



研究报告

来源于麦氏喙枝孢霉的玉米赤霉烯酮水解酶在毕赤酵母中的高效表达及活性分析

刘文婷^{1,2} 梁爱玲^{1,2} 刘卫东² 商娜² 郭瑞庭² 张同存^{*1} 郑迎迎^{*2}

1 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308

摘要:【背景】玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)及其衍生物是一群具有雌激素活性的霉菌毒素,广泛存在于被霉菌污染的谷物中,造成食品业和畜牧业的巨大损失。利用专一性高的水解酶进行生物转化可有效去除玉米赤霉烯酮。【目的】构建高效表达玉米赤霉烯酮水解酶的酵母系统,以促进玉米赤霉烯酮水解酶的研究和工业应用。【方法】将来源于麦氏喙枝孢霉(*Rhinochadiella mackenziei* CBS 650.93)的 *Rmzhd* 基因转入毕赤酵母中,筛选获得高效表达菌株,通过高效液相色谱分析发酵液中重组酶的性质。【结果】发酵液中 RmZHD 对 ZEN 的酶活力为 16.67 U/mL,对 α -ZOL 的酶活力为 9.85 U/mL。SDS-PAGE 检测表达产物的分子量,与理论值 30.7 kD 符合,且发酵上清液蛋白纯度高。RmZHD 的最适 pH 值为 9.6,最适温度为 45 °C,并具有较好的耐热性。【结论】研究结果为玉米赤霉烯酮水解酶的异源表达及其潜在的工业应用提供了一定的指导。

关键词: 玉米赤霉烯酮水解酶, 毕赤酵母, 高效表达, 酶学性质

High expression and characterization of a novel zearalenone hydrolase from *Rhinochadiella mackenziei* in *Pichia pastoris*

LIU Wen-Ting^{1,2} LIANG Ai-Ling^{1,2} LIU Wei-Dong² SHANG-Na² GUO Rey-Ting²
ZHANG Tong-Cun^{*1} ZHENG Ying-Ying^{*2}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Background] Zearalenone (ZEN) and its derivatives are a series of mycotoxins with estrogenic activity which are widespread in mold contaminated cereals. Mycotoxin contamination has caused huge loss to food and feed industries. To develop an efficient solution is an urgent task. [Objective] In order to promote the research and application of zearalenone hydrolase, we constructed the recombinant plasmid that highly expressed zearalenone hydrolase in *Pichia pastoris*. [Methods] The *Rmzhd* gene from *Rhinochadiella mackenziei* CBS 650.93 was transformed into *Pichia pastoris* GS115 for heterologous expression. The high expression strain was screened and the characterization of recombinant RmZHD was

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (S2016G4513)

***Corresponding authors:** E-mail: ZHANG Tong-Cun: tony@tust.edu.cn; ZHENG Ying-Ying: zheng_yy@tib.cas.cn

Received: 06-12-2019; **Accepted:** 26-04-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(S2016G4513)

***通信作者:** E-mail: 张同存: tony@tust.edu.cn; 郑迎迎: zheng_yy@tib.cas.cn

收稿日期: 2019-12-06; **接受日期:** 2020-04-26; **网络首发日期:** 2020-05-21

analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** The ZEN and α -ZOL degradation activities of the recombinant RmZHD from the supernatant were 16.67 U/mL and 9.85 U/mL, respectively. The molecular mass of RmZHD was about 30.7 kD, and the purity of protein was very high, as shown by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature of recombinant RmZHD were determined as pH 9.6 and 45 °C, and RmZHD has a good thermostability. **[Conclusion]** The results can provide guidance for the heterologous expression and potential industrial application of zearalenone hydrolase.

Keywords: Zearalenone hydrolase, *Pichia pastoris*, High expression, Enzymatic properties

霉菌毒素(mycotoxin)是丝状真菌产生的低分子质量(MW 约为 700 Da)的次级代谢产物, 主要由曲霉菌、青霉菌和镰刀菌产生^[1]。霉菌毒素不仅包括能抵御疾病的抗生素如青霉素, 也包括那些对人类和动物有害的霉菌毒素, 如黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素、呕吐毒素等^[2]。霉菌常污染粮食、食品、饲料等, 在其储存环境以及下游加工不当的情况下增殖和产生。人和动物食用被污染的食物后很可能会引起中毒, 使得免疫力和生殖力下降, 甚至造成死亡, 从而给饲料业和养殖业带来巨大的损失^[3]。由于霉菌的普遍性和对消费者构成的威胁, 霉菌毒素越来越受到卫生组织的关注, 其在食品中的出现不容忽视。

