

玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 的包埋及稳定性研究

王浩宇,孙 晶,常晓娇,刘虎军,孙长坡

(国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:确定了玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 的包埋工艺,并以相对酶活力为考察指标,研究包埋后酶对温度和 pH 的耐受性,对玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 包埋后的酶活力稳定性进行评价。结果表明,玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 包埋后的最适反应温度为 35 ℃,在 50 ℃ 条件下放置 4 h 后相对酶活基本不变;降解酶 ZLHY6 包埋后的最适 pH 为 8.0, pH 为 5.0 的环境中放置 2 h 后仍保留 80% 的相对酶活力。对该包埋酶进行猪胃肠液的体外模拟实验,结果显示,该包埋酶在经过 4 h 胃液消化和 2.5 h 肠液消化后,其相对酶活力仍保留 61%。玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 经过包埋后可提高其温度、pH 及在模拟胃肠液中的耐受性。

关键词:玉米赤霉烯酮;降解酶;包埋;稳定性;模拟胃肠液

中图分类号:TQ 925⁺.9 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2018)02-0063-05

Study on the embedding and stability of zearalenone degrading enzyme ZLHY6

WANG Hao-yu, SUN Jing, CHANG Xiao-jiao, LIU Hu-jun, SUN Chang-po

(Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: The embedding technology of zearalenone degrading enzyme ZLHY6 was studied. The effects of temperature and pH on the embedding enzyme ZLHY6 were investigated and the relative enzyme activity was used to evaluate the stability of enzyme activity of ZLHY6. The results showed that the optimal reaction temperature was 35 ℃, and the enzyme retained substantial activity after the enzyme incubation at 50 ℃ for 4 h. The optimum pH was 8.0, and 80% enzyme activity was retained after being at pH 5.0 for 2 h. In addition, the results of *in vitro* simulation test of porcine gastrointestinal fluid showed that 61% enzyme activity of the embedding enzyme was retained after being digested by gastric fluid for 4 h and intestinal fluid for 2.5 h. The tolerance of zearalenone degrading enzyme ZLHY6 against temperature, pH and simulative gastrointestinal fluid was improved after being embedded.

Key words: zearalenone; degrading enzyme; embedding; stability; simulative gastrointestinal fluid

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是一种具有雌激素毒性的非类固醇毒素,具有很强的生殖毒性、肝脏毒性、免疫毒性和遗传毒性^[1],是世界上污染最为严重的真菌毒素之一^[2-3],可以广泛地污染谷物及其制品,对人类的身体健康产生重大危害。因此,如何有效地解决 ZEN 的污染是当前亟待解决

的问题^[4-5]。

目前,真菌毒素的脱毒方法主要包括物理化学方法和生物方法。物理化学方法,如高温、挤压蒸煮、氨化等,易造成营养物质的大量流失、化学残留等问题,极大地限制了其应用^[6];生物方法可高效地将真菌毒素转化成无毒或低毒物质,具有广阔的市场前景,已经成为当前的研究热点^[7]。近年来,国内外在 ZEN 生物降解方面的研究取得了很多进展,但多集中于基础研究,针对 ZEN 生物脱毒剂开

收稿日期:2017-10-25

基金项目:国家科技支撑计划(2015BAK43B01);粮食公益性行业科研专项(201513006)

作者简介:王浩宇,1992 年出生,男,研究实习生。

通讯作者:孙长坡,1975 年出生,男,研究员。

发应用方面的研究报道较少。Kakeya H^[8]和 Yang W C^[9]等发现粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)菌株可以分泌一种内酯酶将ZEN完全转化为无毒物质;龙森^[10]等从石油污染土地中筛选到一株红球菌SYA13,可在72 h内降解液体培养基中87.1%的ZEN毒素;魏单平^[11]等筛选到解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)可以分泌胞外酶降解ZEN,使其类雌激素毒性显著降低。本实验室经过前期研究,完成了玉米赤霉烯酮降解酶ZLHY6基因在毕赤酵母中的构建和优化,获得了高效表达菌株,同时对该降解酶ZLHY6的酶学性质进行了表征,优化产酶菌株的发酵条件^[12-14]。本研究在此基础上,主要针对ZEN降解酶ZLHY6包埋后的耐热性和酸碱稳定性进行评价,并通过体外模拟胃肠液实验评价包埋酶对仔猪胃肠液的耐受性,为ZEN生物脱毒酶制剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ZEN降解酶ZLHY6,由本实验室发酵纯化。

