



# 一种来源于 *Phialophora attae* 的玉米赤霉烯酮内酯水解酶 ZHD11F 的酶学表征和结构特点

林晓帆<sup>1</sup>, 张诺<sup>1</sup>, 王辉<sup>1</sup>, 王美星<sup>2</sup>, 蒋思婧<sup>1</sup>, 贺妮莎<sup>1\*</sup>, 张桂敏<sup>1,2\*</sup>

1 湖北大学生命科学学院, 湖北省生物资源绿色转化协同创新中心, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

林晓帆, 张诺, 王辉, 王美星, 蒋思婧, 贺妮莎, 张桂敏. 一种来源于 *Phialophora attae* 的玉米赤霉烯酮内酯水解酶 ZHD11F 的酶学表征和结构特点. 微生物学报, 2022, 62(11): 4202–4212.

Lin Xiaofan, Zhang Nuo, Wang Hui, Wang Meixing, Jiang Sijing, He Nisha, Zhang Guimin. Enzymatic and structural characterization of a zearalenone lactone hydrolase ZHD11F from *Phialophora attae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4202–4212.

**摘要:** 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种雌激素类真菌毒素, 可以与动物的雌激素受体竞争性结合, 导致动物生殖系统内的激素紊乱。ZEN 内酯水解酶(ZEN lactone hydrolase, ZHD)可以水解 ZEN 中的内酯键, 进而使其转化为无雌激素毒性的产物。【目的】利用生物信息学分析以及酶学性质探索, 鉴定出一个具有新特性的 ZEN 内酯水解酶。【方法】构建 pET28a-zhd11f 表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达 ZHD11F, 利用 Ni-NTA 纯化得到 ZHD11F, 对其酶学性质进行分析, 并通过结构模拟和分子动力学分析阐明 ZHD11F 低温活性的机制。【结果】ZHD11F 以 ZEN 为底物, 比酶活为 40.04 U/mg, 最适反应温度与 pH 值分别为 35 °C 和 8.0, 在 pH 6.0–9.5 的范围内具有超过 60%的酶活力, 在 35 °C 以下具有较好的热稳定性, 能够耐受多种金属离子。ZHD11F 在 10 °C 和 20 °C 时, 其活性分别保持 20%和 40%。更多的 loop 区增加了结构的柔韧性是该酶稳定性较差、在低温活性比较高的主要原因。【结论】*Phialophora attae* 是瓶霉属的一种真菌, 目前此真菌来源的酶极少被鉴定。关于本研究将 *Phialophora attae*

**基金项目:** 国家自然科学基金(31970059); 2021 年湖北省高价值知识产权培育工程(专利类)项目; 中央高校基本科研业务费专项资金(202131)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970059), by the 2021 Hubei Province High-Value Intellectual Property Cultivation Project (Patent) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (202131)

\*Corresponding authors. HE Nisha, Tel: +86-27-88663882, E-mail: henisha@hubu.edu.cn; ZHANG Guimin, Tel: +86-27-88663882, E-mail: zhangguimin@hubu.edu.cn, zhangguimin6@hotmail.com

Received: 31 March 2022; Revised: 22 April 2022; Published online: 19 June 2022

来源的 ZEN 内酯水解酶 ZHD11F, 在大肠杆菌中成功可溶性表达并得到纯酶, 表征分析显示该酶是目前报道的第一个低温 ZEN 内酯水解酶, 为研究此类酶的耐冷机制、广温度范围提供了候选, 同时拓展了 *Phialophora attenuata* 来源酶的功能研究。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮; ZEN 内酯水解酶; 低温活性; 异源表达; 酶学性质

## Enzymatic and structural characterization of a zearalenone lactone hydrolase ZHD11F from *Phialophora attenuata*

LIN Xiaofan<sup>1</sup>, ZHANG Nuo<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, WANG Meixing<sup>2</sup>, JIANG Sijing<sup>1</sup>, HE Nisha<sup>1\*</sup>, ZHANG Guimin<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

