doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2018.02.007

生物酶降解真菌毒素的研究进展

卢　丹[1],徐　晴[2],江　凌[3],黄　和[2]

(1.南京工业大学 生物与制药工程学院,江苏 南京 211800;2.南京工业大学 药学院,江苏 南京 211800;
3.南京工业大学 食品与轻工学院,江苏 南京 211800)

摘　要:真菌毒素是真菌在其生长代谢中产生的一种次级代谢物,已成为食品和饲料行业中广泛存在的污染源。降解真菌毒素是食品工业和农业中的一个重要课题。随着生物技术的发展,生物脱毒逐渐取代传统的物理、化学脱毒成为了真菌毒素降解的主流方法。目前,已经有很多的微生物被证实能够降解一些真菌毒素。本文中,笔者将针对一些常见的真菌毒素进行总结归纳,对其特征进行概述,并列举其相应的生物降解方法。另外,总结了一些与真菌毒素相关的新的酶或微生物,并对一些新的技术(如蛋白质工程等)在真菌毒素降解中的应用进行讨论。

关键词:真菌毒素;酶降解;蛋白质工程;食品安全

中图分类号:Q814　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1672-3678(2018)02-0049-08

Advances in enzymatic detoxification of mycotoxins

LU Dan[1],XU Qing[2],JIANG Ling[3],HUANG He[2]

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering,Nanjing Tech University,Nanjing 211800,China;
2. College of Pharmaceutical Science,Nanjing Tech University,Nanjing 211800,China;
3. College of Food Science and Light Industry,Nanjing Tech University,Nanjing 211800,China)

Abstract:Mycotoxin is a type of secondary metabolite of fungi, and widely exists as a pollutant in agriculture and food products.Therefore eliminating mycotoxins is an important challenge in food industry. With the development of biotechnology, biodegradation has become a potential alternative of traditional physical/chemical degrading methods. Comparing with those traditional method, biodegradation of mycotoxins is more effective, environmental-friendly and safer.In this review, some general mycotoxins and their biodegradation are discussed and current researches, including new-developed microbes/enzymes and the application of advanced technologies (such as protein engineering), are introduced.

Keywords:mycotoxin; enzymatic degradation;protein engineering;food safety

真菌毒素是由曲霉菌属、镰刀菌属或青霉菌属在生长繁殖过程中产生的有毒次级代谢产物,能够污染几乎所有种类的食用、饲用农产品以及中草药等,严重危害人畜健康。据统计,全球 25%的粮食作物受到真菌毒素的污染,造成的经济损失达数千亿美元/年;我国每年在生产、储存、运输、销售过程

收稿日期:2017-12-08　**修回日期**:2018-03-02

基金项目:江苏省高等学校自然科学基金(17KJB416005);江苏省高校重点建设实验室项目(苏教科[2016]8)

作者简介:卢　丹(1993—),女,江苏淮安人,硕士研究生,研究方向:生物工程;黄　和(联系人),教授,Email:biotech@njtech.edu.cn

引文格式:卢丹,徐晴,江凌,等.生物酶降解真菌毒素的研究进展[J].生物加工过程,2018,16(2):49-56.
LU Dan,XU Qing,JIANG Lin,et al.Advances in enzymatic detoxification of mycotoxins[J].Chin J Bioprocess Eng,2018,16(2):49-56.

中受到真菌毒素污染的粮食有 3 100 多万 t[1]。因此,如何有效控制和消除食品、饲料中的各类真菌毒素,成为食品、饲料行业亟待解决的问题。

1 真菌毒素的种类和特征

据统计,目前对玉米、大豆、小麦以及饲料污染最严重的真菌毒素主要有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素和呕吐毒素,这几种毒素的控制和降解成为各国政府关注的焦点。

1.1 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(aflatoxin,AF)是由曲霉产生的一种二呋喃氧杂萘邻酮的衍生物,在紫外光下可发出荧光,根据荧光颜色的差异,分为黄曲霉毒素 B(AFB 蓝色荧光)、黄曲霉毒素 G(AFG 绿色荧光)和黄曲霉毒素 M(AFM 蓝紫色荧光)等[2]。黄曲霉毒素是目前发现的化学致癌物中最强的物质之一,主要通过损害肝脏导致肝癌。此外,黄曲霉毒素还可诱发直肠癌、乳腺癌和骨癌等,其一般存在于玉米、花生、棉籽、稻谷以及大豆等多种农作物中,以玉米和花生中的污染最为严重。而在黄曲霉毒素的几种构型中,AFB_1 的毒性最强[3],AFM_1、AFG_1、AFB_2 和 AFG_2 的毒性相对较弱。目前,全球已有 100 多个国家和地区针对食品和饲料中黄曲霉毒素的限量制定了相关标准。美国标准规定 AFM_1 在牛奶和饲料中的含量分别不能超过 0.5 和 300 μg/kg,而 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 在食品中的总量不超过 20 μg/kg[4];欧盟标准规定乳制品中 AFM_1 含量不能超过 0.05 μg/kg,食用花生仁中 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 总含量不超过 4 μg/kg[5]。我国也对黄曲霉毒素在各类农产品和食品中的含量有着严格的标准,根据 GB 2761—2011 的有关规定:AFB 在玉米中的限量为 20 μg/kg,在大米和稻谷中为 10 μg/kg,其他粮食作物中则为 5 μg/kg;对于婴儿食品而言,AFB 和 AFM 的限量都仅为 0.5 μg/kg[6]。

