxa中异亮氨酸、谷氨酸、天冬氨酸等具有大侧链R的氨基酸含量较高,因空间位阻不易形成有序的其他三种结构,而多形成无规卷曲,酶的功能部位常常处于这种构象区域。 β -折叠中反平行式的组成更多,肽链更为伸展,酶结构更为稳定。同时,Oxa中酸性氨基酸含量为13.83%,其侧链R解离了相同的负电荷,因此同性相斥而不易形成稳

定的 α -螺旋;甘氨酸无侧链易于调整空间位阻,脯氨酸具有环状结构和固定的 Φ 角,均利于 β -转角的形成,促进多肽链自身回折,而Oxa中脯氨酸和甘氨酸含量较低,故 β -转角形成也较少。这些有序的二级结构单元,通过氢键等非共价键来维持酶空间结构的相对稳定。CD光谱测得数据与NPS预测的二级结构有一定的差异,可能是因为重组Oxa纯化后仍具有少量杂蛋白,其结构处于一种接近天然Oxa结构的状态。

表3 远紫外CD光谱分析Oxa中各二级结构含量

Table 3 The analysis of secondary structure by the CD spectra

组成类型	180~260 /(nm/%)	185~260 /(nm/%)	190~260 /(nm/%)	195~260 /(nm/%)	200~260 /(nm/%)	205~260 /(nm/%)	210~260 /(nm/%)
α -螺旋	12.51	11.93	12.76	11.37	9.57	8.83	8.34
反平行式	28.64	30.02	29.82	22.13	15.89	13.35	16.22
平行式	10.60	10.00	9.72	12.60	15.14	17.04	14.69
β -转角	15.61	15.36	15.28	16.18	22.40	16.96	17.83
无规卷曲	32.61	32.66	32.42	37.70	17.28	43.82	42.92

2.4 纯酶Oxa相关特性研究

2.4.1 温度和pH对Oxa活性影响

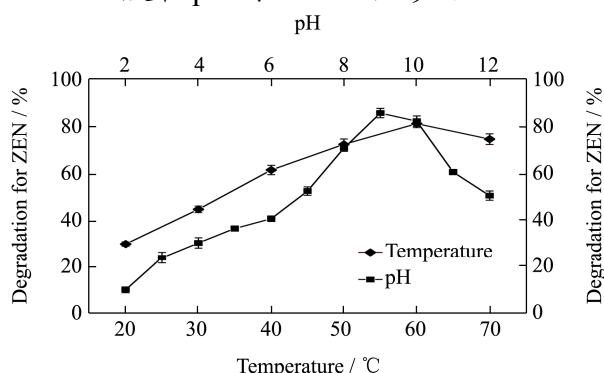


图6 温度和pH对重组酶Oxa活性的影响

Fig.6 Effects of temperature and pH on the ZEN degradation of Oxa

从图6可以看出,反应12h时,随着温度升高,Oxa对ZEN的降解效率逐渐升高,当反应温度为60℃时,降解率高达80%,之后酶活受到抑制,这可能是由于高温使酶分子表面构象发生变化,尤其活性中心的几何形态变化影响了其与底物的结合。由此可知,纯化后的重组酶Oxa具有耐温性,且在60℃下保持较高的活性。

在酸性体系(pH 2.0~6.0)中,Oxa对ZEN的降解效果不明显。随着pH的升高,ZEN降解速率逐渐增加,且在pH 9.0时达到最高点(约为85%),之后显示出减弱的趋势,但pH在9.0~11.0间降解率仍保持在60%以上,证明Oxa酶具有较强的耐碱性,且最适pH为9.0。

目前工业生产的脂肪氧化酶,其最适反应温度大多在30~40℃左右,最适pH多为中性偏酸,Takahashi-Ando^[22]所报道的ZEN降解酶(ZHD101)的最适反应温度也为37℃,大大制约了它们在高温高碱环境下的应用,而Oxa更能耐受酶制剂工业化生产过程中的高温条件,这将有利于Oxa酶制剂的生产;工业生产废水大部分为强碱性,Oxa的耐碱性可使其用作工业强碱性污染溶液中去除ZEN的有力工具,这将有效扩大该酶的应用范围。