**Abstract:** Zearalenone (ZEN) is an estrogen-like mycotoxin that can competitively bind to animal estrogen receptors, resulting in hormonal disorders in the reproductive system of animals. ZEN lactone hydrolase (ZHD) can hydrolyze the lactone bond of ZEN to non-toxic products. **[Objective]** By bioinformatics analysis and enzymatic property exploration, a ZEN lactone hydrolase with new properties was identified. **[Methods]** The pET28a-*zhd11f* expression vector was constructed and introduced into *Escherichia coli* BL21(DE3). ZHD11F was obtained by purification with Ni-NTA, and its enzymatic properties were analyzed. Furthermore, the mechanism of its low-temperature activity was elucidated by structural simulation and molecular dynamics. **[Results]** With ZEN as the substrate, the specific activity of ZHD11F was 40.04 U/mg, and its optimum reaction temperature and pH value were 35 °C and 8.0 respectively. The enzyme activity of ZHD11F exceeded 60% in the range of pH 6.0–9.5, and it showed good heat stability below 35 °C and could endure a variety of metal ions. The activity of ZHD11F remained 20% and 40% at 10 °C and 20 °C, respectively. A number of loop regions led to increased structural flexibility, which was the main reason for the poor stability of the enzyme and its high activity at low temperature. **[Conclusion]** *Phialophora attenuata* was a fungus belonging to the genus *Phialophora*, and the enzymes derived from this fungus were rarely identified. In this study, the ZEN lactone hydrolase ZHD11F from *P. attenuata* was successfully expressed in *E. coli* and pure enzyme was obtained. Characterization analysis showed that this enzyme was the first low-temperature ZEN lactone hydrolase reported so far, which provided reference for studying the cold-tolerance mechanism and wide-temperature range of such enzymes, and also expanded the functional study of enzymes derived from *P. attenuata*.

**Keywords:** zearalenone; zearalenone lactone hydrolase; low-temperature activity; heterologous expression; enzymatic properties

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种由镰刀菌产生的雌激素类真菌毒素, 常见于谷物

作物中, 是广泛传播的霉菌毒素之一<sup>[1]</sup>。据联合国粮食及农业组织调查发现, 世界上受 ZEN

污染的谷物占谷物总产量的 25%。受 ZEN 感染的作物被牲畜食用后, ZEN 会累积在动物的不同生殖器官或组织中<sup>[2]</sup>, 进而竞争性地和动物的雌激素受体结合, 导致动物的生殖系统内激素紊乱, 进一步影响动物的生殖发育系统<sup>[1]</sup>。

ZEN 的脱毒过程包括依赖物理、化学或生物等方面的手段来削弱或消除其毒性。物理方法包括吸附剂吸附、洗涤、高温加热等方式, 虽然可以去除一定量的 ZEN, 但是存在成本高且效果差等缺点。化学方法包括使用强酸、强碱、强氧化剂、还原剂或氯化剂等来破坏 ZEN 的化学结构, 进而去除其毒性; 然而, 化学物质的使用会导致饲料营养特性的变化, 且存在食品安全方面的问题。而生物降解法, 通过微生物细胞吸附或者酶降解法降解 ZEN, 将 ZEN 转化为无毒产物, 这种方法相对于物理化学方法来说更安全、高效、经济、环保, 且不会破坏谷物中的营养物质, 逐渐成为 ZEN 脱毒的重要研究方向<sup>[3-5]</sup>。据文献报道, ZEN 内酯水解酶可以水解 ZEN 中的内酯键, 得到无雌激素毒性的产物。因此, 挖掘具有优良性质的 ZEN 内酯水解酶的工作在持续进行。2002 年, Takahashi- Ando 等从 *Clonostachys rosea* IFO 7063 中鉴定出一个 ZEN 降解酶的编码基因, 命名为 *zhd101*<sup>[6]</sup>。2014 年, Peng 等解析了 ZHD 第 1 个内酯水解酶 ZHD101 的结构<sup>[7]</sup>。2017 年, Hui 等发现并解析了 ZEN 内酯水解酶 CbZHD 的结构, 并对该酶进行了表征<sup>[8]</sup>。2018 年, Wang 等从 *Rhinochrysiella mackenziei* 中获取了一个与 *zhd101* 同源性为 65% 的 ZEN 降解酶编码基因, 命名为 *zhd518*, 并对 ZHD518 进行了酶学表征<sup>[9]</sup>。同年, Zheng 等解析了 RmZHD(ZHD518) 的结构<sup>[10]</sup>。2020 年, Yu 等从 *Phialophora americana* 中获取了一个 ZEN 内酯水解酶 ZHD607, 并在毕赤酵母中进行了