1.2 赭曲霉毒素

赭曲霉毒素(ochratoxin,OT)是由曲霉或青霉产生的有毒次级代谢产物,存在 A(OTA)、B(OTB)、C(OTC)和 α(OTα)等衍生结构,其中 OTA 衍生物毒性最强,对农作物的污染最为严重[7]。赭曲霉毒素主要对肾脏和肝脏产生损伤,具有致癌性、免疫毒性和致畸性等潜在危害[7-8],其主要存在于小麦、玉米和花生等农作物中。目前,多个国家或地区对食品和饲料中赭曲霉毒素的限量制定了相关标准:欧盟规定饲料用谷物中 OTA 的含量不能超过 0.25 mg/kg,猪补充饲料和配合饲料中 OTA 的含量不超过 0.05 mg/kg[8],我国 GB 2761—2011 对 OTA 在各类谷物及豆制品中的限量为 5 μg/kg[6]。

1.3 玉米赤霉烯酮

玉米赤霉烯酮(zearalenone,ZEN)是由镰刀菌属产生的次级代谢产物,主要存在于玉米、小麦、大麦和大米等谷物中[9],具有较强的耐热性,在110 ℃条件下需要处理 1 h 才能被完全破坏。此外,玉米赤霉烯酮作为雌激素的类似物,能够作用于动物的生殖系统,导致其繁殖机能受到损害,甚至引发死亡。目前,各国对玉米赤霉烯酮的限量尚未达成统一标准,我国对 ZEN 的限量有着严格的规定。根据 GB 2761—2011 的标准,ZEN 在各类农产品中的限量均为 60 μg/kg[6]。欧盟对于 ZEN 在玉米内的限量为3 000 μg/kg,在其他谷物中为 2 000 μg/kg,而在猪饲料中的限量很低,仅为 250 μg/kg[8]。

1.4 伏马毒素

伏马毒素(fumonisins,FB)是由串珠镰刀菌产生的一种水溶性代谢产物,已发现的伏马毒素有 FA_1、FA_2、FB_1 和 FB_2 等共 11 种,其中 FB_1 最为常见,主要污染玉米及玉米制品。伏马毒素能够损害肝肾功能,且是一种致癌物,与食道癌的高发有一定的关系[10]。与玉米赤霉烯酮类似,目前国际上对食品和饲料中伏马毒素的限量及检测方法仍无统一标准:欧盟针对饲料原料、玉米及其产品中伏马毒素(FB_1+FB_2)的指南限量为 60 mg/kg,补充饲料和配合饲料中伏马毒素(FB_1+FB_2)的指南限量为 5 mg/kg;美国 FDA 规定食用家禽饲料(玉米及玉米副产品)中伏马毒素(FB_1+FB_2+FB_3)的指南限量为 100 mg/kg,猪饲料(玉米及玉米副产品)中伏马毒素(FB_1+FB_2+FB_3)的指南限量为 20 mg/kg[8];此外,中国 GB 2761—2011 并没有提及关于伏马毒素的限量标准。

1.5 呕吐毒素

呕吐毒素(deoxynivalenol,DON)是一种由镰刀菌产生的单端孢霉烯族化合物,主要存在于小麦、大麦和玉米等谷物籽实中,耐热性较强,121 ℃高压加热 25 min 仅有少量破坏。呕吐毒素对哺乳动物具有较强的毒性,能够引起人和动物消化系统疾病和厌食症,猪对呕吐毒素最为敏感,家禽次之,反刍动物耐受能力最强[11]。近年来,各国纷纷意识到呕吐毒素的危害,制定了相应的标准,限制农副产品

中呕吐毒素的含量:根据美国 FDA 标准,饲料用谷物及其副产品(除玉米外)中呕吐毒素的限量≤1 mg/kg;欧盟规定玉米及其副产品允许≤1.75 mg/kg 的呕吐毒素残留[8];中国卫生部对农副产品中残留的呕吐毒素规定为不得高于 1 mg/kg [12].