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是多种镰刀菌属真菌产生的一种非甾体的雌激素性真菌毒素, 与家畜(猪、牛、羊)的生殖障碍和人类的高雌激素综合症有关^[4]。ZEN 可以与哺乳动物的雌激素受体结合, 具有类雌激素的活性^[5]。毒理学研究揭示了 ZEN 对生殖系统的影响, 包括子宫增大、生殖道改变、生育能力下降以及黄体酮和雌二醇水平异常, 甚至会降低胎儿体重和胚胎存活率^[6]。除此之外, ZEN 还被证明具有肝毒性、血液毒性、免疫毒性和基因毒性^[7-9]。近年来人们开始关注 ZEN 与肠道微生态的相互作用^[10-11]。ZEN 经代谢可以转化为多种衍生物, 其中玉米赤霉烯醇(α -zearalenol, α -ZOL)有更高的雌激素毒性^[12]。

ZEN 的降解有物理、化学和生物法, 物理脱毒方法容易造成饲料养分的损失, 化学法有化学物质残留, 存在安全隐患^[13]。生物解毒法主要涉及 ZEN 在微生物细胞壁上的吸附或由微生物分泌

酶引起的 ZEN 降解。一些酿酒酵母、芽孢杆菌、乳酸菌等被报道对 ZEN 有吸附作用^[14-16]。解毒毛孢酵母(*Trichosporon mycotoxinivorans*)可以将 ZEN 降解为无毒产物 ZOM-1^[17-18]。不动杆菌(*Acinetobacter* sp. SM04)中 PrxE 过氧化物酶作用 ZEN, 产物无雌激素活性^[19]。目前研究最多的是来源于粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea* IFO 7063)的玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101 (GenBank 登录号为 ALI16790.1), 其是降解 ZEN 的功能性蛋白质^[20]。Takahashi-Ando 等^[21-22]将 *zhd101* 转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 发现重组酶均能够降解液体培养基中的 ZEN。将 *zhd101* 转入乳杆菌(*Lactobacillus reuteri* Pg4)也可有效降解 ZEN^[23]。但是, 这些重组基因产物的降解速率都很低, 很难开展工业应用。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)广泛应用于异源蛋白的表达, 因其表达效率高、成本低、易操作等优势备受人们的关注和应用。有研究将与 *zhd101* 有 98%相似性的同源基因 *zthy-6* 转入毕赤酵母 GS115, 但 ZEN 水解酶表达量低、活性差, 上清液 4 h 仅能降解 20 μ g/mL 的 ZEN^[24]。另一个有 2 个氨基酸不同的同源蛋白 ZEN-JJM, 上清液 9 h 仅能降解 1 μ g/mL 的 ZEN, 活性更差^[25]。本研究前期发现了具有降解 ZEN 作用的来源于麦氏喙枝孢霉(*Rhinochladiella mackenziei*)的蛋白 RmZHD (GenBank 登录号为 KIX06614.1), 其与 ZHD101 的蛋白序列相似性为 65%; 将 RmZHD 在大肠杆菌中异源表达, 其对 ZEN 的水解活力是 ZHD101 的 1.66 倍, 热稳定性更优于 ZHD101^[26-27]。由于大肠

杆菌表达酶不宜用于食品及饲料工业,选择毕赤酵母工业生产菌株表达 RmZHD 水解酶,可为酶的工业应用打下良好的工作基础。本试验以 *Rmzhd* 为目标基因,构建毕赤酵母表达载体,并转化毕赤酵母菌株 GS115,以实现 *Rmzhd* 在毕赤酵母菌中的异源表达。同时对重组 RmZHD 的酶学性质展开研究,期望为玉米赤霉烯酮水解酶的工业应用奠定基础。RmZHD 在毕赤酵母中的异源重组表达研究对实现玉米赤霉烯酮水解酶的应用具有重要的理论价值和潜在的商业应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物、载体和菌株

Rmzhd 基因序列由华大基因公司进行密码子优化并全序列化学合成,序列 N 端和 C 端在合成时分别添加 *EcoR* I 和 *Not* I 两个酶切位点序列,克隆至载体 pUC57 的相应位点;表达载体构建鉴定用的正向引物(5'-ATGGCTGCTACCAGAAC-3')和反向引物(5'-CTTCAGGTACTTTCTGGA-3')由华大基因公司合成;载体 pPIC9K, Thermo Scientific 公司;毕赤酵母菌株 GS115, Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶, Thermo Scientific 公司; *ExTaq* DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收、质粒提取、PCR 产物纯化试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;蛋白 Marker, 上海源培生物技术有限公司; DNA Marker, 上海捷瑞生物工程有限公司;乙腈、甲醇(色谱级)、ZEN、 α -ZOL, Sigma 公司;无氨基酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acid, YNB), Becton Dickinson 公司;培养基 LSLB、MD、YPD、BMGY、BMMY 按照毕赤酵母表达系统说明制备^[28]。其余试剂为国产分析纯,国药集团化学试剂有限公司。凝胶成像仪,北京赛智创业科技有限公司;NanoDrop、台式冷冻离心机, Thermo Scientific 公司;高效液相色谱仪,

