

• 生物技术与方法 •

## 玉米赤霉烯酮降解酶多拷贝毕赤酵母菌株的构建及高效表达

王义春, 王龔, 江均平, 赵月菊, 邢福国, 周露

中国农业科学院农产品加工研究所 农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193

王义春, 王龔, 江均平, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶多拷贝毕赤酵母菌株的构建及高效表达. 生物工程学报, 2020, 36(2): 372–380.  
Wang YC, Wang Y, Jiang JP, et al. High expression of zearalenone degrading enzyme in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 372–380.

**摘要:** 通过密码子优化、体外多拷贝构建实现玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 降解酶基因 (*zlh-6*) 在毕赤酵母 GS115 菌株中的高效表达。按酵母密码子偏好性优化 *zlh-6* 基因的密码子, 与  $\alpha$  因子信号肽编码序列一起合成, 插入到 pAO815 质粒中, 通过酶切酶连构建含 1–6 个表达盒的表达质粒, 将其转入毕赤酵母 GS115 菌中, 获得 ZEN 降解酶重组菌株。重组蛋白分子量为 28.9 kDa, 与预期一致。重组菌用甲醇诱导 3 d, 蛋白浓度达最高, 之后下降; 在 pH 5.0、4.5 条件下诱导培养, 表达量最高; 每天添加 0.8% 的甲醇、接种量 10% 表达水平最高; 4 拷贝的转化子表达水平最高, 三角瓶发酵 3 d, 酶活性达到 10 U/mL。在 1 g 玉米渣中添加 0.1–0.5 mL 发酵上清液, 水解 24 h, 玉米渣中 ZEN 的降解率为 44.08%–75.51%。研究结果为 ZEN 降解酶工业生产及在食品饲料中的应用奠定了基础。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮, 降解, *zlh-6*, 高效表达, 多拷贝, 毕赤酵母

## High expression of zearalenone degrading enzyme in *Pichia pastoris*

Yichun Wang, Yan Wang, Junping Jiang, Yueju Zhao, Fuguo Xing, and Lu Zhou

Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Institute of Food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** High expression of zearalenone (ZEN) degrading enzyme gene (*zlh-6*) in *Pichia pastoris* strain GS115 was achieved by codon optimization and multi-copy construction *in vitro*. The codon-optimized *zlh-6* gene sequence was

**Received:** April 20, 2019; **Accepted:** August 23, 2019

**Supported by:** Research Project of Institute of Food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences (No. S2017JC02), Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 5083025), Beijing Food and Economic Crop Industry Innovation Team (No. BAIC09-2018).

**Corresponding authors:** Junping Jiang. Tel: +86-10-62810295; E-mail: 1367858907@qq.com

中国农业科学院农产品加工研究所基本科研业务费 (No. S2017JC02), 北京市自然科学基金 (No. 5083025), 北京市粮经作物产业创新团队基金 (No. BAIC09-2018) 资助。

synthesized with the alpha factor signal peptide coding sequence and inserted into the pAO815 plasmid. The expression plasmid containing 1–6 expression cassettes was constructed by enzyme digestion and transferred into *P. pastoris* GS115 strain to obtain the ZEN degrading enzyme recombinant strain. The molecular weight of the recombinant protein was 28.9 kDa, which was consistent with the theoretical value. After 3 days of induction fermentation, the protein concentration reached the highest level and then decreased; the expression level was the highest in the induction culture at pH 5.0 and 4.5, while the expression level at other pH was very low; the expression level was the highest when 0.8% methanol was added every day and 10% inoculation was added; the expression level of four-copy transformants was the highest, and the enzyme activity reached 10 U/mL after 3 days of flask fermentation. The degradation rate of ZEN in 1 g corn ballast was 44.08%–75.51% when 0.1–0.5 mL fermentation supernatant added and hydrolyzed for 24 hours. The results of this study laid a foundation for improving the industrial fermentation level of ZEN degrading enzyme and its application in eliminating ZEN in food and feed.

**Keywords:** zearalenone, degradation, *zlhy-6*, high-level expression, multi-copies, *Pichia pastoris*

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN), 为 2,4-二羟基苯甲酸内酯类化合物, 主要由禾谷镰刀菌产生的一种霉菌毒素。ZEN 具有雌激素活性, 对生殖发育系统有毒害作用。摄入 ZEN 超标的母猪会出现外阴和乳腺肿大甚至阴道及直肠脱垂的症状<sup>[1]</sup>。ZEN 有致癌性, 能导致 DNA 收敛、染色体断裂<sup>[2]</sup>, 还可能通过雌激素受体通路和抑制凋亡促进人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的体外增殖<sup>[3]</sup>。Yang 等<sup>[4]</sup>研究发现 ZEN 能导致老鼠变态精子数增加、精子的活力下降, 同时受孕降低。梁梓森等<sup>[5]</sup>研究证明 ZEN 有血液毒性, 可导致小鼠淋巴细胞明显减少 ( $P < 0.05$ ), 白细胞及其他各组细胞升高, 血小板数量明显减少。