2.4.2 EDTA对Oxa活性影响

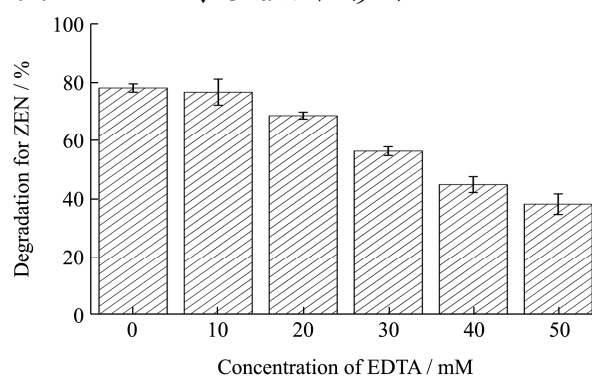


图7 EDTA对重组酶Oxa活性的影响

Fig.7 Effects of EDTA on the ZEN degradation of Oxa

大部分酶发挥催化活性需要特定的金属离子,利用EDTA螯合酶金属离子,对一些金属离子依赖型酶的活性产生抑制作用。由图7可知,当反应体系中不含有EDTA时,Oxa对ZEN的降解率可接近于80%,随着反应体系中EDTA浓度的升高,降解率也逐渐降低。当反应体系中EDTA终浓度为50mM时,ZEN

降解率低至 37.89%，说明在 Oxa 发挥降解作用时需要金属离子的参与，是一个金属离子依赖型酶。

2.4.3 金属离子对 Oxa 活性影响

金属离子可作为辅因子与酶形成复合物，成为酶活性中心的组成成分，也能作为酶的激活剂或辅基激活或提高酶活力，反之也能抑制酶活。

表 4 金属离子对重组酶 Oxa 活性的影响

Table 4 Effects of metal ion on the ZEN degradation of Oxa

Metal ion concentration	Relative degradation for ZEN(%)±SD, n=3	
	1 mM	5 mM
Control	100	100
Ca ²⁺	103.72±1	83.92±0.08
Mn ²⁺	118.16±1.65	108.76±0.34
Li ⁺	117.37±1.27	116.05±1.98
Co ⁺	107.87±1.37	114.90±2.21
Na ⁺	104.21±3.27	41.36±0.23
Mg ²⁺	68.18±0.77	65.75±0.78
Al ³⁺	103.21±0.21	104.29±0.72
Zn ²⁺	112.58±1.02	103.50±1.25
Cu ²⁺	126.60±1.16	123.44±2.23
Fe ²⁺	130.41±2.37	148.23±2.45
Fe ³⁺	120.12±3.41	121.34±2.57
K ⁺	105.54±0.99	110.51±0.08

由表 4 可知，Cu²⁺、Fe²⁺和 Fe³⁺分别能提高 26.60%、30.41%和 20.12%的降解活力，表现出促进 Oxa 酶活增强的作用，而 Mg²⁺随着浓度升高抑制作用加剧，可抑制 Oxa 30%以上的活力，而 Mg²⁺是多种磷酸化激酶的激活剂，这种现象可能与多种作用机制有关，如引起酶蛋白表面电荷的变化，从而影响酶的活性；Na⁺和 Ca²⁺在 1 mM 时对 Oxa 活性无明显影响，在 5 mM 时则显示出一定的抑制作用，其中 Na⁺的抑制作用更为显著，抑制率达到 58.64%，这两种离子的影响机制未能研究清晰，将在以后的实验进一步分析。综上所述表明金属离子对 Oxa 酶的活性具有显著影响，不同种类和浓度的金属离子的影响方式和作用效果差别较大。

3 讨论

生物降解是一种特异性、高效性、环境友好的解毒策略，同时不会产生二次污染物，正在逐渐取代传统方法成为真菌毒素处理的主流方法，但直接使用微生物脱毒过程中存在一些限制，例如处理时间较长，环境条件要求苛刻，作用过程复杂不稳定，脱毒机理不清晰，微生物安全性未明等^[23-28]，所以针对可高效进行生物降解的微生物进行分析、进而应用其关键活性酶成为了解决微生物脱毒限制性问题的研究方

向，许多具有降解真菌毒素功能的酶或从发酵液中提取的天然产物已成功的应用于食品和饲料工业，我们可以通过重组表达关键酶的编码基因，进一步纯化制备可直接投放的微生态酶制剂。Igawa^[29]等已将 ZHD101 编码基因在大肠杆菌和酿酒酵母中异源表达，重组 ZHD101 可完全降解 ZEN 及其衍生物；Higa-Nishiyama 等^[30]将 ZHD101 转入水稻中表达，叶片中的蛋白质提取物可显著降低 ZEN 的含量；Xiang 等^[31]在毕赤酵母中表达的 ZHD101，发酵上清液可以降解 ZEN 及其衍生物 α -玉米赤霉烯醇 (α -ZOL) 和 β -玉米赤霉烯醇 (β -ZOL)。雷元培^[32]分离的一株可降解 ZEN 的枯草芽孢杆菌 ANSB01G，已在河南亿万中元公司成功转化的一系列产品，最具代表性的即为针对霉菌毒素的饲料添加剂-霉立解，可高效降解饲料中的各类黄曲霉毒素及其他霉菌毒素，解除免疫抑制，减少动物疾病发生；全球首屈一指的动物营养公司 Biomin 也一直致力于霉菌毒素脱毒剂的开发，百奥明脱毒剂产品中的专利微生物产生的特殊酶，可通过改变相应毒素分子结构，去除单端孢霉烯族毒素、玉米赤霉烯酮的毒性，形成的代谢物无毒、对环境安全。本课题组研究者^[33]从不动杆菌 SM04 中分离了关键作用酶 Prx 和 Oxa，相比 ZHD101 等显示出良好的耐温和耐碱等性能，已在大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母中实现了成功的表达，可进一步完善投入应用。