安捷伦科技有限公司;液相色谱柱,月旭科技上海有限公司;蛋白质电泳仪, Invitrogen 公司; AKTA purifier 纯化系统、DEAE 阴离子交换柱, GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Rmzhd* 基因的获得和表达载体的构建

华大基因公司提供的 pUC57-*Rmzhd* 质粒,经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳切胶回收 *Rmzhd* 片段。载体 pPIC9K 用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切并对片段进行回收。T4 DNA 连接酶将酶切载体 pPIC9K 和 *Rmzhd* 片段连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。LSLB 平板筛选,内含 100 μ g/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取菌落送华大基因测序,鉴定连接成功,提取重组表达载体 pPIC9K-*Rmzhd*。

1.2.2 重组表达载体转入毕赤酵母 GS115

将构建好的 pPIC9K-*Rmzhd* 表达载体用 *Sal* I 单酶切线性化,PCR 产物纯化回收后用 NanoDrop 测 DNA 浓度。将 800 ng 线性化产物电转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,使用电压 2.00 kV 电击 4.6 ms,然后将菌液涂到含有 Amp (100 μ g/mL)抗性的 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 观察菌落生长。

1.2.3 菌落 PCR 检测重组子

随机挑取 MD 平板上 5 个单菌落至 40 μ L 含有 0.2% SDS 的溶液中,吹吸均匀,沸水煮 5 min,冰浴 5 min,10 000 \times g 离心 1 min 取上清 0.5 μ L 作为 PCR 模板。PCR 反应体系(20 μ L): *ExTaq* DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.1 μ L,模板 0.5 μ L,10 \times Buffer 2 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μ L,100% Triton X-100 0.4 μ L,ddH₂O 13.8 μ L。PCR 反应条件按照聚合酶说明书设置。获得的 PCR 扩增产物经过凝胶电泳检测,确认 *Rmzhd* 整合到毕赤酵母 GS115 基因组中。

1.2.4 重组毕赤酵母 GS115 的筛选和诱导表达

挑取 MD 平板菌落在不同浓度遗传霉素(geneticin, G418)抗性的 YPD 平板上进行筛选。G418 的浓度设定为 0、0.1、0.25、0.5、1、2、

3 mg/mL, 培养 2-3 d, 观察菌落。在不同浓度 G418 的平板上挑取长势良好的克隆各 5 个接种于 2 mL YPD 培养基中, 随着 G418 浓度的提高进行编号 1-35, 于 30 °C、250 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达 1.3-1.6。再以 1% 接种量转接至 3 mL 的 BMGY 培养基中, 继续培养 24 h, 1 500×g 离心 5 min 去上清。加入 2 mL BMMY 培养基, 开始诱导培养, 期间每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5% 并取样, 查看最佳诱导时间并同时比较不同克隆之间的表达差异, SDS-PAGE 检测结果。扩大培养按需进行, 培养基比例不变。

1.2.5 发酵液中重组 RmZHD 的活性测定

毕赤酵母重组 RmZHD 酶活定义: 每分钟降解 1 μ g 底物所需的酶量为 1 个酶活力单位, 发酵液中重组 RmZHD 的含量用 U/mL 表示^[29]。

测活反应体系: 对于底物 ZEN, 反应体系为 225 μ L, 其中发酵上清液 20 μ L, 2.5 mg/mL ZEN 5 μ L, Tris-HCl 缓冲液 200 μ L (25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5); 对底物 α -ZOL, 反应体系为 245 μ L, 包含发酵上清液 40 μ L, 其余组分与上述反应体系相同。混匀后, 30 °C 反应 15 min, 加入 1 mol/L HCl 50 μ L 和甲醇 300 μ L 终止反应。经高效液相色谱(HPLC)检测 ZEN 的含量: 样品 20 μ L, 柱温 30 °C, 流动相为乙腈-水(60:40, 体积比), 流速 0.6 mL/min, Welch Ultimate XB-C18 柱(4.6×250 mm, 5 μ m)分离洗脱 16 min, 检测波长为 254 nm。

检测毕赤酵母重组 RmZHD 的酶学性质, 反应底物为 ZEN。最适反应 pH 在磷酸盐缓冲液(pH 6.0、7.0、8.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5、8.0、8.5、9.0)和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.6、9.6、10.6)中测定。最适反应温度在 25、30、35、40、45、50、55 °C 下测定。分别在 40、45、50、55、60 °C 下加热处理蛋白 1、2、6、10 min, 10 000×g 离心 1 min 后测定上清中的残余酶活, 确定其热稳定性。所有实验为 2 个平行, 实验结果取平均值^[26]。