柠檬酸三钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、甘氨酸、氢氧化钠均为分析纯,购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、ZEN毒素标品,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

Ni3B型电热恒温水浴锅:北京长安永创科学仪器有限公司;5810R型冷冻离心机:Eppendorf 中国有限公司;BCD-308W型冰箱:青岛海尔股份有限公司;E2695型高相液相色谱:Waters科技(上海)有限公司;pp-50型pH计:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;XS1003S称量天平:梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ZEN标准曲线的绘制

吸取200 $\mu\text{g/mL}$ ZEN标准溶液250 μL 并加入4 750 μL 甲醇得到10 $\mu\text{g/mL}$ 的ZEN溶液。分别吸取10 $\mu\text{g/mL}$ ZEN溶液100、200、400、600、800、1 000 μL ,用甲醇定容至1 000 μL ,配制成1~10 $\mu\text{g/}$

mL的ZEN标准溶液。采用液相检测ZEN标准溶液,以浓度($\mu\text{g/mL}$)为X轴,液相峰面积($\mu\text{V/s}$)为Y轴,绘制标准曲线。

1.3.2 ZEN降解酶ZLHY6的包埋工艺

采用乳化凝胶化法进行ZEN降解酶ZLHY6的微胶囊包埋,具体过程为:将ZLHY6酶浓缩液与海藻酸钠粉末按质量比20:1混合均匀,分散于一定量的蒸馏水中;然后按照体积比1:3的比例,倾倒入液体石蜡中,并不断搅拌,至混合均匀,并逐滴加入冰醋酸,使碳酸钙中的钙离子释放,与海藻酸钠中的钠离子进行置换反应,形成内部包埋有ZLHY6酶的微胶囊,分离并干燥得到微囊化的ZLHY6酶产品。

1.3.3 包埋酶稀释度的确定

将包埋酶制剂以5 000 r/min离心3 min,去除上清,称取1.0 g加入0.055 M柠檬酸三钠溶液定容至10 mL,常温震荡溶解,即为稀释10倍的酶液(A液),由A液分别稀释得到20倍、40倍和50倍的酶液,通过实验确定本实验中使用稀释度为20的酶液作为后续研究用酶液较为适合。

1.3.4 包埋酶活力测定

酶活测定体系:取10 μg ZEN毒素管,加入450 μL Tris-HCl缓冲液(pH 7.5),进行37 $^{\circ}\text{C}$ 预热,吸取50 μL 经过适当稀释的酶制剂液(37 $^{\circ}\text{C}$ 预热),加入到毒素管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 min,然后加入500 μL 甲醇终止反应。空白对照为先将粗酶液置于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中20 min使其失活,其他操作相同。

酶活定义:在上述条件下,在1 min内降解1 μg ZEN所需的ZEN降解酶量为一个酶活力单位,简称U。

相对酶活力:指经各种方法处理后实验组的酶活力与未经处理对照组的原始酶活力的比值,用百分比表示。

1.3.5 不同温度对包埋酶活力的影响

设定温度分别为20、25、30、35、37、40、42、45、50、55、60、65、70、75、80 $^{\circ}\text{C}$,底物为10 μg 毒素管,pH为7.5,进行酶液-底物反应,水浴反应时间为20 min。

1.3.6 不同反应 pH 对包埋酶活力的影响

分别配制 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 0.2 M 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液和 pH 为 9.0、10.0、11.0 的 1 M 甘氨酸—NaOH 缓冲液,分别取 450 μL 不同 pH 的缓冲液溶于 10 μL ZEN 毒素管中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下进行酶—底物反应,反应时间为 20 min,测定酶活力。

1.3.7 包埋酶热稳定性

分别取 1.0 g 包埋酶于 5 mL EP 管中,分别置于 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中水浴 30 min,然后置于室温 1 h 恢复活性,溶解稀释,按最适温度和最适 pH 测定酶的活力^[15]。