2　真菌毒素的分布

由于产生真菌毒素的微生物所偏好的生长环境不同,真菌毒素在全球的分布具有一定的地域性。热带和亚热带是曲霉生长的最佳环境,而镰刀菌最适宜在北美、欧洲和亚洲的气候条件下生长。在炎热、气候潮湿的热带地区,黄曲霉毒素的污染比较严重。玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素和伏马毒素主要在温带区域,如中国、欧洲及北美洲等地区。2016 年,百奥明公司针对 81 个国家 16 511 个样品的检测发现,非洲作物中黄曲霉毒素的污染最为严重,检出率为 60%;北美玉米中伏马毒素的检出率高达 66%,南美作物中主要的毒素为玉米赤霉烯酮和呕吐毒素;中东作物中存在的主要毒素为呕吐毒素和伏马毒素;欧洲作物中的主要毒素类型为呕吐毒素[13],验证了真菌毒素的区域分布特性。但近年来随着国际贸易进程的加速,各类毒素的分布正逐渐呈现全球化的发展趋势。

3　生物酶降解真菌毒素

对真菌毒素超标的农产品,最简单的处理方法是丢弃或销毁,但是,这将造成巨大的浪费和经济损失,同时也会产生严重的环境污染。因此,迫切需要开发安全、高效、低成本的真菌毒素脱除方法。常用的真菌毒素脱除方法有物理法、化学法和生物法。化学法是采用酸、碱、氧化剂、醛或亚硫酸气体以改变真菌毒素的结构,该方法虽然能够有效脱除毒素,但可能会对食品的营养价值和风味产生影响,且存在化学物残留的安全隐患。物理脱毒法是采用吸附剂将毒素进行脱除,但该方法稳定性差,且目前商品化的吸附剂对酶菌毒素的脱除效果仍有待加强[14]。生物法脱毒包括微生物法和生物酶法,前者是利用微生物对毒素的吸附或代谢能力,实现毒素的脱除,成本相对低廉,但并不适用于所有领域,如食品加工过程等。生物酶法脱毒是从微生物中发掘降解毒素的关键基因,利用基因技术构建生物酶的高效表达工程菌,分离获得纯酶以进行食品和饲料中真菌毒素的脱除。与微生物脱毒法相比,酶法脱毒具有更好的重复性、均一性和操作简单等特点,受到了广泛关注[15]。研究者针对黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素和呕吐毒素均开发了相应的降解酶(表 1),下文将具体阐述。

3.1　黄曲霉毒素的酶法降解

黄曲霉毒素的生物降解酶主要为氧化还原酶类。1998 年,Liu 等[16]发现在真菌 *Armillariella tabescens* 中存着可降解黄曲霉毒素的复合多酶体系,并在随后的研究中分离获得起降解作用的关键酶黄曲霉毒素氧化酶(AFO)。该酶主要作用于 AFB_1 的二呋喃环,从而破坏黄曲霉毒素。Doyle 等[17]报道寄生曲霉能够产生降解黄曲霉毒素的乳过氧化物酶,并且黄曲霉毒素的降解率与酶含量成正相关性。Yehia[18]从白腐真菌 *Phanerochaete ostreatus* 中分离出一种能降解 AFB_1 的锰过氧化物酶,其对 AFB_1 的脱毒效率依赖于酶的浓度以及酶反应的时间,在最优条件下,1.5 U/mL 的酶能够在 48 h 内降解 90% 的 AFB_1。此外,漆酶亦被发现具有降解黄曲霉毒素的功能,Alberts 等[19]研究发现来自于白腐真菌 *Phanerochaete ostreatus* 的漆酶能够降解黄曲霉毒素,118 U/L 的漆酶对黄曲霉毒素的降解率为 55%。Loi 等[2]亦从 *P. pulmonarius* 和 *P. eryngii* 中分离获得了漆酶,将其用于 AFB_1 和 AFM_1 的降解,发现仅存在漆酶的情况下,上述毒素的降解效率较低,而当加入 10 mmol/L 氧化还原介质后,反应 72 h,对 AFB_1 的降解效率可从 23%提高至 90%,对 AFM_1 的降解效率则可提高至 100%。2010 年,Novozymes 公司对氧化还原介质介导的漆酶降解黄曲霉毒素进行了专利申请,该专利中漆酶来源于 *Streptomyces coelicolor*,丁香酸甲酯作为氧化还原介质,在此条件下,反应 24 h,漆酶对黄曲霉毒素的降解率达 100%[20]。2017 年,Xu 等[3]从 43 株菌株中筛选获得了 *Bacillus shackletonii* L7,在 37 ℃反应 72 h,*Bacillus shackletonii* L7 对 AFB_1、AFB_2 和 AFM_1 的降解率分别为 92.1%、84.1%和 90.4%。在此基础上,Xu 等[3]进一步分离获得了能够降解黄曲霉毒素的新酶(芽孢杆菌黄曲霉降解酶),该酶蛋白的分子量为2.2×10^4,最适反应温度和 pH 分别为 70 ℃和 8.0。