目前 ZEN 的降解方法主要有物理法 (高压加热<sup>[6]</sup>、辐照<sup>[7]</sup>、吸附剂吸附<sup>[8]</sup>)、化学法 (臭氧、双氧水和碳酸钠处理<sup>[9–11]</sup>) 和生物法 (微生物菌体吸附、酶降解)。传统物理化学方法有一定的局限性, 如破坏营养物质、引入化学物质造成再次污染等。生物学方法具有反应条件温和、无化学试剂残留等优点, 受到了人们的广泛关注。近年来, 随着生物技术的发展, ZEN 的生物降解有了一定进展。许多能降解 ZEN 的菌被分离发现, 其中一些关键酶的基因已被克隆表达。来自粉红黏帚霉 *Gliocladium roseum* 的 ZEN 降解酶基因 *zhd101*、*zlhy-6*、*ZEN-jjm* 被成功克隆表达, 重组蛋白均表现出较强的水解 ZEN 的能力<sup>[12–18]</sup>, 粗

糙脉孢 *Neurospora crassa* ZEN 水解酶基因 (ZNC) 也获得了较高表达<sup>[19]</sup>。柴成梁等<sup>[20]</sup>分离到一种高比活玉米赤霉烯酮降解酶 ZHD795, 其比活是粉红黏帚霉 ZEN 降解酶的 2.5 倍。将 ZEN 降解酶基因转入玉米也有降解 ZEN 的活性<sup>[21]</sup>。另外, 不动杆菌过氧化物酶也具有降解 ZEN 的能力<sup>[22]</sup>。但总的说来, 玉米赤霉烯酮降解酶发酵水平还不高, 还需要进一步提高产酶水平降低生产成本。

毕赤酵母表达系统是目前使用最多、最广泛的生产外源蛋白的工具之一<sup>[23]</sup>, 其表达载体 pAO815 能体外构建多拷贝质粒, 可以方便获得多拷贝菌株。据报道粉红黏帚霉降解酶的最适反应温度为 37 °C, 最适反应 pH 值为 8.5, 在 50 °C 以下稳定, 并对酸性环境有一定耐受能力, 对玉米醪中的 ZEN 的降解率达 72.70%, 具有潜在的实用价值<sup>[24]</sup>。本研究对该酶的密码子进行优化, 体外构建多拷贝表达载体, 以期获得高效表达菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株

*E. coli* TOP10 感受态细胞, 购自北京全式金生物技术有限公司; pAO815 质粒、*Pichia pastoris* GS115 菌株由本实验室保存。

### 1.1.2 试剂

限制性内切酶 (*EcoR* I、*Bgl* II、*Bam*H I、*Sal* I)、*Pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自日本 TaKaRa 公司;小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 购自 NEB 公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自北京三博远志公司; YNB 购自 BD 公司; D-山梨醇、ZEN 标准品购自 Sigma 公司; 玉米碴购自超市发; 乙腈、甲醇 (色谱级) 购自美国 Fisher 公司; 其他分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.1.3 仪器与器材

紫外凝胶成像仪, 美国 Alpha Innotech 公司; 凝胶电泳仪, 北京百晶生物技术有限公司; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; PCR 扩增仪, 日本 TaKaRa 公司; 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; C18 液相色谱柱, 美国 Agilent 公司; 电击转化仪, 美国 BTX 公司; 恒温振荡摇床, 上海智诚公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 表达载体的构建

单拷贝表达载体构建: 编码粉红黏帚霉 *G. roseum* 玉米赤霉烯酮降解酶基因 *zlhy-6* (NCBI GenBank 登录号: HQ825318) 按 *P. pastoris* 酵母偏好密码子优化, 和  $\alpha$  信号肽编码序列整体 ( $\alpha$ -*zlhy-6*) 化学合成, 并在  $\alpha$ -*zlhy-6* 片段 5'-、3'-端分别引入 *Mfe* I、*EcoR* I 酶切位点。pAO815 质粒用 *EcoR* I 酶切、CIP 去磷酸化, 含  $\alpha$ -*zlhy-6* 片段的质粒用 *Mfe* I / *EcoR* I 酶切, 电泳回收基因片段, 基因片段和载体按摩尔比 3:1-5:1 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态, 用氨苄青霉素筛选阳性克隆, 测序, 选择插入方向正确的 pAO815- $\alpha$ -*zlhy-6* 表达载体。

多拷贝表达载体的构建: 以质粒 pAO- $\alpha$ -*zlhy-6* 为模板, 用引物 (GGAagatctAACATCCAAAGACG/TAGgatccGCACAAACGAAC, 小写字母为引入的 *Bgl* II 和 *Bam*H I 酶切位点) PCR 扩增得到完整表达

框 5'AOX- $\alpha$ -*zlhy-6*-3'AOX-TT3'; PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。用试剂盒纯化回收扩增产物, 连接到 pGM-T 载体, 测序, 获得正确的 pGM-5'AOX- $\alpha$ -*zlhy-6*-3'AOX-TT3'质粒。该质粒经 *Bgl* II、*Bam*H I 双酶切, 回收表达框, 与经 *Bam*H I 酶切、CIP 去磷酸化的 pAO- $\alpha$ -*zlhy-6* 质粒酶连, 得到含 2 个表达盒的 pAO-( $\alpha$ -*zlhy-6*)<sub>2</sub> 表达载体。获得的 2 拷贝表达载体再与 2 拷贝表达框进行酶切、酶连、转化, 如此反复制备 4 拷贝、6 拷贝的表达载体。