1.2.6 重组蛋白的纯化

培养重组 RmZHD 表达菌共 200 mL, 5 000×g 离心 10 min 取上清, 将上清液透析到 pH 7.5 的 25 mmol/L Tris 缓冲液中, 用 DEAE 阴离子交换柱纯化。获得目标蛋白储存于 pH 7.5 的 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl 缓冲液中, 保存于 -80 °C。

1.2.7 纯酶的活性检测

将纯化后的蛋白浓度稀释为 0.15 mg/mL, 检测纯酶降解底物 ZEN 和 α -ZOL 的活性, 反应体系和检测方法依照 1.2.5 中进行, 纯酶 RmZHD 对底物的比活力用 U/mg 表示。

2 结果与讨论

2.1 pPIC9K-Rmzhd 表达载体的构建

pUC57-Rmzhd 质粒经酶切和电泳切胶回收 Rmzhd 片段, 回收后浓度为 200 ng/ μ L, 取 4 μ L 电泳。如图 1A 所示, 可见距离 1 000 bp 处有一条单一、明亮的条带, 与 Rmzhd 片段 798 bp 符合。双酶切处理载体 pPIC9K 并切胶回收, 产物浓度为 220 ng/ μ L, 取 0.5 μ L 电泳。如图 1B 所示, 8 000-12 000 bp 之间有一条带, 与 pPIC9K 片段 9 276 bp 符合。将这两个片段连接转化后, 挑取菌落送测序, 鉴定 pPIC9K-Rmzhd 重组表达载体构建成功。

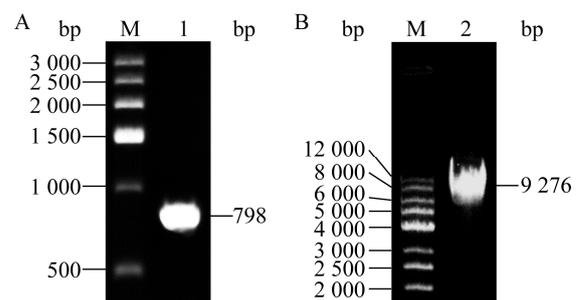


图 1 Rmzhd (A) 和 pPIC9K (B) 酶切回收鉴定

Figure 1 Identification of Rmzhd (A) and pPIC9K (B) by digestion

注: M: GsDL10001 DNA Marker; 1: 胶回收 Rmzhd 酶切产物; 2: 胶回收 pPIC9K 质粒酶切产物。

Note: M: GsDL10001 DNA Marker; 1: The extraction of Rmzhd; 2: The extraction of pPIC9K.

2.2 pPIC9K-Rmzhd 转入毕赤酵母 GS115

将 pPIC9K-Rmzhd 电转入毕赤酵母 GS115, MD 平板筛选菌落。随机选取 5 个菌落, 菌落 PCR 验证 Rmzhd 整合到酵母的基因组中。如图 2 所示, 标记样品 1 为阴性对照 GS115-pPICqK, 2-6 为选取的 5 个菌落。阴性对照中只能看到胶图底部的引物条带, 菌落 PCR 中, 5 个样品都可以扩增出 Rmzhd 片段大小条带。说明随机选取的菌落都为阳性重组菌落。相比提取菌落基因组 DNA 再 PCR 来验证重组基因, 使用菌落 PCR 更加快速和方便^[24]。

2.3 pPIC9K-Rmzhd 在毕赤酵母 GS115 中的筛选、表达和纯化

挑选 MD 平板菌落在 YPD (G418) 平板上进行筛选。给菌落不同强度的抗性压力, 筛选拷贝数和抗性不同的重组子, 期望获得表达量高的菌株^[30]。诱导培养 48 h 后吸取发酵上清液 10 μ L, SDS-PAGE 检测表达情况并检测上清液酶活性。RmZHD 经分泌表达后理论蛋白大小为 30.7 kD, SDS-PAGE 显示蛋白分子质量大小约为 30 kD (图 3A), 与理论值相符。实验中除了菌株 33# 在 G418 为 3 mg/mL 的条件下没有成功生长, 其余都顺利表达蛋白。Rochele 等^[30]的研究中也出现了高浓度抗性条件下菌不生长的情况, 这是由于一开

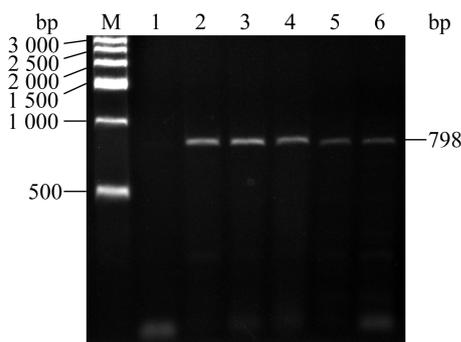


图 2 转化子的 PCR 鉴定结果

Figure 2 Identification of transformants by PCR

注: M: GsDL10001 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2-6: 5 个转化子 PCR 产物。

Note: M: GsDL10001 DNA Marker; 1: Negative control; 2-6: PCR products of 5 different colonies.