异源表达<sup>[11]</sup>。同年, Zhang 等从 *Gliocladium roseum* MA918 中鉴定出 1 个 ZEN 内酯水解酶 ZENG, 在大肠杆菌中进行异源表达<sup>[12]</sup>。2022 年, Jiang 等从 *Fonsecaea monophora* 获取了一个 ZEN 内酯水解酶 ZHD11B, 并在大肠杆菌中成功进行异源表达和酶学表征<sup>[13]</sup>。

目前主要鉴定并研究了 6 个 ZEN 内酯水解酶(zearalenone lactone hydrolase, ZHD): ZHD101<sup>[6]</sup>、CbZHD<sup>[8]</sup>、ZHD518 (RmZHD)<sup>[9]</sup>、ZHD607<sup>[11]</sup>、ZENG<sup>[12]</sup>、ZHD11B<sup>[13]</sup>, 其中前 3 个已经被解析出晶体结构。ZHD 属于  $\alpha/\beta$ -水解酶家族, 在结构上具有高度相似的特点: 包含一个帽子结构域和一个核心结构域。底物 ZEN 结合在一个位于核心和帽子结构域之间的深口袋中, 毗邻催化三联体 Ser-His-Glu<sup>[7]</sup>。ZHD 家族可以裂解 ZEN 的酯键, 使其在失去 CO<sub>2</sub> 的同时产生一个具有开放侧链的二羟基苯基衍生物。而对 ZHD 家族的 ZEN 内酯水解酶的相关报道较少, 通过基因挖掘或者蛋白质定向进化等手段来获取更多 ZEN 降解的候选酶资源, 有助于推进 ZEN 降解酶的研究。

真菌是一个重要的酶资源库, 目前已报道的 ZEN 内酯水解酶均来源于真菌, 本研究在调研过程中发现了 1 个 *Phialophora attae* 来源的基因与 ZHD518 具有较高同源性, 且目前很少有关于这个真菌来源的酶的鉴定与表征, 因此, 选取这个基因进行研究。本研究从 *Phialophora attae* 筛选了 1 个潜在的 ZEN 内酯水解酶基因 *zhd11f*, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 内得到可溶性表达, 对重组 ZHD11F 的酶学性质、耐冷机制以及热稳定性进行了探索, 为研究此类酶的耐冷机制、广温度范围等提供了研究方向, 同时拓展了 *Phialophora attae* 来源的酶的功能研究。

# 1 材料与方法

## 1.1 菌株和试剂

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  克隆菌株和 BL21(DE3) 表达菌株购自 Transgene 公司。BamH I/Xho I 等限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等均购自 TaKaRa 公司(大连)。PCR 产物纯化和胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和蛋白 Marker 购自于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。Bradford 蛋白浓度试剂盒购自于 Omega Bio-Tek 公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂、GE HiTrap Desalting 柱购自 GE Healthcare 公司。ZEN 购自于 Sigma-Aldrich 公司。乙腈购于弗顿生化科技有限公司。

## 1.2 引物

ZEN 内酯水解酶基因 *zhd11f* (GenBank ID: XM\_018142292.1) 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。同时设计并合成了用于扩增 *zhd11f* 基因的引物 ZHD11F-F 与 ZHD11F-R(表 1)。

本文中的突变体 ZHD11F (H245A) 被用来探究 ZHD11F 的活性位点(表 1)。本研究使用含有突变位点的引物通过 PCR 对整个环形质粒 pET28a-*zhd11f* 进行扩增。回收的线性产物经 *Dpn* I 处理后转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中完成突变。最后将突变体在 BL21(DE3) 中诱导、表达和纯化, 进行后续酶学研究。

表 1 引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
ZHD11F-F	GAATTCATGACCCTGACCAGAATCAGAG
ZHD11F-R	TCGAGTCACTCGAGAACGTACTTCCTAGTG
H245A-F	GGTGCTTTCCCATACGTTACTCACCC
H245A-R	GGGAAAGCACCACTGGCAACAAGG