1.3.8 酶的 pH 稳定性

分别取 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 0.2 M 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液和 pH 为 9.0、10.0、11.0 的 1 M 甘氨酸—NaOH 缓冲液各 2 mL 稀释酶样,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 2 h,然后调节 pH 为 7.5,放置 2 h 恢复活性后进行酶—底物反应,测定酶活力。

1.3.9 体外模拟猪胃肠条件下包埋酶稳定性的研究

采用胃—小肠两段法进行体外模拟实验^[16]。先取 10 mL 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液 (pH 5.0) 加入 1 g 包埋酶,摇匀后加入 3.0 mg 猪胃蛋白酶,在 39.0 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理,分别于 1、2、3、4 h 取样测定酶活力;然后取 5 mL 反应酶液,用 1 M 磷酸氢二钠调节 pH 至 6.5,接着加入 50 mg 糜蛋白酶、50 μL 0.1 mg/mL 胰蛋白酶、0.1 mg 脂肪酶、25 mg 淀粉酶,在 39.5 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下处理,分别在 1、2、2.5 h 取样测定酶活力。

断奶仔猪消化道体外模拟参数:胃蛋白酶 (1 131 U/mL)、胰蛋白酶 (0.325 U/mL)、糜蛋白酶 (227 U/mL)、脂肪酶 (0.682 5 U/mL)、淀粉酶 (2 550.09 U/mL)^[17-18]。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

ZEN 标准曲线如图 1 所示,标准回归方程 $Y = 107\,557X - 3\,111.7$, $R^2 = 0.999\,9$ 。

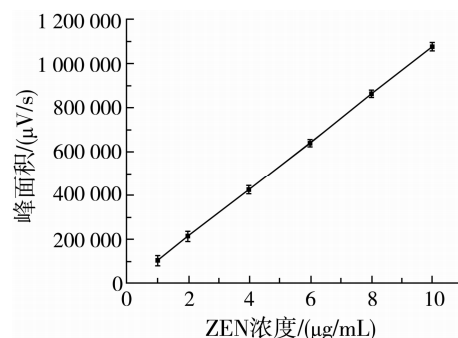


图1 ZEN 标准曲线

2.2 ZEN 降解酶 ZLHY6 的包埋

通过乳化凝胶化法制备的 ZLHY6 酶微胶囊,形态良好,粒径在 300 μm 左右;ZLHY6 酶均匀分布于微胶囊内部,其包埋率可达 85% 以上。说明乳化凝胶化法可以用于 ZLHY6 酶的包埋。

2.3 温度对包埋酶活力的影响

在 pH 为 7.5,不同水浴温度下反应 20 min 条件下测定酶活力,结果见图 2。

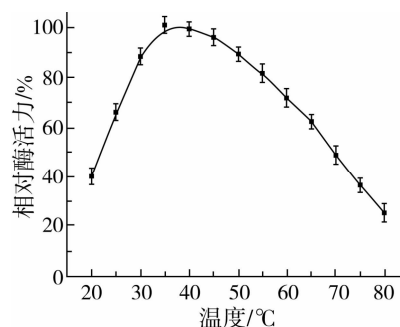


图2 反应温度对包埋酶活力的影响

从图 2 中看出随着反应温度升高,酶活力先逐渐提高,当温度达到 35 $^{\circ}\text{C}$,该包埋酶活性达到最高;温度升到 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活力开始下降,继续升高温度,酶的蛋白质结构发生变化从而导致酶活力逐渐降低。对比降解酶 ZLHY6 未包埋前的最适反应温度范围 30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ ^[13],该酶包埋后在 30 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 之间均保持了较高的降解活性,其最适反应温度范围有所提高。

2.4 pH 对包埋酶活力的影响

在不同 pH、37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下进行酶—底物反应,测定酶活力,结果见图 3。从图 3 可以看出,在 pH 值低于 4.0 的酸性环境下,该包埋酶的活性较低,相对酶活力低于 40%,随着 pH 的升高,酶活力

逐渐升高,在 pH 值为 8.0 左右时达到最高,而当 pH 值大于 9.0 时,酶活性迅速下降。与未包埋的降解酶 ZLHY6 比较,适宜反应 pH 范围由 7.5 ~ 8.5^[13] 提高到了 6.0 ~ 9.0,扩大了包埋酶的应用范围,为进一步进行体外胃肠液模拟实验提供了理论基础。