3.2　赭曲霉毒素的酶法降解

降解赭曲霉毒素的生物酶主要为羧肽酶,具体为羧肽酶 A 和羧肽酶 Y。其中,羧肽酶 A 是最早被发现的具有赭曲霉毒素降解功能的生物酶,来源于牛胰腺中,对赭曲霉毒素的亲和性相对较高,25 ℃条件下 K_m值为 1.5×10^{-4} mol/L[21]。羧肽酶 Y 来源

于酿酒酵母,其对赭曲霉毒素的降解能力相对较弱,5 d 仅能降解 52%的赭曲霉毒素[22]。此外,脂肪酶、蛋白酶和酰胺酶等亦被发现具有降解赭曲霉毒素的功能。Abrunhosa 等[22]从黑曲霉中分离获得了可以降解赭曲霉毒素的纯酶,该酶的最适反应温度和 pH 分别为 37 ℃和 7.5,在此条件下,其对赭曲霉毒素的降解活性高于羧肽酶 A。Stander 等[23]通过对系列水解酶的筛选,发现来源于黑曲霉的脂肪酶对赭曲霉毒素具有较高的降解能力,其对赭曲霉毒素的比活力达 2.32 U/mg。Abrunhosa 等[24]的研究发现,一些商品化的酶亦具有降解赭曲霉毒素的能力,在 pH7.5 条件下反应 25 h,蛋白酶 A 对赭曲霉毒素的降解率为 87.3%,胰酶对赭曲霉毒素的降解率为 43.4%。Yu 等[25]的专利中报道酰胺酶能够降解赭曲霉毒素,当用 160 ng/mL 的酰胺酶降解 50 μg/mL 的赭曲霉毒素,降解率可达 83%。

3.3 伏马毒素的酶法降解

早在 1996 年,Duvick 等[26]已从 *E. spinifera* 中分离获得可降解伏马毒素的基因,并将其克隆至玉米等农作物中,在相关酯酶、胺氧化酶及其他酶的作用下,伏马毒素被逐渐水解、氧化。2009 年,Heinl 等[27]研究发现在 *Sphingopyxis* sp.MTA144 的同一个基因簇上存在编码羧酸酯酶和转氨酶的 2 个基因,在这 2 个酶的作用下,FB_1 经二步酶促反应被降解:在羧酸酯酶的作用下 FB_1 被降解为 HFB_1,在转氨酶的作用下 HFB_1 发生转氨反应,并最终转化生成 2-酮基-HFB_1。Hartinger 等[28]将 *Sphingopyxis* sp. MTA144 中编码转氨酶的基因 *FumI* 在大肠杆菌中进行了表达,并对其酶学性质进行了研究,发现该酶的最适温度为 35 ℃,最适 pH 为 8.5。2011 年,Heinl 等[29]从 *Sphingopyxis* sp. ATCC 55552 克隆获得了新的转氨酶基因,并将其在大肠杆菌中进行了表达,发现该酶亦具有降解 HFB_1 的能力。百奥明研究中心从 *Sphingopyxis* sp.MTA144 中分离获得了酯酶,并开发出活性成分为纯酶的 FUMzyme®,这种酶制剂在动物的胃肠道内能够有效降解伏马毒素为毒性显著降低的化合物[30]。

3.4 玉米赤霉烯酮的酶法降解

能够降解玉米赤霉烯酮的生物酶主要有三类:漆酶、内酯水解酶和过氧化物酶。其中来源于 *Trametes versicolor* 的漆酶,反应 4 h 对玉米赤霉烯酮的降解率为 81.7%[31]。而在 2009 年,Novozyme 公司的 Viksoe-Nielsen 等[32]发现在氧化还原介质的存在下,来源于 *Streptomyces coelicolor* 的漆酶除了能降解黄曲霉毒素外,还能降解玉米赤霉烯酮,所采用的氧化还原介质可以为丁香酸甲酯,37 ℃条件下反应 24 h,玉米赤霉烯酮可被完全降解。目前,对玉米赤霉烯酮降解酶最为关注的酶为内酯水解酶,编码基因为 *zdh*101,是 Takahashi-Ando 等[33]2002 年从来源于 *Clonostachys rosea* IFO 7063 中分离获得,并将其在酿酒酵母中实现异源表达,脱毒实验表明其能够在 37 ℃条件下反应 8 h 或 28 ℃条件下反应 48 h,实现 2 μg/mL 玉米赤霉烯酮的完全降解。唐语谦等[34]发现该酶主要通过作用于玉米赤霉烯酮的内脂键实现毒素的降解,但由于可逆反应的存在,该反应并不能完全降解玉米赤霉烯酮,降解产物为 β-ZOL,仍具有一定雌激素毒性,但毒性相对较低。此外,Yu 等[35]研究发现来源于 *Acinetobacter* sp.SM04 的过氧化物酶(Prx)能催化 H_2O_2 氧化降解玉米赤霉烯酮。在 0.09% H_2O_2 存在的条件下,30 ℃反应 6 h 能降解玉米样品中 90%的玉米赤霉烯酮。目前,该酶具体的作用机制仍在研究中。