## 1.3 序列分析、同源性建模和分子动力学模拟

蛋白质序列相似性通过在 NCBI 中进行 BLAST 分析得到。多序列比对由 Clustal X 和 ESPript<sup>[14]</sup> 得到, 信号肽使用 SignalP4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行预测。ZHD11F 结构通过 I-TASSER Suite (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 进行模拟<sup>[15]</sup>。ZHD11F 蛋白结构和重叠采用软件 Discovery Studio 2021 进行可视化。

ZHD11F 和 ZHD518 的分子动力学模拟在 YASARA (<http://www.yasara.org>) 中进行。该模拟系统放置在一个 pH 8.0 的周期性六面体里, 在 AMBER 14 力场下, 首先进行加氢反应和能量最小化, 接着系统温度逐渐从 0 升温到 308 $\pm$ 0.5 K, 并保持稳定。最后, 完成一个时长为 20 ns 的分子动力学模拟, 且每 100 ps 保存一张快照。

## 1.4 重组表达质粒构建

将扩增得到的 *zhd11f* 片段用 BamH I/Xho I 进行双酶切, 同时 BamH I/Xho I 双酶切线性化处理表达载体 pET28a。经 DNA 连接酶得到的连接混合物转化进入 DH5 $\alpha$ , 涂布于含有卡那霉素(终浓度为 50  $\mu$ g/mL)的 LB 固体平板上。挑取阳性转化子, 分别使用菌落 PCR 和 BamH I/Xho I 双酶切检验重组质粒, 将初步验证正确的质粒送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序正确的重组质粒命名为 pET28a-*zhd11f*。

## 1.5 重组 ZHD11F 的表达和纯化

将重组质粒 pET28a-*zhd11f* 转入到大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。使用含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 在 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 的摇床里培养至  $OD_{600}$   $\approx$  0.6 时, 添加终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导 ZHD11F 的表

达,并在 18 °C、220 r/min 的摇床中培养 18 h,3 800 r/min 离心 10 min 收集菌体。将菌体重悬于 20 mL 破碎缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0)中,经超声破碎、离心和用 0.22 μm 滤膜过滤上清后开始纯化。使用 Ni-NTA (His•Bind Kit, Novagen)层析柱对 ZHD11F 进行纯化,结合在层析柱上的目的蛋白,在经 10 mL 洗杂缓冲液 I (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)和 10 mL 洗杂缓冲液 II (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, pH 8.0)清洗非特异性结合蛋白后,经过洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱 5 次后收集目的蛋白(每次洗脱 1 mL)。最后,经 PD-10 脱盐柱(GE)除去咪唑后,使用 12% SDS-PAGE 分析各相蛋白大小及纯度,使用 Bradford 法以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准品检测蛋白浓度。

### 1.6 ZEN 内酯水解酶 ZHD11F 酶活测定

总体积为 500 μL 的酶反应体系,由 20 μL 的底物 ZEN (1 mg/mL ZEN 溶在色谱级甲醇)、30 μL 的稀释酶液和 450 μL 的缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)组成。在特定温度下反应 10 min 后添加 500 μL 的色谱级甲醇终止反应。反应后的样品经过滤以后由高效液相色谱(HPLC)测定底物 ZEN 的残余量。HPLC 检测条件为:Agilent Carbohydrate column (5 μm, 4.6×150 mm)色谱柱,流速 1 mL/min,流动相为 60%乙腈和 40%水相等度洗脱,上样体积为 20 μL,总时长 6 min。

底物降解量等于底物总量减去底物剩余量。ZEN 降解酶的酶活单位(U)定义为:每分钟降解 1 μg 底物所用的酶量为一个酶活单位。玉米赤霉烯酮降解酶活力的测定标准选用

湖北省地方标准 DB42/T 1630-2021。

### 1.7 温度对酶活和稳定性的影响

ZHD11F 的酶活测定是在 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中进行,在 10、15、20、25、30、35、40、45、50 °C 条件下分别反应 10 min,来测定 ZHD11F 的最适反应温度。ZHD11F 的热稳定性测定是将 ZHD11F 分别在 35、37、40 °C 分别孵育不同时间:5、10、15、20 min,在 35 °C 和 pH 8.0 条件下测定 ZHD11F 的残余活性。