### 1.2.2 玉米赤霉烯酮降解酶重组酵母菌株的构建及鉴定

毕赤酵母 GS115 感受态的制备及电击转化按文献[25]进行。表达载体用 *Sal* I 线性化, 电击转化感受态, 取 20  $\mu$ L 复苏培养菌液涂布 MD 平板, 30 °C 倒置培养 3-5 d, 随机从 MD 平板上挑取 5 个单菌落, 分别接入 5 mL BMGY 培养基中, 30 °C、250 r/min 培养 36 h, 500 $\times$ g 室温离心 5 min 收集菌体。菌体用 2 mL BMMY 培养基重悬, 30 °C、250 r/min 诱导培养 5 d, 期间每隔 24 h 补加甲醇至 0.5%, 培养结束后, 12 000 $\times$ g 离心 5 min 收集上清液, 用 SDS-PAGE 分析表达蛋白, 采用串联质谱 (MS-MS) 分析表达蛋白的分子量。

为比较不同拷贝转化子的蛋白表达量, 用相同菌密度的转化子在同体积的 BMMY 培养基中诱导培养, 设 3 个重复。取 15  $\mu$ L 发酵上清液进行 SDS-PAGE, 利用凝胶图像分析软件 BandScan 5.0 分析蛋白带的总灰度, 以相对灰度值表示, 将 1 拷贝转化子的重组蛋白灰度值设为 100。

### 1.2.3 重组菌诱导时间对蛋白表达的影响

将成功表达重组蛋白的酵母菌株于 50 mL BMGY 培养基中, 30 °C、250 r/min 培养  $OD_{600}$  至 2-6, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 将菌体转移至 BMMY 培养基中, 以相同的菌密度, 30 °C、250 r/min 诱导培养 5 d, 期间每隔 24 h 取样, 并补加甲醇至终浓度 0.5%, 实验设 3 个重复。取

15  $\mu\text{L}$  样品进行 SDS-PAGE, 利用凝胶图像分析软件 BandScan 5.0 对重组蛋白的总灰度进行分析, 以相对灰度值表示, 诱导培养 1 d 的蛋白的灰度值设为 100。

#### 1.2.4 发酵 pH、甲醇添加量、接种量对重组菌表达效果的影响

参照 1.2.3 培养方法, 考察诱导 pH (将诱导培养基的初始 pH 分别调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 并在培养过程中添加少量酸碱使发酵液 pH 基本保持不变)、甲醇添加量 (甲醇体积分数为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.6% 的诱导培养基上进行培养, 每 24 h 分别补甲醇至初始浓度)、接种量 (初始接种量分别设为 2%、4%、6%、8%、10%) 对蛋白表达的影响。不同条件下培养 3 d 后收集上清液, 取 15  $\mu\text{L}$  样品进行 SDS-PAGE, 比较不同条件下上清液中的蛋白量。

#### 1.2.5 重组蛋白 ZEN 降解活性测定

发酵上清液 40  $\mu\text{L}$ 、0.5 mg/mL ZEN 40  $\mu\text{L}$ 、0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 920  $\mu\text{L}$ , 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min<sup>[15]</sup>, 加入等体积甲醇终止反应, HPLC 检测 ZEN 残留量。酶活力定义: 在上述条件下, 每毫升发酵液每分钟降解 1  $\mu\text{g}$  ZEN 为 1 个活力单位 (U)。在相同反应体系下, 测定 0、30、60、120 min 时 ZEN 的降解率。

#### 1.2.6 玉米碴中 ZEN 的降解

向玉米碴中添加 ZEN 使其含量为 2 mg/kg, 用缓冲液将酶液分别稀释 2、5、10 倍, 按照发酵液与玉米碴 (V:W) 1:1 的比例混合均匀 (即酶液添加量分别为 0.1、0.2、0.5 mL/g), 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 0、3、6、12、24 h, 不加酶液作为对照。按照国标 GB/T 23504-2009<sup>[26]</sup> 提取样品中的 ZEN, HPLC 检测 ZEN 的残留量。

#### 1.2.7 ZEN 的 HPLC 检测条件

高效液相色谱采用 C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、荧光检测器 2475 型, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流动相为乙腈-水 (60:40, V:V), 流速 1.0 mL/min, 进样体积 20  $\mu\text{L}$ , 激发波长 274 nm, 发射波长 440 nm。

#### 1.2.8 数据分析

采用 DPS3.01 数据处理系统对实验测得的数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因密码子优化