3.5 呕吐毒素的酶法降解

呕吐毒素降解主要有 3 种途径,分别为糖基化、氧化和乙酰化,这 3 种反应又有其对应的酶进行催化。Poppenberger 等[36]于 2003 年发现了一种典型的呕吐毒素糖基化酶——*Arabidopsis thaliana* 中的 UDP-糖基转移酶,能通过催化葡萄糖从 UDP-葡萄糖转移到呕吐毒素的 C3 位的羟基上形成 3-*O*-吡喃葡萄糖基-4-DON。2010 年,Schweiger 等[37]将 *A.thaliana* 中编码 UDP-糖基转移酶的基因在拟南芥体内进行表达,培养出具有 DON 抗性的农作物。Ito 等[38]于 2013 年在 *Sphingomonas* sp.KSM1 中发现的 P450 细胞色素系统能够将呕吐毒素氧化为 16-羟基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(16-HDNO),从而使其失去毒性。进一步通过相关基因的胞外重组和表达,发现了这一系统主要由 Cyt450 的编码基因 *ddna* 及其对应的内源性还原物组成,其催化效率为 6.4 mmol/(L·s),对于质量浓度约为 100 μg/mL 的呕吐毒素,这一系统能在 3 d 内达到将近 100%的降解率。另一种降解呕吐毒素的方法是将其 3 号位乙酰化。Kimura 等[39]于 1997 年发现了一种能催化呕吐毒素乙酰化的酶——单端孢甲-3-*O*-乙酰转移酶并确定了其对应的编码基因,是一种从大肠杆菌中提取、由 *Tri*101 基因编码的乙酰化酶,它能够催化呕吐毒素 3 号位乙酰化以达到解毒的目的。

3.6　不同真菌毒素及其相应的降解方法

上文中主要阐述了各类真菌毒素的生物降解方法,这些方法中涉及了相关的微生物、酶及反应,现将上述内容总结,见表 1。

表 1　真菌毒素及其相应的降解方法

Table 1　Mycotoxins and their relevant bio-degradation methods

毒素	微生物或酶	作用机理
黄曲霉毒素	*Armillariella tabescens* 中的黄曲霉毒素氧化酶及其相关酶系 *Phanerochaete ostreatus* 中的 AFB_1 锰过氧化物酶和漆酶 *P. pulmonarius*、*S. coelicolor* 和 *P. eryngii* 的漆酶	作用于黄曲霉毒素的二呋喃环对其直接氧化
黄曲霉毒素	*Bacillus shackletonii* L7 的芽孢杆菌黄曲霉降解酶	新发现的酶,机理暂不明确
赭曲霉毒素	牛胰腺羧肽酶 A 酿酒酵母羧肽酶 Y	针对分子内的肽键进行降解得到小分子氨基酸
玉米赤霉烯酮	*Trametes versicolor* 和 *Streptomyces coelicolor* 的漆酶 *Clonostachysrosea*IFO 7063 中的 ZHD101 内酯水解酶 *Acinetobacter* sp. SM04 的过氧化物酶 PRX	针对二酚环降解使其失去毒性,但具体降解产物暂不明确 水解内酯环生成玉米赤霉烯醇 催化 H_2O_2 氧化降解玉米赤霉烯酮,但具体作用部位不明
伏马毒素	*Sphingopyxis* sp.MTA144 中的羧酸酯酶和转氨酶; 基于 *Sphingopyxis* sp.MTA144 的酶制剂 FUMzyme®	催化一个两步反应,先催化 FB_1 降解为 HFB_1,再催化其转氨形成 2-酮基-HFB_1
呕吐毒素	*Arabidopsis thaliana* 中的 UDP-糖基转移酶 *Sphingomonas* sp.KSM1 中的 P450 细胞色素系统 单端孢甲-3-*O*-乙酰转移酶	催化 3 号位的糖基化形成 3-*O*-吡喃葡萄糖基-4-DON 催化其氧化成为 16-HDON 催化 3 号位乙酰化

4　真菌毒素降解酶的发掘

目前虽然已有能够降解真菌毒素的相关酶的报道,但已实现商业化应用的仅为能降解伏马毒素的 FUMzyme® ,大部分酶因为降解效率低、稳定性差等原因处于实验室研究阶段,针对真菌毒素降解酶的挖掘需进一步的深入。