始抗性压力太大所致, 如果从低浓度逐步筛选则会缓解这种情况。在 G418 浓度为 0.5 mg/mL 的平板上筛选的菌株表达量较好、活性较高, 因此选择表达量最高的 16# 菌株进行优化表达。

Xiang 等^[29]的研究中发现, 酵母表达 ZHD101 诱导 2 d 后开始出现杂蛋白, 目的蛋白量减少, 蛋白降解很明显。本实验中, 随着诱导时间的延长, 16# 菌株发酵 2 d 后 RmZHD 蛋白表达量最多, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度为 0.15 mg/mL, 3 d 后蛋白含量逐渐降低。有研究表明, 在酵母表达系统中, 诱导表达时间过长, 则菌体的代谢活力会减弱, 且积累的蛋白酶会对目的蛋白产生降解作用^[31]。本实验中表达的 RmZHD 与 Xiang 等^[29]表达的 ZHD101 相比稳定性较好。实验确定 GS115-pPIC9K-Rmzhd 发酵时长 48 h, 并获得了高效表达的菌株。

利用 DEAE 阴离子交换柱对发酵液进行纯化, SDS-PAGE 检测纯化结果, 如图 3B 所示, 纯化的蛋白纯度高, 可用于后续纯酶活性分析。

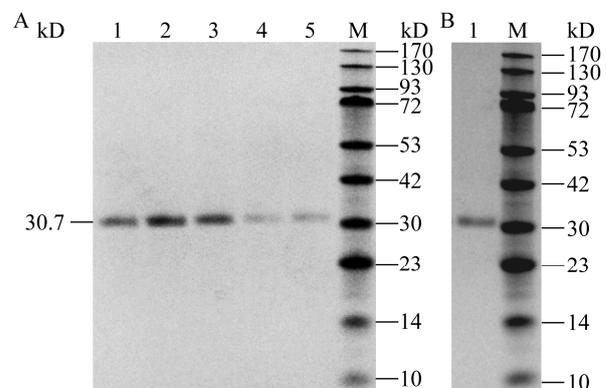


图 3 SDS-PAGE 检测毕赤酵母表达 RmZHD 和纯化结果

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant RmZHD from *P. pastoris*

注: A: 诱导时间对目的蛋白表达量的影响, 1-5: 诱导了 1-5 d 不同诱导时间蛋白的表达量; B: 纯化的 RmZHD 电泳图。M: 蛋白分子量标准。

Note: A: SDS-PAGE analysis of the recombinant RmZHD with different induction time, 1-5 indicated the culture supernatants after being induced with methanol for 1, 2, 3, 4 and 5 days, respectively; B: SDS-PAGE analysis of the recombinant RmZHD after purification. M: Protein molecular weight marker.

2.4 重组 RmZHD 的酶学性质

为考察毕赤酵母 GS115 重组 RmZHD 中发酵产物对 ZEN 的降解能力, 使用 50 μL 上清液反应 1 h 检测 RmZHD 对 12.5 μg ZEN 的降解情况。结果如图 4 所示, 酶反应在前 15 min 对 ZEN 的降解速率较快, 15 min 后趋于平缓, 20 min 可降解 97.39% 的 ZEN, 30 min 后可将 ZEN 完全降解。谭强来等^[25]在 1 mL 的 ZEN-JJM 发酵液中添加 1 μg 的 ZEN, 反应 9 h 后 ZEN 才完全降解。Xiang 等^[29]对 *zhd101* 进行密码子优化、拷贝数筛选、载体修饰等后转入毕赤酵母 GS115 表达, 1 mL 的 ZHD101 发酵液 30 min 降解 10 μg 的 ZEN, 酶活力为 0.33 U/mL。本实验中, 20 μL 发酵上清液反应 15 min 降解了 5.01 μg 的 ZEN, 表明发酵液中重组 RmZHD 对 ZEN 的酶活力为 16.67 U/mL。实验结果表明, 酵母重组 RmZHD 对 ZEN 的降解性能远要优于 ZHD101 以及其他同源蛋白。