*zlh-6* 基因按 *P. pastoris* 偏好密码子优化, GC 含量为 49.9%, 密码子适应指数 (CAI) 为 0.81, 和  $\alpha$  信号肽编码序列整体 ( $\alpha$ -*zlh-6*) 化学合成 (图 1)。

```
caattgatgagatttctcaatttttactgcagttttattcgcagcatctccgcattagctctccagtcacaactacacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgcatcgggtactcagattagaag
gggatctgatgttctgttttccattttccaacagcacaataacgggtattgtttataaataactactattgccagcattgctctaaagaagaagggtatctctcgaaaaagaggctgaagctATGAGA
ACTCGTTCACACTATTTCACCTCTAACGGTATCACCTGGTACTACGAGCAAGAGGGTACTGGTCCAGACGTCGTACTIONTGTTCCTG
ACGGTTTAGGTGAATGTCAGATGTTTCGACAGATCCGTCTCTCAAATCGCAGCTCAGGGTTTCAGAGTCACTACCTTCGACATGCC
AGGTATGTCCAGATCCGTC AAGGCTCCACCTGAGACTTACACTGAAGTAACCGCTCAAAAAGCTGGCCTCTTACGTCATTCCGT
TCTGGACGCTTTGGACATTAAGCAGCTACTGTCTGGGGTTGCTCTTCTGGTGCTAGTACTGTTGTCGCTTTATTGCTCGGCTACC
CTGACAGAATCAGAAAAGCTATGTGTCACGAGTTGCCAACCAAGCTTTTGGACCACCTTTCTAATACCGCCGTTTTGGAAGATG
AGGAAATCTCTAAAATCTTGCTAACGTTATGCTTAACGACGCTCCTCCGAGGTTTCTGAAGCTTGCAAGCCATGGGTGACGAAG
TCCACGCCAGATTGCACAAGAATTACCCAGTCTGGCCAGAGGATACCCAAGAAGTATCCACCCCTCCGCTCCAGTTAAGGACT
TGGAAGCCTTGCGTGGTAAGCCATTAGACTGGACCGTTGGTGCTGCTACTCCAACCGAATCCTTCTTCGACAACATCGTTACTGC
CACCAAGGCTGGTGTAAACATCGGTCTGTTGCCAGGTATGCACTTCCATACGCTCTCCACCCAGACGCTCTCGCCAAATACGTT
GTCGAGTTCACGCAGAAGTACTTGTAAGaattc
```

图 1 *zlh-6* 基因优化序列

Fig. 1 The optimized gene *zlh-6*. The capitals: the optimized gene *zlh-6*; the lowercase letters: the gene of  $\alpha$  signal peptide.

## 2.2 单拷贝表达载体构建

将合成的  $\alpha$ -zlhy-6 片段质粒用 *Mfe* I / *Eco*R I 酶切,电泳回收基因片段;pAO815 质粒用 *Eco*R I 酶切、CIP 去磷酸化,将基因片段和载体按摩尔比 3:1-5:1 用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态,提取质粒,测序,获得插入方向正确的 pAO815- $\alpha$ -zlhy-6 表达载体 (图 2)。

## 2.3 多拷贝表达载体的构建与鉴定

将连接到 pGM-T 上的表达框用 *Bam*H I 与 *Bgl* II 双酶切回收,与表达质粒 pAO- $\alpha$ -zlhy-6 连接,转化,获得 2 拷贝表达载体 pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>2</sub>;再将 2 拷贝表达载体用 *Bam*H I / *Bgl* II 双酶切,回收 2 拷贝表达框,与 2 拷贝表达框骨架酶连,得到 4 拷贝表达载体 pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>4</sub>;再将 2 拷贝表达框与 4 拷贝表达载体骨架酶连,得到 6 拷贝表达载体 pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>6</sub>。空载体、1 拷贝、2 拷贝、4 拷贝、6 拷贝表达载体分别为 7.8 kb、8.8 kb、11.1 kb、15.8 kb、20.5 kb,经 *Bam*H I 酶切电泳结果如图 2A 所示,随拷贝数的增加其分子量递增,*Bgl* II / *Bam*H I 双酶切结果如图 2B 所示,1 拷贝质粒产生约 4.0 kb (含组氨酸编码序列)、2.4 kb (含抗氨苄青霉素编码序列)及 2.35 kb (单拷贝表达框 5'AOX- $\alpha$ -zlhy-6-3'AOX-TT3') 3 个片段 (单拷贝表达框与抗氨苄序列大小相当,电泳分不开,两片段重叠),2、4、6 拷贝重组质粒分别出现 4.7 kb、9.4 kb 和 14.1 kb 的片段,表明多拷贝表达盒表达载体构建成功。

## 2.4 玉米赤霉烯酮降解酶重组酵母菌株的构建及鉴定

将表达质粒用 *Sal* I 线性化,电击转化 *P. pastoris* GS 115 感受态细胞,从 MD 筛选平板上随机挑取 5 个转化子用 BMMY 培养基培养,用 0.5% 甲醇诱导 5 d,用 SDS-PAGE 分析发酵上清液蛋白表达情况。结果表明 1-6 拷贝重组菌在分子量 30 kDa 附近均有一条蛋白带,而空载体 pAO815 重组酵母菌株无目标带 (图 3)。经 MS-MS 分析,该蛋白的分子量为 28.9 kDa,与理论分子