目前所发现的真菌毒素降解酶,主要是基于色谱分离法获得。研究者在筛选获得可降解真菌毒素微生物的基础上,采用色谱法分别对微生物的胞外酶和胞内酶进行分离,将分离的各个组分分别进行真菌毒素降解实验,逐步确定起降解作用的关键酶。Zhao 等[40]采用乙醇沉淀、色谱分离的方法从 *Myxococcus fulvus* ANSM068 的胞外酶中分离获得了可降解黄曲霉毒素的酶,经测定该酶的分子量为 3.2×10^4,最佳反应温度为 35 ℃,最佳反应 pH 为 6.0,对 AFG_1 的降解率可达 96.96%,对 AFM1 的降解率可达 95.8%。Abrunhosa 等[41]采用丙酮沉淀和色谱分离法从黑曲霉中分离获得可降解赭曲霉毒素的新酶,该酶的最适 pH 为 7.5,最适反应温度为 37 ℃,对赭曲霉毒素的最大反应速率 V_{max} 为 0.44 μmol/(L·min)。虽然基于色谱分离技术能够筛选获得具有降解真菌毒素功能的新酶,但蛋白分离过程复杂,回收率低,需进一步对分离所得的蛋白进行鉴定,费时费力。虽然色谱分离法能够获得毒素降解相关酶,但由于微生物代谢过程非常复杂,目标蛋白获取的难度较大,过去 10 年中被报道的具有脱除真菌毒素功能的新酶仅有 7 个,需要开发更高效的毒素降解酶发掘方法。

5　真菌毒素降解酶的改造

随着测序技术的发展和成本的不断降低,利用高通量测序技术开展真菌毒素降解菌基因组信息的检测已逐渐成为一种主流方式。2012 年,Zhou 等[42]发现菌株 *Devosia* 具有降解呕吐毒素的能力,此时尚未见任何关于 *Devosia* 菌株基因组信息的报

道,但截至目前,上传至 GenBank 中的 *Devosia* 全基因序列达 12 个。不断丰富的基因信息库以及组学技术的发展为真菌毒素降解酶的发掘提供了新的策略。Liuzzi 等[43]在前期研究过程中筛选获得了一株能够降解赭曲霉毒素的不动杆菌 ITEM 17016,为筛选获得降解赭曲霉毒素的关键基因,分析了 ITEM 17016 在含/不含毒素培养基中生长时的基因表达差异,发现有 6 个肽酶在含毒素的培养基中表达上调,进一步将编码羧肽酶 PJ-1540 的基因在大肠杆菌中进行异源表达,从而发掘了降解赭曲霉毒素的新酶。随着宏基因组技术、转录组学技术等的不断发展和成熟,预计未来越来越多具有降解毒素功能的酶将被挖掘。

目前针对酶法降解真菌毒素的研究主要集中于新酶的发掘以及酶学性质的研究,但天然酶在食品、饲料中的应用可能由于环境条件的限制,无法获得理想的效果,往往需要采用蛋白质工程对酶进行改造,如增加酶的活性,pH、温度稳定性等,生物信息学的发展为脱毒酶结构的解析及改造提供了有力的技术支撑。Dobritzsch 等[44]从黑曲霉中发掘了一种可以降解赭曲霉毒素新酶,该酶具有较高的热稳定性,最适反应温度为 66 ℃,最适反应 pH 为 6,且比羧肽酶 A 和羧肽酶 Y 具有更高的降解性能;在此基础上,进一步对该酶进行了纯化、结晶和结构解析,发现该酶属于酰胺水解酶家族,具有双金属中心催化位点。通过对粉红粘帚菌的内酯水解酶 ZHD101 的纯化和晶体培养,Peng 等[45]解析了 ZHD101 的分子结构,发现 ZHD101 属于 α/β-水解酶家族,分子结构由催化核心结构域和 α-螺旋帽子结构域组成,底物结合在二者之间的深口袋中,靠近催化三联体为 Ser102-His242-Glu126,酶与底物的作用是通过氢键和非极性键的互作完成。玉米赤霉烯醇为玉米赤霉烯酮的衍生物,其中 α-玉米赤霉烯醇的雌激素较玉米赤霉烯酮具有更高的毒性,而 ZHD101 能够同时降解玉米赤霉烯酮和 α-玉米赤霉烯醇,但对后者的降解效率仅为前者的 40%,为提高 ZHD101 对 α-玉米赤霉烯醇的降解效率,在获得 ZHD101 晶体结构的基础上,Xu 等[46]进一步研究了 ZHD101 分别与底物玉米赤霉烯酮、玉米赤霉烯纯间的复合体结构,通过二者结构的比对,设计了系列突变位点修饰底物结合位点的结构,突变体 V153H 对 α-玉米赤霉烯醇的催化活性较野生型提高了 3.7 倍,但同时保持了对玉米赤霉烯酮的催化活性。