### 1.8 pH 对酶活和稳定性的影响

pH 对酶活的影响是在不同 pH 的 50 mmol/L 缓冲液中测定的:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-citric acid (50 mmol/L, pH 4.0-8.0), Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.0-9.0), glycine-NaOH (50 mmol/L, pH 9.0-10.0), pH 间隔为 0.5。pH 稳定性的测试方法是:首先将 ZHD11F 置于上述缓冲液中,于 4 °C 条件下孵育 16 h,然后在 35 °C 和 pH 8.0 下测试残余活性。

### 1.9 金属离子对酶活的影响

在 35 °C、pH 8.0 的条件下,测定了不同金属离子和 EDTA 对 ZHD11F 酶活的影响。各成分的添加量均为 5 mmol/L。以不添加任何金属离子的酶活设定为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZHD11F 的生物信息学分析

本研究以已报道的 *zhd101* (GenBank ID: AB076037.1)、*zhd518* (GenBank ID: XM\_013418296.1)基因为参考基因,通过在 NCBI 数据库中序列比对,得到来源于 *Phialophora attae* 的未知功能蛋白(GenBank ID: XM\_018142292.1)基因 *zhd11f* 进行后续研究,其中 ZHD11F 与 ZHD518 的氨基酸序列同源率为 59%,与 ZHD101 的氨基酸序列同源率为 52%。分析显示,*zhd11f* 的基因总长为 804 bp,

其编码 267 个氨基酸且没有信号肽, 其分子质量和蛋白质等电点(pI)分别为 29.8 kDa 和 5.6。

通过多序列比对分析(图 1)预测 ZHD11F 的保守区域和催化三联体。结果表明 ZHD11F 中存在假定的催化三联体, 即 Ser105-Glu128-His245, 进而推测 ZHD11F 是潜在的 ZEN 内酯水解酶。

## 2.2 ZHD11F 的表达纯化

为了分析 ZHD11F 蛋白的功能, 构建了

ZHD11F 的大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-*zhd11f* 表达菌株, 其 N 端含有 6 个组氨酸标签。对表达菌株进行诱导表达及蛋白纯化。将破菌后的细胞提取物与 Ni-NTA 树脂结合, 用含有不同浓度梯度咪唑的缓冲液进行洗杂与洗脱, 纯化后的蛋白用 GE HiTrap 脱盐柱脱盐。SDS-PAGE 分析显示, ZHD11F 以可溶性形式表达, 且纯化后的 ZHD11F 以单带形式迁移, 分子大小为 35 kDa 左右(图 2)。