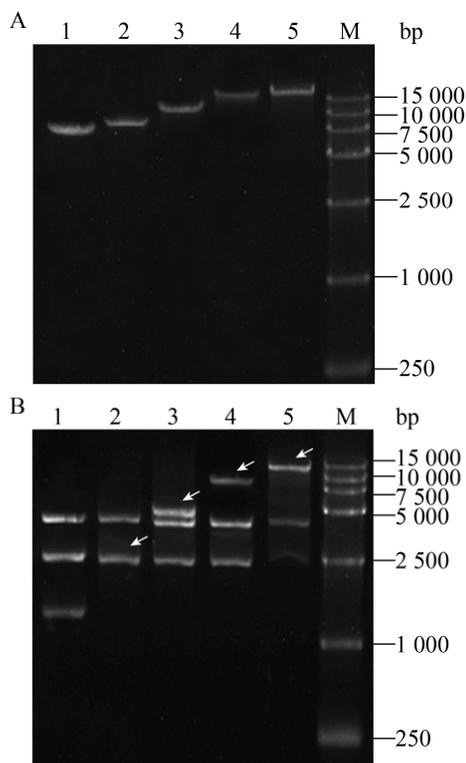


图 2 多拷贝表达载体酶切电泳分析图

Fig. 2 Analysis of constructed plasmids with restriction endonucleases. (A) Hydrolyzed by *Bam*H I. (B) Hydrolyzed by *Bgl* II / *Bam*H I. M: DNA marker; 1: pAO815; 2-5: pAO- $\alpha$ -zlhy-6, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>2</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>4</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>6</sub>; arrow: expression cassettes.

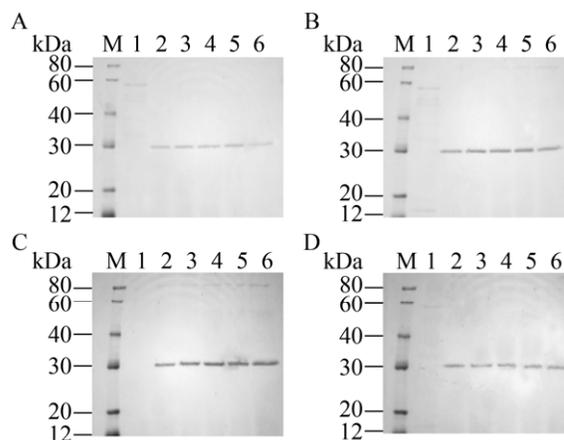


图 3 重组酵母的筛选

Fig. 3 Selection of recombinant GS115 transformants. (A-D) Harboring pAO- $\alpha$ -zlhy-6, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>2</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>4</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlhy-6)<sub>6</sub>. M: protein marker; 1: transformant with pAO815; 2-6: fermentation for 1-5 days.

量 (28.92 kDa) 一致, 说明 1-6 拷贝玉米赤霉烯酮降解酶重组酵母菌构建成功。

## 2.5 拷贝数对重组蛋白表达水平的影响

从不同拷贝数的转化子中各选出 1 株表达量高的菌株, 采用相同菌浓度用 BMMY 培养基 30 °C、250 r/min 诱导培养 3 d (每 24 h 补加 0.5% 甲醇), 用 SDS-PAGE 分析上清液中的蛋白。结果表明 4 拷贝菌株表达量最高, 约为单拷贝转化子的 3.4 倍 (图 4)。

## 2.6 重组菌表达蛋白最佳诱导时间

取 4 拷贝的重组菌用 BMMY 培养基 30 °C、250 r/min 诱导培养 5 d, 每 24 h 补加 0.5% 甲醇, 24 h 即产生可观的蛋白, 第 3 天表达量达到最高

(灰度值达 142.43%), 此后, 重组蛋白又逐渐降低, 第 5 天降至 122.49% (图 5), 结果表明最佳培养时间为 3 d, 超过 3 d 重组蛋白会发生降解。

## 2.7 pH、甲醇添加量、接种量对重组菌表达效果的影响

pH、甲醇添加量、接种量对 4 拷贝重组菌蛋白表达效果的影响如图 6 所示。当 pH 为 4.5-5.0 时, 蛋白表达量较高, 而在其他 pH 条件下, 表达量很低甚至几乎不表达。甲醇浓度在 0.6%-1.2% 时, 蛋白均能得到较高的表达量, 其中 0.8% 的甲醇浓度最佳。接种量在 2%-10% 范围时, 随着接种量的增加表达量有所增加, 当接种量达到 10% 时, 表达量最高。