6 酶法降解真菌毒素存在的问题与展望

真菌毒素污染给粮食与畜牧业的发展带来了巨大的经济损失,严重威胁着人类的健康和社会的发展。酶法降解真菌毒素技术与传统的物理、化学好微生物脱毒方法相比,具有不可比拟的优势。但目前关于真菌毒素的酶降解技术大部分仍停留在起步阶段,新酶的发掘工作仍举步维艰,在过去的 10 年中,公开报道的可降解真菌毒素的新酶仅有 7 个。酶法脱毒技术的应用尚存在以下几方面的问题有待深入探索与研究:①虽然目前报道的可用于降解真菌毒素的微生物很多,但众多的研究报道中毒素的代谢机理仍缺乏深入研究,制约了新酶的发掘;②某些真菌毒素的降解依赖于几个酶的协同作用,如在脱羧酶和转氨酶的共同作用下伏马毒素被降解完全,这必将增加新酶发掘的难度;③同一样品中几种毒素往往共同存在[1],故在利用酶法降解这些毒素时往往需要多个酶的参与,增加了工艺调控的难度;④一些酶对真菌毒素的作用是将其降解为毒性较小的化合物,如内酯水解酶降解玉米赤霉烯酮的产物为低毒性的玉米赤霉烯醇,一定程度上限制了该酶在毒素降解中的应用。

近年来,生物信息学的发展为新酶的发现提供了更为丰富的技术手段。利用宏基因组技术,通过提取特定环境中的微生物基因组 DNA 构建基因组文库,从文库中筛选新的功能基因,已成为功能基因筛选的高效方法[47];由于测序技术的发展,已有海量的基因数据资源被公布,根据催化反应的需求,借助计算机辅助筛选,可以从庞大的基因数据库中高效获得具有优良催化性能的新型生物酶[48]。而近几年发展起来的无细胞蛋白表达等技术,为酶的高通量筛选提供了有效手段,能够极大地缩短新酶的发掘周期[49]。因此,虽然生物酶法去除真菌毒素的研究起步较晚,发展相对缓慢,但随着相关生物技术的蓬勃发展,相信在不久的将来,越来越多

可降解真菌毒素的生物酶将被发掘,并逐步从实验室研究走向实际生产过程。

参考文献:

[1] 甄阳光.我国主要饲料原料及产品中镰刀菌毒素污染及分布规律的研究[D].成都:四川农业大学,2009.

[2] LOI M, FANELLI F, LIUZZI V C, et al. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives[J].Toxins,2017,9(4):111-142.

[3] XU L, AHMED M F E, SANGARE L, et al. Novel aflatoxin degrading enzyme from *Bacillus shackletonii* L7[J].Toxins,2017,9(1):36-51.

[4] FDA.Compliance policy guides: CPG Sec.683.100 Action levels for aflatoxins in animal feeds[M/OL].[2017-12-04].https://www.fda.gov/ICECI/Compliance Manuals/Compliance Policy Guidance Manual/ucm074703.htm.

[5] WANG Y,ZHAO C,LYU Y,et al.Advances in biodegradation of aflatoxins[J].Agric Sci Technol,2016,17(4):951-955.

[6] 中华人民共和国卫生部.食品安全国家标准　食品中真菌毒素限量:GB2761—2011[S].北京:中国标准版出版社,2011.

[7] HEUSSNER A H, BINGLE L E H. Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data[J].Toxins,2015,7(10):4253-4282.

[8] Europe Commission. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding[M/OL].[2017-12-05].http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/? uri = CELEX: 32006H0583&from = EN.

[9] MCCORMICK S P. Microbial detoxification of mycotoxins[J].J Chem Ecol,2013,39(7):907-918.

[10] BURGESS K M,RENAUD J B,MCDOWELL T,et al.Mechanistic insight into the biosynthesis and detoxification of fumonisin mycotoxins[J].ACS Chem Biol,2016,11(9):2618-2625.

[11] HASSAN Y I,WATTS C,LI X Z,et al.A novel peptide-binding motifs inference approach to understand deoxynivalenol molecular toxicity[J].Toxins,2015,7(6):1989-2005.

[12] 苏福荣,王松雪,孙辉,等.国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状分[J].粮油食品科技,2007,15(6):57-59.

[13] BINDER E M,TAN L M,CHIN L J,et al.Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients[J].Animal Feed Sci Technol,2007,137(3):265-282.

[14] ZHU Y,HASSAN Y,LEPP D,et al.Strategies and methodologies for developing microbial detoxification systems to mitigate mycotoxins[J].Toxins,2017,9(4):130.

[15] ZHU Y, HASSAN Y I, WATTS C, et al. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients: a review of recent patents[J].Animal Feed Sci Technol,2016,216:19-29.

[16] LIU D L,LIANG R,YAO D S,et al.Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescen* [J].Food Chem Toxicol,1998,36(7):563-574.

[17] DOYLE M P, MARTH E H. Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase[J].Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,1978,166(5):271-273.

[18] YEHIA R S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*[J].Braz J Microbiol,2014,45(1):127-133.

[19] ALBERTS J F, GELDERBLOM W C A, BOTHA A, et al. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes [J].Int J Food Microbiol,2009,135(1):47-52.