4 结论

本文对重组工程菌发酵上清液采用乙醇沉淀、QFF 阴离子交换色谱和超滤浓缩的方法，对 ZEN 降解酶 Oxa 进行了纯化，纯化效果高于 20 倍，纯化方法周期短，且工艺简单、纯化倍数高，适合纯酶制剂的工业化生产。纯化后的 Oxa 在 8 h 内 ZEN 降解率高达 85%，其二级结构主要由无规则卷曲和 β -折叠组成，辅以少量的 α -螺旋和 β -转角，后续可考虑进行纯酶 Oxa 结晶实验，采用 X-衍射进行酶晶体结构鉴定。另外，本研究对 Oxa 的基础酶学性质进行了探究，实验结果表明 Oxa 是一个金属离子依赖型酶，酶促反应最适温度和 pH 分别为 60 °C 和 9.0，在 50~70 °C 以及 pH 9.0~11.0 范围内，Oxa 均保持在 60%以上的 ZEN 降解率，表现出良好的热稳定性和碱稳定性，然而，食品、饲料的 pH 值一般为中性，胃肠道属酸性环境，因此下一步研究应尝试通过胃肠道的保护措施来改善酶的性质，促进 ZEN 降解酶在食品及饲料中的应用。本文研究该酶的纯化特性有助于更深入探究 Oxa 降解 ZEN 的作用机制，此后课题组也将进一步分析降解产物的结构，探讨酶生物降解机理。

参考文献

- [1] Ahmad A, Yu J H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food [J]. International Journal Environment Research Public Health, 2017, 14(6): 632-652
- [2] Marin S, Ramos A J, Cano-Sancho G, et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 60(10): 218-237
- [3] 陈丽媛. 2018 年 1~6 月饲料及原料霉菌毒素分析报告[J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2018, 38(8): 70-72
- CHEN Li-yuan. Analysis report of mycotoxin in feed and raw materials from January to June 2018 [J]. Foreign Animal Husbandry (pig and poultry), 2018, 38(8): 70-72
- [4] GB 13078.-2017, 饲料卫生标准[S]
- GB 13078.-2017, Feed hygiene standards [S]
- [5] Koraichi F, Videmann Bernadette, Mazallon M, et al. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver [J]. Toxicology Letters, 2012, 211(3): 246-256
- [6] Fan W, Lv Y, Ren S, et al. Zearalenone (ZEA) - induced intestinal inflammation is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. Chemosphere, 2018, 190: 272-279
- [7] Tataya E, Espín S, Juan A, et al. Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells [J]. Toxicology in Vitro, 2017, 45(3): 334-339
- [8] 姜虹, 肖淑华. 不同脱毒剂脱玉米赤霉烯酮和呕吐毒素的试验[J]. 饲料研究, 2006, 10: 12-14
- JIANG Jiang, XIAO Shu-hua. Test of different detoxification agents for zearalenone and vomiting toxin [J]. Feed Research, 2006, 10: 12-14
- [9] Avantaggiato F, Lener M, Colombo L, et al. Bt maize and mycotoxins: The current state of research [J]. Annals of Microbiology, 2006, 56(3): 223-230
- [10] Bueno D J, Marco D D, Oliver G, et al. Bardon *in vitro* binding of zearalenone to different adsorbents [J]. Journal of Food Protection, 2005: 613-615
- [11] Marković M, Aleksandra A, Rottinghaus G E, et al. Adsorption of the mycotoxin zearalenone by clinoptilolite and phillipsite zeolites treated with cetylpyridinium surfactant [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 151: 324-332
- [12] Takahashi N, Kimura M, Kakeya H, et al. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: Enzyme purification and gene cloning [J]. Biochemistry Journal, 2002, 365(1): 1-6
- [13] Hui R, Hu X, Liu W, et al. Characterization and crystal structure of a novel zearalenone hydrolase from *Cladophialophora bantiana* [J]. Acta Crystallographica F, Structural Biology Communications, 2017, 73(9): 515-519
- [14] Utermark J, Karlovsky P. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone [J]. Apply Environment Microbiology, 2007, 73(2): 637-642
- [15] Liu H Y, Sun C P, Wu S L, et al. Expression of zearalenone degrading enzyme gene from *gliocladium roseum* in *pichia pastoris* GS115 [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 5: 006
- [16] 胡翔颖, 刘文婷, 刘卫东, 等. 来源于 *Rhinoctadiella mackenziei* 的玉米赤霉烯酮水解酶的表达纯化与酶学性质[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2585-2591
- HU Xiang-ying, LIU Wen-ting, LIU Wei-dong, et al. Expression, purification and characterization of a novel zearalenone hydrolase from *Rhinoctadiella mackenziei* [J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2585-2591
- [17] Altalhi A D, 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
- [18] Yu Y, Wu H, Y Tang, et al. Degradation of zearalenone by the extracellular extracts of *Acinetobacter* sp. SM04 of liquid cultures [J]. Biodegradation, 2011, 22(3): 613-622
- [19] 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 oligopeptides [J]. Chin J. Pharm. Anal., 2011, 31(4): 739-741
- [20] Yuanshan Yu, Hui Wu, Yuqian Tang. 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
- [21] Tang Y, Xiao J, Chen Y, et al. Secretory expression and characterization of a novel peroxiredoxin for zearalenone detoxification in *saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiological Research, 2013, 168: 6-11
- [22] Takahashi-Ando, Tokai T, Hamamoto H, et al. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene [J]. Apply Microbiology