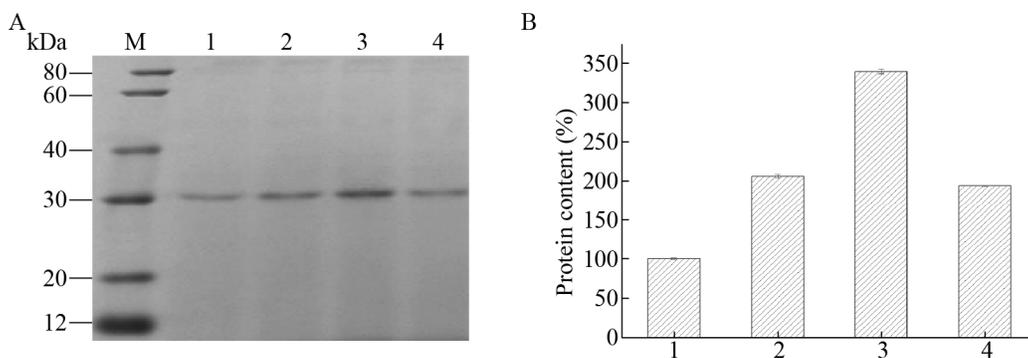


图 4 拷贝数对蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of gene copies on protein expression level. (A) SDS-PAGE of supernatant of transformant harboring different gene copies. (B) Gray value of protein band. 1-4: pAO- $\alpha$ -zlh $y$ -6, pAO-( $\alpha$ -zlh $y$ -6)<sub>2</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlh $y$ -6)<sub>4</sub>, pAO-( $\alpha$ -zlh $y$ -6)<sub>6</sub>.

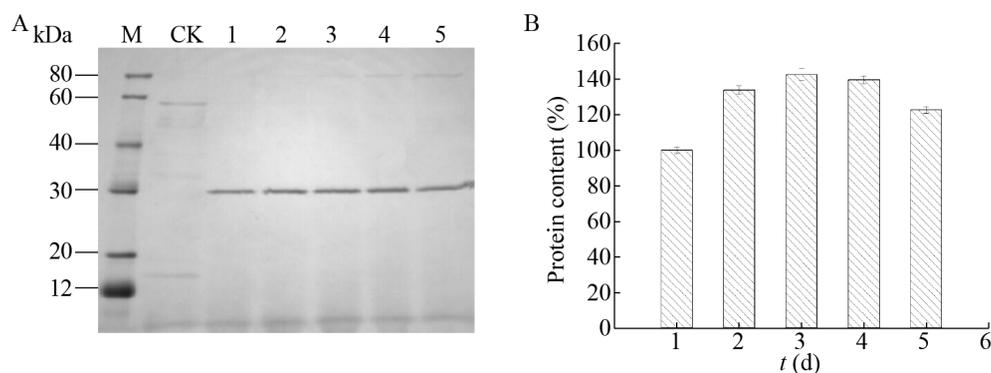


图 5 诱导时间对重组菌株蛋白表达的影响

Fig. 5 Expression time-course of protein in *P. pastoris*. (A) SDS-PAGE of supernatant of transformant. (B) Gray value of protein band. M: protein marker; ck: pAO815; 1-5: fermentation for 1-5 days.

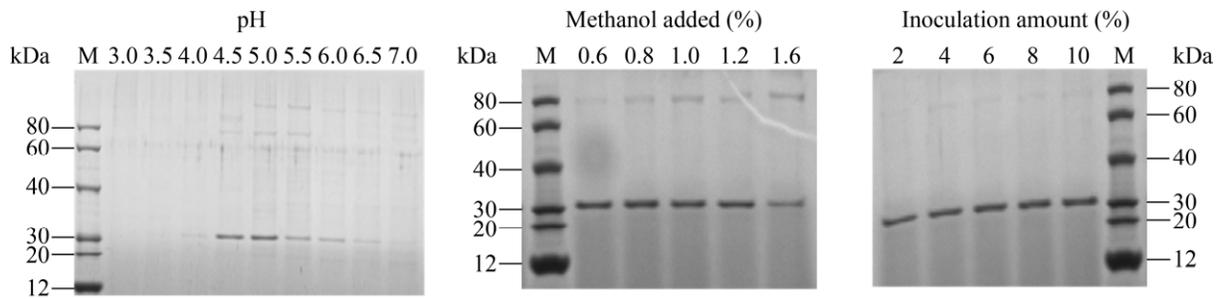


图6 pH、甲醇添加量及接种量对蛋白表达量的影响

Fig. 6 Effect of pH, methanol and inoculation amount on protein expression.

## 2.8 发酵液 ZEN 降解活性

重组菌酵母菌株经诱导培养 3 d, 1 拷贝、2 拷贝、4 拷贝、6 拷贝转化子发酵上清液 ZEN 降解活性分别为 3.0、6.0、10、6.0 U/mL, 结果与转化子的蛋白表达量一致 (图 4)。酶解时间曲线表明反应 1 h 体系中 ZEN 降解 99% 以上, 而空质粒对照菌株的发酵液无 ZEN 降解 (图 7)。刘海燕等<sup>[15]</sup>在检测重组酶活性时, 在 1 mL 反应体系中添加 980  $\mu$ L 上清液 (ZEN 终浓度 20  $\mu$ g/mL), 反应 2 h ZEN 明显降解; 在相同条件下, 本研究只添加了 2/49 的发酵上清液, 作用 1 h ZEN 就被有效降解, 表明本研究所构建的多拷贝菌株发酵液酶活性大约是他们报道<sup>[15]</sup>的 49 倍。