[20] VIKSOE-NIELSEN A, SOERENSEN B H. Detoxification of aflatoxin in feed product: EP20090717013[P].2010-11-24.

[21] PITOUT M J.The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes[J].Biochem Pharmacol,1969,18(2):485-491.

[22] ABRUNHOSA L, PATERSON R R M, VENâNCIO A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination [J].Toxins,2010,2(5):1078-1099.

[23] STANDER M A, BORNSCHEUER U T, HENKE E, et al. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A[J].J Agric Food Chem,2000,48(11):5736-5739.

[24] ABRUNHOSA L, SANTOS L, VENâNCIO A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*[J].Food Biotechnol,2006,20(3):231-242.

[25] YU S, POULSEN C H, DALSGAARD S, et al. Food additive comprising an amidase for detoxifying ochratoxin: EP20110767471[P].2013-07-17.

[26] DUVICK J, ROOD T A. Fumonisin-detoxifying enzyme: 1996006175A3[P].1996-03-14.

[27] HEINL S,HARTINGER D,MOLL W D,et al.Identification of a fumonisin B1 degrading gene cluster in *Sphingomonas* spp. MTA144[J].New Biotechnol,2009,25(6):S61-S62.

[28] HARTINGER D,SCHWARTZ H,HAMETNER C,et al.Enzyme characteristics of aminotransferase *fum*I of *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B1[J].Appl Microbiol Biotechnol,2011,91(3):757-768.

[29] HEINL S,HARTINGER D,THAMHESL M,et al.Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes [J].J Biotechnol,2010,145(2):120-129.

[30] ADDITIVES E P O.Scientific Opinion on the safety and efficacy of fumonisin esterase (FUMzyme®) as a technological feed additive for pigs[J].EFSA J,2014,12(5):3667.

[31] BANU I, LUPU A, APRODU I. Degradation of zearalenone by laccase enzyme[J].Chem Chem Eng,2014,14(2):78-84.

[32] VIKSOE-NIELSEN A, SOERENSEN B H. Detoxification of feed

products:WO2009EP52566[P].2009-03-05.

[33] TAKAHASHI-ANDO N,KIMURA M,KAKEYA H,et al.A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning[J].Biochem J,2002,365(1):1-6.

[34] 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(7):1742-1746.

[35] 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.

[36] POPPENBERGER B, BERTHILLER F, LUCYSHYN D, et al. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem,2003,278(48):47905-47914.

[37] SCHWEIGER W, BODDU J, SHIN S, et al. Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast[J].Mol Plant: Microbe Interact,2010,23(7):977-986.

[38] ITO M,SATO I,ISHIZAKA M,et al.Bacterial cytochrome P450 system catabolizing the *Fusarium* toxin deoxynivalenol [J].Appl Environ Microbiol,2013,79(5):1619-1628.

[39] KIMURA M,KANEKO I,KOMIYAMA M,et al.Trichothecene 3-*O*-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins cloning and characterization of Tri101 [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (3): 1654-1661.

[40] ZHAO L H,GUAN S,GAO X,et al.Preparation,purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068 [J]. J Appl Microbiol, 2011, 110 (1):147-155.

[41] ABRUNHOSA L, VENâNCIO A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger* [J]. Biotechnol Lett,2007,29(12):1909-1914.

[42] ZHOU T, HE J. Bacterial isolate, methods of isolating bacterial isolates and methods for detoxification of trichothecene mycotoxins:WO2010CA01594[P].2011-04-14.

[43] LIUZZI V C, FANELLI F, TRISTEZZA M, et al. Transcriptional analysis of *Acinetobacter* sp.*neg* 1 capable of degrading ochratoxin A[J].Front Microbiol,2016,doi:10.3389/fmicb.2016.02162.

[44] DOBRITZSCH D,WANG H,SCHNEIDER G,et al.Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme[J].Biochem J,2014,462(3):441-452.

[45] PENG W,KO T P,YANG Y,et al.Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*[J].RSC Adv,2014,4:62321-62325.

[46] XU Z X, LIU W D, CHEN C C, et al. Enhanced α-zearalenol hydrolyzing activity of a mycoestrogen-detoxifying lactonase by structure-based engineering[J].ACS Catal,2016,doi:10.1021/acscatal.6b01826.

[47] UFARTÉ L,LAVILLE É,DUQUESNE S,et al.Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes[J].Biotechnol Adv, 2015,33(8):1845-1854.

[48] 郁惠蕾,张志钧,李春秀,等.大数据时代工业酶的发掘、改造和利用[J].生物产业技术,2016(2):48-55.

[49] CATHERINE C,LEE K H,OH S J,et al.Cell-free platforms for flexible expression and screening of enzymes[J].Biotechnol Adv, 2013,31(6):797-803.

(责任编辑 管珺)