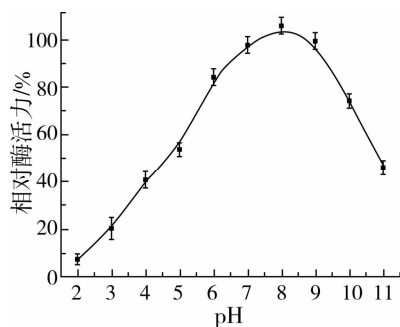


图3 pH 对包埋酶活力的影响

2.5 酶的热稳定性分析

按照 1.3.7 实验设计分别在 20、25、30、35、37、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 °C 温度下处理包埋酶 30 min,测定酶活力,结果如图 4 所示。可以看出,在 20 ~ 50 °C 条件下保存 30 min,酶活力基本没有损失;在大于 80 °C 条件下处理后酶活力损失较大。

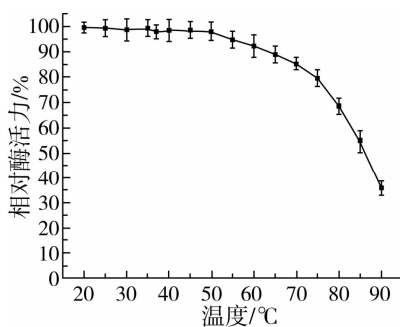


图4 不同温度处理后的相对酶活力

根据图 4 结果探究不同温度不同时间下的热稳定性,设计实验分别在 50、60、70、80 °C 处理包埋酶 1、2、3、4 h 后测定酶活力,结果见图 5,其中 30 min 后不同温度的剩余酶活与图 4 结果相符合,由图可以发现包埋酶在 50 °C 条件下保存 4 h 后,酶活基本没有变化。

由图 4 ~ 图 5 结果可知,在温度低于 50 °C 时该包埋酶的热稳定性良好,不易发生蛋白质变性

而使酶活损失,可在此条件下长时间放置并保持酶活力稳定在很高的水平,便于该酶的贮藏管理和应用。

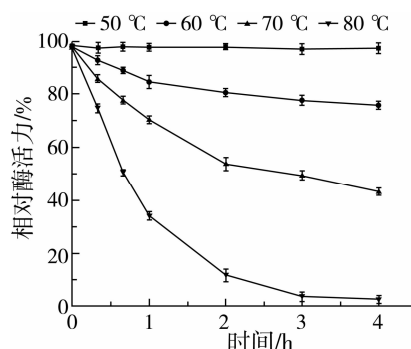


图5 不同温度不同时间处理后的相对酶活力

2.6 酶的 pH 值稳定性分析

按照 1.3.8 实验设计得到结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,酶在 pH 6.0 ~ pH 8.0 范围内较稳定,当 pH 值为 5.0 和 9.0 时,该包埋酶仍有 80% 和 50% 的相对酶活力,说明酶的包埋外囊可有效降低酸碱对酶的破坏,提高酶的酸碱耐受性,降低了对储存条件的要求,有利于生产应用。

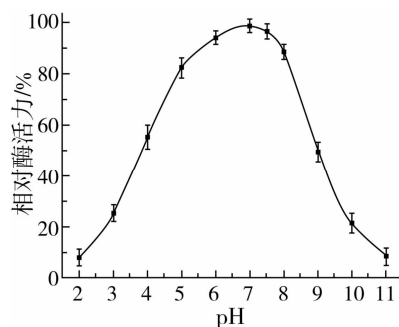


图6 不同 pH 处理后的相对酶活力

2.7 模拟胃肠液环境下包埋酶活力变化

按照 1.3.9 处理方法进行实验得到结果如图 7 ~ 图 8 所示,包埋酶经模拟胃液处理、39.0 °C 条件下处理 1、2、3、4 h 后,包埋酶的相对酶活力分别为 93%、86%、79%、75%;经模拟肠液处理、39.5 °C 条件下处理 1、2、2.5 h 后,相对酶活力分别为 71%、68%、61%。可见模拟胃肠液中胃蛋白酶、胰蛋白酶等消化酶对包埋酶的破坏作用小,说明包埋酶外囊可以有效防止各种消化酶对囊内降解酶的消化降解,使酶耐受胃肠液环境的能力增强。