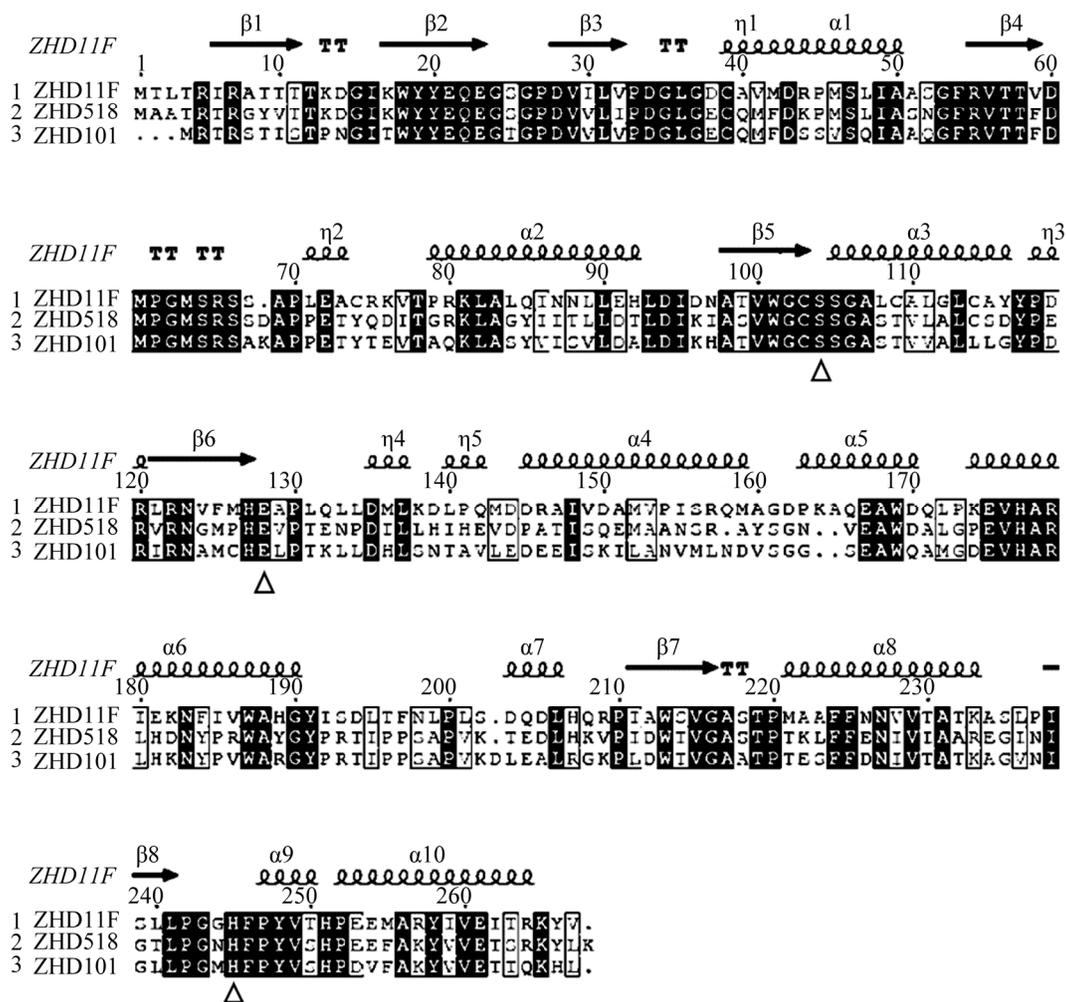


图 1 ZHD11F 与 ZHD518、ZHD101 的序列比对

Figure 1 Sequence alignment of ZHD11F, ZHD518 and ZHD101. The predicted catalytic residues of ZHD11F (S105-E128-H245) were shown by a hollow triangle.

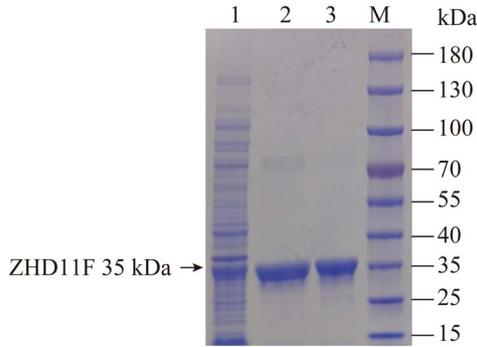


图 2 重组蛋白 ZHD11F 纯化结果

Figure 2 Purification of recombinant ZHD11F. 12% SDS-PAGE analysis of ZHD11F purified from induced *E. coli* cells. Lane M: molecular weight maker, from top to bottom in turn are 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 kDa; lane 1: supernatant of induced ZHD11F; lane 2: eluent ZHD11F with 300 mmol/L imidazole; lane 3: imidazole free ZHD11F after desalinization.