- Biotechnology, 2005, 67(6): 838-844
- [23] Zhao L, Lei Y, Bao Y, et al. Ameliorative effects of *Bacillus subtilis* ANSB01G on zearalenone toxicosis in pre-pubertal female gilts [J]. Food Additive Contamination, 2015, 32(4): 617-625
- [24] Zinedine A, Soriano J M, Molto J C, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin [J]. Food Chemistry Toxicol, 2007, 45(1): 1-18
- [25] Vekiru E, Hametner C, Mitterbauer R, et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite [J]. Apply Environment Microbiology, 2010, 76(7): 2353-2359
- [26] ElSharkaway S H, Selim M I, Afifi M S, et al. Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate [J]. Apply Environment Microbiology, 1991, 57(2): 549-552
- [27] Jard G, Liboz G, Mathieu M S, et al. Transformation of zearalenone to zearalenone-sulfate by *Aspergillus* sp [J]. World Mycotoxin, 2010, 3(2): 183-191
- [28] Cserháti M, Kriszt B, Krifaton C, et al. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains [J]. Int Food Microbiology, 2013, 166(1): 176-185
- [29] Igawa T, Takahashi-Ando N, Ochiai N, et al. Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene [J]. Apply Environment Microbiology, 2007, 73(5): 1622-1629
- [30] Higa-Nishiyama A, Takahashi-Ando N, Shimizu T, et al. A model transgenic cereal plant with detoxification activity for the estrogenic mycotoxin zearalenone [J]. Transgenic Research, 2005, 14(5): 713-717
- [31] Xiang L, Wang Q H, Zhou Y L, et al. High-level expression of a ZEN-detoxifying gene by codon optimization and biobrick in *Pichia pastoris* [J]. Microbiological Research, 2016, 193: 48-56
- [32] 雷元培. ANSB01G 菌对玉米赤霉烯酮的降解机制及其动物试验效果研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
- LEI Yuan-pei. Mechanism of degrading ZEA by ANSB01G strain and its application effect in animal production [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [33] 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]. Microbiological Research, 2012, 167: 121-126.

(上接第 235 页)

- [27] 张文学, 岳元媛, 向文良, 等. 浓香型白酒酒醅中化学物质的变化及其规律性[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2005, 37(4): 44-48
- ZHANG Wen-xue, YUE Yuan-yuan, XIANG Wen-liang, et al. Changes and rules of chemical composition in the fermented grains of Chinese strong aromatic spirits [J]. Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition), 2005, 37(4): 44-48
- [28] 樊丹敏. 玫瑰花酵素发酵过程中的抗氧化活性变化研究[J]. 现代食品, 2018, 8: 92-94
- FAN Dan-min. Study on the change of antioxidant activity during the fermentation process of rose ferment nutrition [J]. Modern Food, 2018, 8: 92-94
- [29] Ghosh K, Ray M, Adak A, et al. Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage [J]. Bioresource Technology, 2015, 188: 161-168
- [30] Di C R, Coda R, De A M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation [J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 1-10
- [31] Folegel A, Kin D O, Chung S J, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich foods [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(7): 1043-1048
- [32] 蒋增良, 毛建卫, 黄俊, 等. 葡萄糖素在天然发酵过程中体外抗氧化性能的变化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 29-34
- JIANG Zeng-liang, MAO Jian-wei, HUANG Jun, et al. Changes in antioxidant activity of grape-ferment *in vitro* during natural fermentation process [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 29-34
- [33] Prasad K N, Yang B, Dong X H, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(4): 627-632
- [34] Shahidi F, Alasalvar C, Liyana pathirana C M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1212-1222

现代食品科技