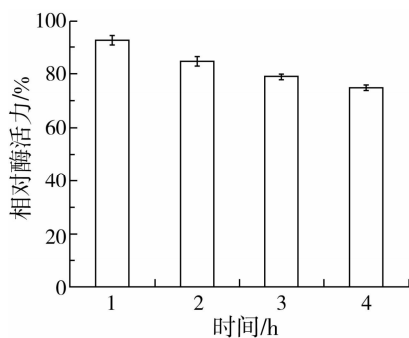


图7 模拟胃液处理后的相对酶活力

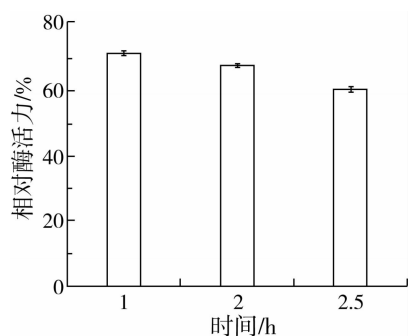


图8 模拟肠液处理后的相对酶活力

3 结论

ZEN 降解酶 ZLHY6 经包埋后,最适反应温度为 35 ℃,最适反应 pH 为 8.0,说明弱碱性的环境可激活包埋酶反应活性。与未包埋的降解酶 ZLHY6 对比^[13],该包埋酶对温度和 pH 的耐受性均有所提高,在 50 ℃以下储存可保持较高降解活性。在 pH 为 5.0 和 9.0 的环境放置时,可分别保留 80% 和 50% 的相对酶活力。动物胃肠液体外模拟实验结果表明,经过包被的降解酶 ZLHY6 在动物胃肠道中仍保留了较高降解活性,可以有效降低动物消化道中 ZEN 的含量,从而减轻或避免消化过程中 ZEN 的毒害作用。本研究为 ZEN 降解酶的有效性评价提供了数据支撑,为真菌毒素降解酶制剂的开发和应用奠定基础。

参考文献:

- [1] LABUDA R, PARICH A, BERTHILLER F, et al. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005(105): 19-25.
- [2] PLACINTA C M, DMELLO J P F, MACDONALD A M C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins[J]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 78:

21-37.

- [3] SWAMY H. 亚太地区霉菌毒素:普遍性,负面影响,经济后果及其控制策略(一)[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(3): 1001-1002.
- [4] XIONG K, HU W, WANG M, et al. A survey on contamination of deoxynivalenol and zearalenone in maize and wheat from Anhui and Henan province[J]. Food Science, 2009, 30(20): 265-268.
- [5] TAN H, ZHANG Z, HU Y, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading Zearalenone[J]. Food Control, 2015, 47: 285-290.
- [6] TINYIRO S E, WOKADALA C, XU D, et al. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains[J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(4): 321-327.
- [7] SATO I, ITO M, ISHIZAKA M, et al. Thirteen novel deoxynivalenol degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 327(2): 110-117.
- [8] 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*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66(12): 2723-2726.
- [9] YANG W C, HSU T C, CHENG K C, 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.
- [10] 龙森, 何润霞, 刘义, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(8): 34-38.
- [11] 魏单平, 刘玉洁, 孙向丽, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选及活性检测[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(4): 761-768.
- [12] 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.
- [13] 郝小龙, 常晓娇, 伍松陵, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶 ZLHY6 活性影响因素研究[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(3): 99-101.
- [14] 张来忠, 孙长坡, 吴子丹, 等. 毕赤酵母工程菌 ZLHY6 发酵条件优化[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(2): 100-103.
- [15] 付生慧, 张宏福, 何瑞国. 木聚糖酶在制粒工艺中热稳定性的研究[J]. 饲料工业, 2005, 6(17): 15-17.
- [16] 孙建义, 李卫芬, 顾赛红. 体外模拟动物胃肠条件下 β -葡聚糖酶稳定性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(1): 18-19.
- [17] MERCURIO M, CAPPELLETTI P, GENNARO B D, et al. The effect of digestive activity of pig gastro-intestinal tract on zeolite-rich rocks: An in vitro study[J]. Microporous & Mesoporous Materials, 2016, 225(6): 133-136.
- [18] 张宏福, 李长忠, 顾宪红, 等. 断奶日龄对仔猪胰腺和肠道中糜蛋白酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(1): 13-16.