本实验检测了 RmZHD 对 α -ZOL 的降解活性, 反应 15 min 降解了 5.91 μg 的 α -ZOL, 测得发酵液中 RmZHD 对 α -ZOL 的酶活力为 9.85 U/mL。有研究发现, 相对于 ZEN, ZHD101 对毒性更高的 α -ZOL 的水解活力只有 40%^[32]。在本实验中, RmZHD 对 α -ZOL 的水解活力是对 ZEN 活力的 60%, 这也说明了 RmZHD 不仅对 ZEN 的降解活性高, 对 α -ZOL 同样也有较高的降解活性。

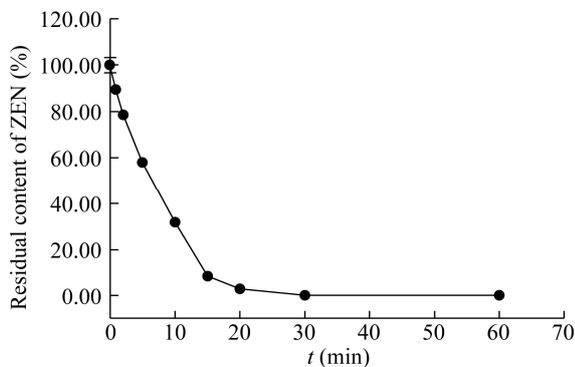


图 4 重组 RmZHD 的降解活性检测
Figure 4 Activity analysis of the recombinant RmZHD

检测 pH 和温度对重组 RmZHD 活性影响的结果如图 5A 所示。在磷酸盐缓冲液 pH 6.0–8.0 之间时, 随着 pH 值的增加, RmZHD 的相对酶活从 43.71% 逐渐升到 95.45%; 在 Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5–9.0 之间, 相对酶活随着 pH 的增加从 68.07%

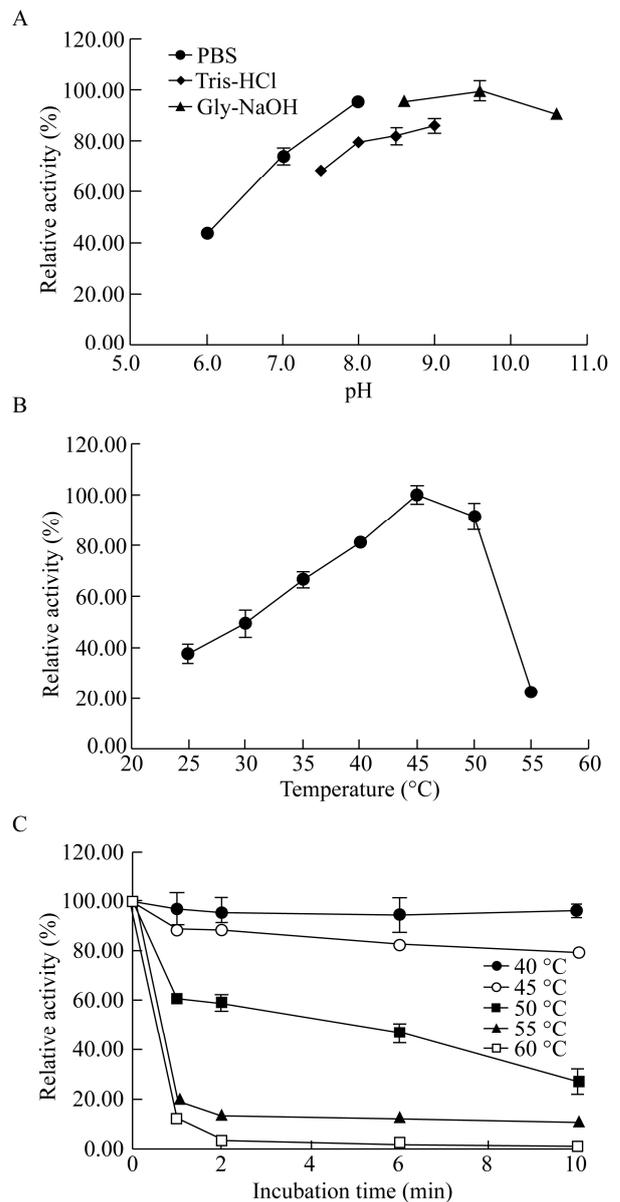


图 5 RmZHD 的酶学性质
Figure 5 Enzymatic properties of RmZHD
注: A: pH 对 RmZHD 活性的影响; B: 温度对 RmZHD 活性的影响; C: RmZHD 的热稳定性。
Note: A: Effect of pH on the activity; B: Effect of temperature on the activity; C: The thermostability of RmZHD.