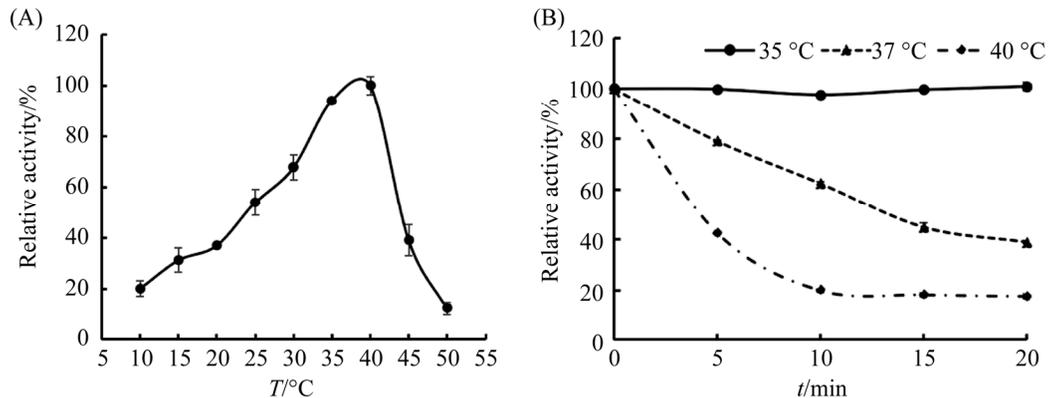


图 3 温度对 ZHD11F 酶活及稳定性的影响

Figure 3 Effects of temperature on the activity and stability of ZHD11F. A: effects of temperature on the activity of ZHD11F. To determine the optimum temperature of ZHD11F, the reactions were conducted from 10 °C to 50 °C in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0). Maximum activity was set as 100%. B: effects of temperature on the stability of ZHD11F. The ZHD11F in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) was preincubated at 35 °C, 37 °C and 40 °C for 20 min, respectively, sampling every 5 min, followed by residual activity determination at pH 8.0 and 35 °C. The original activity was set as 100%. Each value of the assay was the arithmetic mean of triplicate measurements.

### 2.3.2 pH 对 ZHD11F 酶活及稳定性的影响

经检测发现, ZHD11F 的最适 pH 为 8.0, 并且 ZHD11F 在 pH 6.0–9.5 的范围内具有超过

## 2.3 ZHD11F 酶学性质的表征

### 2.3.1 温度对 ZHD11F 酶活及稳定性的影响

在 10–55 °C 范围内, 按照方法 1.7 测定 ZHD11F 对 ZEN 的活性, 研究结果发现, 在 35–40 °C 之间 ZHD11F 对 ZEN 的降解效率最高(图 3A), 在 20–45 °C 之间能保持最高活性的 40%以上, 且 ZHD11F 在 10 °C 仍能保持 20%的相对活性, 但当反应温度高于 40 °C 时活性迅速下降。ZHD11F 的热稳定性分析表明, ZHD11F 在 35 °C 孵育 20 min 可以保持原有活性不变, 37 °C 孵育 20 min 可以保持最高活性的 40%以上, 但在 40 °C 孵育 20 min 失去了 75%以上的活性(图 3B)。结果说明 ZHD11F 是一种低温酶, 在 35 °C 以下具有较好的热稳定性。

60%的酶活性(图 4A)。pH 稳定性结果显示, ZHD11F 在 pH 5.5–8.5 之间保留了超过 50%的残余活性(图 4B)。因此, ZHD11F 是一种中性

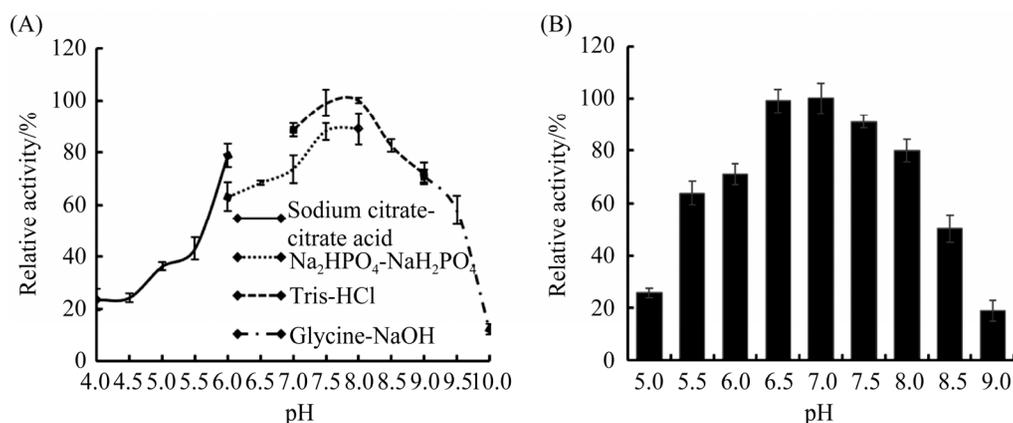


图 4 pH 对 ZHD11F 酶活及稳定性的影响

Figure 4 Effects of pH values on the activity and stability of ZHD11F. A: effects of pH value on the activity of ZHD11F. The reactions were conducted at 35 °C with ZEN as substrate in different buffers. B: effects of pH value on the stability of ZHD11F. The stability of ZHD11F was determined from pH 5.0 to pH 9.0 at 4 °C for 16 h. After preincubation, the residual activity was measured at 35 °C and pH 8.0. Each value of the assay was the arithmetic mean of triplicate measurements.