## 2.9 玉米碴中 ZEN 的降解

不少酶制剂作为添加剂应用于食品、饲料中, 如溶菌酶、植酸酶等。但是 ZEN 降解酶在食品饲料中应用的报道还较少, 因此本试验用酶发酵液对含 ZEN (2 mg/kg) 的玉米碴进行处理, 初步考察其在饲料中的降解效果。玉米碴中酶液的添加量分别设为 0.1、0.2 和 0.5 mL/g。结果如图 8 所示, 随着时间延长, 样品中 ZEN 含量逐渐降低, 反应前 6 h 降解速率较快, 6 h 以后降解速率趋于平缓。酶的添加量越高降解速率越快, 降解率也越高。当酶的添加量为 0.1 mL/g 时, 反应 6 h, ZEN 的降解率仅为 14.28%, 反应 24 h 后, ZEN 的降解率为 44.08%。当酶的添加量为 0.5 mL/g 时, 处理 6 h, ZEN 的降解率即达到 64.29%, 处理 24 h,

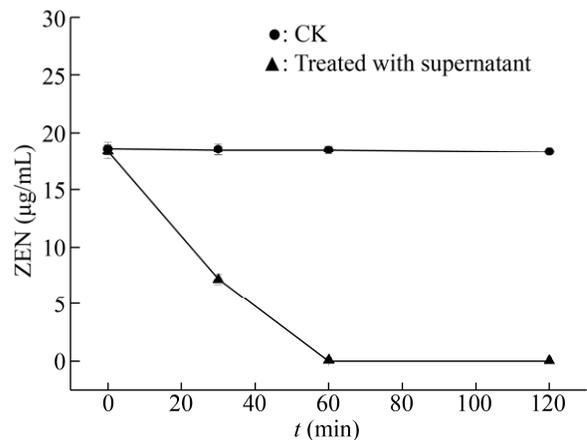


图7 重组菌发酵上清液降解 ZEN 时间进程

Fig. 7 Time course of ZEN hydrolyzed by recombinant enzyme.

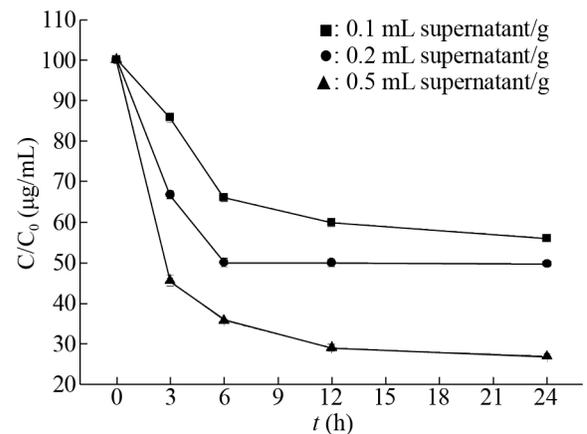


图8 玉米碴中 ZEN 降解时间进程

Fig. 8 Time course of ZEN in corn hydrolyzed by recombinant enzyme.

玉米碴中 ZEN 的降解率为 75.51%。数据表明, 该酶对玉米碴中 ZEN 有较好的降解效果。

### 3 结论

本试验对玉米赤霉烯酮降解酶基因序列 zlhy-6 按照毕赤酵母密码子偏好性进行优化, 与  $\alpha$ -信号肽编码序列整体合成, 并用 pAO815 质粒构建了多拷贝表达载体, 将其电击转入毕赤酵母 GS115 菌株, 获得 ZEN 降解酶高效分泌表达重组菌。重组蛋白分子量为 28.9 kDa, 与理论值一致。重组菌诱导发酵 3 d, 蛋白带浓度达最高, 之后下降; 在 pH 5.0、4.5 条件下诱导培养, 表达量最高, 其他 pH 表达量很少; 每天添加 0.8% 的甲醇、接种量 10% 表达水平最高; 4 拷贝的转化子蛋白表达水平最高, 发酵 3 d, 酶活性达到 10 U/mL, 约是文献[15]报道的 49 倍。在 1 g 玉米碴中添加 0.1–0.5 mL 发酵上清液, 水解 24 h, ZEN 的降解率为 44.08%–75.51%。

本研究结果为提高 ZEN 降解酶工业发酵水平及酶的应用奠定了一定基础, 也为该酶用于降解食品饲料中的 ZEN 提供一定的理论参考。但是, 该酶的最适作用 pH 为 8.5, 最适反应温度为 37 °C<sup>[25]</sup>, 而食品、饲料的 pH 一般为中性偏酸性, 消化道中的 pH 更低, 此外, 该酶不耐热, 在生产和应用时酶活性会降低, 所以, 有必要通过一定手段, 如定点突变、定向进化、结构延伸突变、糖基化修饰及杂合酶等方法降低酶的最适 pH、提高酶的热稳定性, 从而改善酶的性质, 促进 ZEN 降解酶在食品、饲料中的应用。