逐渐升高到 86.13%；当 pH 值增加到 9.6 时酶的活性最高。pH 值继续增加到 10.6 时活性下降，但还保留 91.02% 的相对酶活。说明毕赤酵母表达的 RmZHD 在碱性条件下酶活几乎不受影响。RmZHD 随着反应温度的升高相对酶活从 37.65% 逐渐升高，当温度到 45 °C 时活性最高，温度继续升高则活性逐步下降，当温度为 55 °C 时仅剩余 22.79% 的相对酶活，如图 5B 所示。由此可确定 RmZHD 在 pH 9.6 和温度 45 °C 反应条件下活性最高。

前期对 ZHD101 的热稳定性检测中发现，ZHD101 在 50 °C 加热处理 1 min 后酶活仅剩 30%^[32]。然而，如图 5C 所示，RmZHD 在 40 °C 和 45 °C 加热 10 min 后残余活性与未处理蛋白活性差别不大，加热到 50 °C 才开始失活，加热处理 2 min 之后还有 59.17% 的相对酶活，加热 10 min 后还剩 27.06% 的相对酶活。由此可以看出，在毕赤酵母中表达的 RmZHD 酶热稳定性也优于 ZHD101，更利于 ZEN 水解酶的工业应用。

2.5 大肠杆菌和毕赤酵母表达体系中重组 RmZHD 的性质比较

在大肠杆菌中高效表达的 RmZHD，根据酶活定义计算出其对 ZEN 的水解活力为 441.28 U/mg，对 α -ZOL 的比活力为 244.36 U/mg，1 L 菌可获得 5 mg 蛋白^[27]。酵母表达的 RmZHD 与大肠杆菌相比，对 ZEN 的水解活力为 133.33 U/mg，对 α -ZOL 的比活力为 78.80 U/mg，1 L 发酵液经纯化可得 90 mg 蛋白(表 1)。在大肠杆菌中表达的酶催化效率比酵母菌中高，但 RmZHD 在酵母中的总活力数要高于大肠杆菌，说明酵母表达系统仍具有一定

的优势。

3 结论

本研究对基因 *Rmzhd* 进行了毕赤酵母细胞的异源表达，获得了高效表达菌株。SDS-PAGE 显示表达蛋白纯度高，大小与理论值 30.7 kD 一致。RmZHD 的酶学性质检测显示，在中性偏酸的环境下可以保持 40% 以上的活性，碱性环境对其活性几乎无影响。RmZHD 的最适温度为 45 °C，与大肠杆菌中表达的重组酶的最适温度一致，而 RmZHD 与 ZHD101 相比具有更好的耐热性。酶活检测显示，RmZHD 具有高效降解 ZEN 及其衍生物 α -ZOL 的能力。发酵上清液中 RmZHD 对 ZEN 的酶活力为 16.67 U/mL，对 α -ZOL 的酶活力为 9.85 U/mL，与其他酵母表达的 ZEN 水解酶相比具有较高的降解活性，而且与大肠杆菌系统相比也具有明显优势。

实验结果表明酵母表达的 RmZHD 具有较高的应用潜力，可以通过优化发酵条件、筛选酵母菌株、尝试不同启动子或者使用不同信号肽等方法来进一步提高 RmZHD 的表达量；也可以转化其他食品安全工程菌，期望能进一步改善 RmZHD 酶学性质以利于工业生产。玉米赤霉烯酮作为污染最严重的霉菌毒素之一，在食品和饲料中广泛存在，毒副作用大，对饲料业和家畜养殖业造成了巨大损失，也给人类的生命健康造成了伤害。使用水解酶对玉米赤霉烯酮毒素进行降解是一种高效、绿色、前沿的脱毒方法。RmZHD 的研究将为 ZEN 水解酶工业应用打下良好的工作基础，具有重要的理论研究价值和潜在的商业应用价值。

表 1 毕赤酵母和大肠杆菌中表达 RmZHD 的活性

Table 1 The activities of RmZHD in *P. pastoris* and *E. coli*

表达系统	总蛋白	对 ZEN 的比活力	对 ZEN 的总活力	对 α -ZOL 的比活力	对 α -ZOL 的总活力
Expression system	Protein (mg)	Specific activity against ZEN (U/mg)	Total activity against ZEN (U)	Specific activity against α -ZOL (U/mg)	Total activity against α -ZOL (U)
毕赤酵母 <i>P. pastoris</i>	90	133.33	12.00×10^3	78.80	7.09×10^3
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	5	441.28	2.21×10^3	244.36	1.22×10^3

REFERENCES

- [1] Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals[J]. *Toxicology*, 2001, 167(2): 101-134
- [2] Liew WPP, Mohd-Redzwan S. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 60
- [3] Monyo ES, Njoroge SMC, Coe R, et al. Occurrence and distribution of aflatoxin contamination in groundnuts (*Arachis hypogaea* L.) and population density of *Aflatoxigenic Aspergilli* in Malawi[J]. *Crop Protection*, 2012, 42: 149-155
- [4] Kotowicz NK, Fraç M, Lipiec J. The importance of *Fusarium fungi* in wheat cultivation-pathogenicity and mycotoxins production: a review[J]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2014, 21(2): 3326-3343
- [5] Hueza IM, Raspantini PCF, Raspantini LER, et al. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound[J]. *Toxins*, 2014, 6(3): 1080-1095
- [6] Zhang YY, Jia ZQ, Yin ST, et al. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on uterine capacity and fetal development in gestation rats[J]. *Reproductive Sciences*, 2014, 21(6): 743-753
- [7] Zhou HY, George S, Hay C, et al. Individual and combined effects of aflatoxin B₁, deoxynivalenol and zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 103: 18-27
- [8] Wang N, Li P, Pan JW, et al. *Bacillus velezensis* A2 fermentation exerts a protective effect on renal injury induced by Zearalenone in mice[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 13646
- [9] Pistol GC, Braicu C, Motiu M, et al. Zearalenone mycotoxin affects immune mediators, MAPK signalling molecules, nuclear receptors and genome-wide gene expression in pig spleen[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127503
- [10] Gratz SW, Dinesh R, Yoshinari T, et al. Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins withstand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota *in vitro*[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(4): 1600680
- [11] Piotrowska M, Ślizewska K, Nowak A, et al. The effect of experimental *Fusarium* mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents[J]. *Toxins*, 2014, 6(7): 2064-2081
- [12] Shier WT, Shier AC, Xie WP, et al. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins[J]. *Toxicon*, 2001, 39(9): 1435-1438
- [13] Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 137(3/4): 342-362
- [14] Yiannikouris A, Kettunen H, Apajalahti J, et al. Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three *in vitro* models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30(9): 1641-1650
- [15] Tinyiro SE, Wokadala C, Xu D, et al. Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains[J]. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(4): 321-327
- [16] Liu N, Wang JQ, Liu ZY, et al. Effect of supplemental yeast cell walls on growth performance, gut mucosal glutathione pathway, proteolytic enzymes and transporters in growing broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96(4): 1330-1337
- [17] Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, et al. Microbiologicals for deactivating mycotoxins[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, 50(6): 543-551
- [18] Vekiru E, Hametner C, Mitterbauer R, et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2353-2359
- [19] 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
- [20] Utermark J, Karlovsky P. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 637-642
- [21] Takahashi-Ando N, Ohsato S, Shibata T, 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
- [22] Takahashi-Ando N, 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]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(6): 838-844
- [23] Yang WC, Hsu TC, Cheng KC, et al. Expression of the *Clonostachys rosea* lactonohydrolase gene by *Lactobacillus reuteri* to increase its zearalenone-removing ability[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 69
- [24] Liu HY, Sun CP, Wu SL, 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, 26(5): 12-17 (in Chinese)
刘海燕, 孙长坡, 伍松陵, 等. 玉米赤霉烯酮毒素降解酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(5): 12-17

- [25] Tan QL, Xu F, Li P, et al. Construction of an *ZEN-jjm* expressing vector and its expression in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(12): 1061-1064 (in Chinese)
谭强来, 徐锋, 黎鹏, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶毕赤酵母表达载体的构建及其表达[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1061-1064
- [26] Hu XY, Liu WT, Liu WD, et al. Expression, purification and characterization of a novel zearalenone hydrolase from *Rhinoctadiella mackenziei*[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2585-2591 (in Chinese)
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
- [27] Zheng YY, Liu WT, Chen CC, et al. Crystal structure of a mycoestrogen-detoxifying lactonase from *Rhinoctadiella mackenziei*: molecular insight into ZHD substrate selectivity[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(5): 4294-4298
- [28] Guo YG. Application in *Pichia pastoris* expression system[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2012 (in Chinese)
郭雨刚. 毕赤酵母表达系统及其应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2012
- [29] Xiang L, Wang QH, Zhou YL, 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
- [30] Rochelle A, Karen MP. Liquid PTVA: a faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 29
- [31] Sun WY, Song ZJ, Wang XD, et al. Optimization of fermentation conditions for expression of egg white lysozyme by recombination *Pichia pastoris*[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 54-57 (in Chinese)
孙玮遥, 宋增健, 王向东, 等. 重组毕赤酵母表达蛋清溶菌酶发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 54-57
- [32] Xu ZX, Liu WD, Chen CC, et al. Enhanced α -zearalenol hydrolyzing activity of a mycoestrogen-detoxifying lactonase by structure-based engineering[J]. ACS Catalysis, 2016, 6(11): 7657-7663