### REFERENCES

- [1] He QH, Xu Y. Advance in study on zearalenone's toxicity and determination. *J Hyg Res*, 2005, 34(4): 502–504 (in Chinese).  
何庆华, 许杨. 玉米赤霉烯酮毒性研究及检测方法进展. *卫生研究*, 2005, 34(4): 502–504.
- [2] Kouadio JH, Dano SD, Moukha S, et al. Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicol*, 2007, 49(3): 306–317.
- [3] Zheng JC, Xiao XM, Zheng S, et al. Effects of zearalenone on the proliferation of SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Chin J Prev Med*, 2007, 41(4): 295–298 (in Chinese).  
郑继翠, 肖现民, 郑珊, 等. 玉米赤霉烯酮对 SK-N-SH 人神经母细胞瘤细胞增殖的影响. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(4): 295–298.
- [4] Yang JY, Wang GX, Liu JL, et al. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(3/4): 381–387.
- [5] Liang ZS, Liu CY, Ma YJ, et al. Effects of zearalenone on hematological and biochemical parameters in mice. *Progr Vet Med*, 2010, 31(5): 79–82 (in Chinese).  
梁梓森, 刘长永, 马勇江, 等. 玉米赤霉烯酮对小鼠血常规及血液生化指标的影响. *动物医学进展*, 2010, 31(5): 79–82.
- [6] Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol*, 2007, 119(1/2): 140–146.
- [7] Aziz NH, El-Far FM, Shahin AAM, et al. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B<sub>1</sub> in seeds by gamma-irradiation. *Food Control*, 2007, 18(11): 1337–1342.
- [8] Afriyie-Gyawu E, Wiles MC, Huebner HJ, et al. Prevention of zearalenone-induced hyperestrogenism in prepubertal mice. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 2005, 68(5): 353–368.
- [9] McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35(8): 807–820.
- [10] Abd Alla SAM. Zearalenone: Incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. *Nahrung*, 1996, 41(6): 362–365.
- [11] Trenholm HL, Charmley LL, Prelusky DB, et al. Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(11): 2147–2151.
- [12] Takahashi-Ando N, Ohsato S, Shibata T, et al.

- Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3239–3245.
- [13] Kakeya H, Takahashi-Ando N, Kimura M, et al. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(12): 2723–2726.
- [14] Cheng BC, Shi WT, Luo J, et al. Cloning of zearalenone-degraded enzyme gene (*ZEN-jjm*) and its expression and activity analysis. J Agric Biotechnol, 2010, 18(2): 225–230 (in Chinese).  
程波财, 史文婷, 罗洁, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶基因 (*ZEN-jjm*) 的克隆、表达及活性分析. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 225–230.
- [15] Liu HY, Sun CP, Wu SL, et al. Expression of zearalenone degrading enzyme gene from gliocladium roseum in *Pichia pastoris* GS115. J Chin Cereals Oils Assoc, 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. 中国粮油学报, 2011, 26(5): 12–17.
- [16] Tan QL, Xu F, Li P, et al. Construction of an *ZEN-jjm* expressing vector and its expression in *Pichia pastoris*. Chin J Microecol, 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. 中国微生物学杂志, 2010, 22(12): 1061–1064.
- [17] Wang RF, Zhou JG, Hu XJ, et al. Expression of ZHD101 in *Kluyveromyces marxianus* and the mutation breeding of high-field strain. J Fudan Univ: Nat Sci, 2017, 56(4): 431–437 (in Chinese).  
王壬丰, 周峻岗, 胡小健, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶在马克斯克鲁维酵母中的表达及高产菌株的诱变筛选. 复旦学报: 自然科学版, 2017, 56(4): 431–437.
- [18] La X, Wang QH, Zhou YL, et al. High-level expression of a *ZEN*-detoxifying gene by codon optimization and biobrick in *Pichia pastoris*. Microbiol Res, 2016, 193: 48–56.
- [19] Bi K, Zhang W, Xiao ZZ, et al. Characterization, expression and application of a zearalenone degrading enzyme from *Neurospora crassa*. AMB Expr, 2018, 8(1): 194.
- [20] Chai CL, Chang XJ, Wang NX, et al. Cloning of *ZEN*-degrading enzyme ZHD795 and study on degradation activity. J Food Sci Technol, 2018, 36(6): 28–32 (in Chinese).  
柴成梁, 常晓娇, 王楠希, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶 ZHD795 编码基因克隆及降解活性研究. 食品科学技术学报, 2018, 36(6): 28–32.
- [21] 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. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(5): 1622–1629.
- [22] Tang YQ, Xiao JM, Chen Y, et al. Secretory expression and characterization of a novel peroxiredoxin for zearalenone detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Res, 2013, 168(1): 6–11.
- [23] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(1): 31–39.
- [24] Hao XL. Fermentation optimization and application of zearalenone-degrading engineering strain[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2013 (in Chinese).  
郝小龙. 玉米赤霉烯酮降解工程菌的发酵优化及其应用[D]. 郑州: 河南工业大学, 2013.
- [25] Wu SX, Letchworth GL. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. Biotechniques, 2004, 36(1): 151–154.
- [26] Zhang HZ, Dong JJ, Lv N, et al. Determination of zearalenone in foods by immunoaffinity chromatography purification high performance liquid chromatography. GB/T 23504-2009. Issuance Department: National Standardization Management Committee, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, 2009 (in Chinese).  
张辉珍, 董建军, 吕宁, 等. GB/T 23504-2009 食品中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法. 颁发部门: 国家标准化管理委员会, 国家质量监督检验检疫总局, 2009.

(本文责编 郝丽芳)