偏碱的 ZEN 降解酶，能够在广泛 pH 的范围内保持相对较高的活性。ZHD11F 的最适反应温度和 pH 值分别为 35 °C 和 8.0，在此条件下对 ZEN 的比酶活为 40.04 U/mg。

#### 2.4 金属离子对 ZHD11F 活性的影响

测试了不同金属离子对 ZHD11F 催化活性的影响，结果显示添加  $K^+$  或  $Ca^{2+}$  等并不会影响酶的活性，添加  $Mg^{2+}$  在一定程度上能够抑制酶活性，而添加  $Cu^{2+}$  之后使得酶只保留 10% 的活性，添加 5 mmol/L 的 EDTA 对酶的活性几乎没有影响(表 2)。

#### 2.5 ZHD11F 的结构建模及活性位点的测定

本研究以 ZEN 内酯水解酶 ZHD518 (RmZHD, PDB ID: 5XO8) 的结构为模板，通过网站 I-TASSER 对 ZHD11F 的结构进行了模拟。使用 Discovery Studio 进行三级结构的可视化。ZHD11F 的催化三联体 Ser105-Glu128-His245 与 ZHD518 (Ser105-Glu129-His243) 是对应的，都位于底物结合口袋中。对 2 个蛋白中的催化三联体进行标注，明显看到催化三联

体之间摆动的角度以及距离均不同(图 5)。将 ZHD11F 的 His245 突变为 Ala，突变体 ZHD11F (H245A) 未检测到酶活性，这一结果表明，His245 是 ZHD11F 的一个重要催化活性位点。

表 2 金属离子对 ZHD11F 酶活的影响

Table 2 Effect of metal ions on the activity of ZHD11F

Metal ions (5 mmol/L)	Relative enzyme activity/%
No addition	100.00
$Li^+$ (LiCl)	94.88±6.86
$Na^+$ (NaCl)	96.07±6.38
$Ca^{2+}$ ( $CaCl_2$ )	87.38±4.49
$Mg^{2+}$ ( $MgCl_2$ )	66.64±8.83
$K^+$ (KCl)	91.86±2.96
$Co^{2+}$ ( $CoCl_2$ )	100.26±1.88
$Mn^{2+}$ ( $MnCl_2$ )	110.37±3.52
$Cu^{2+}$ ( $CuCl_2$ )	10.44±1.75
EDTA (5 mmol/L)	81.54±10.88

All the reactions were performed at the optimum conditions (35 °C and pH 8.0) with ZEN as substrate. The activity of enzyme without any additions was set as 100%.

## 2.6 ZHD11F 耐低温性质及热稳定性分析

Tang 等的研究表明, 蛋白柔性结构与 loop 区的增加可能是低温下具有高催化活性的原因之一<sup>[16]</sup>。将 ZHD11F 与 ZHD518<sup>[9]</sup>进行结构比对。图 6 中显示出, ZHD11F 和 ZHD518 的整体结构上相差不大, 但是 ZHD11F 的 loop 区明显增加, 表明 loop 区可能是影响 ZHD11F 耐冷性的因素之一。

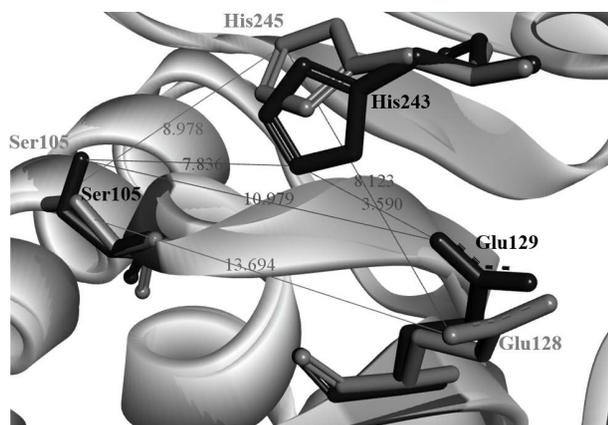


图 5 ZHD11F 与 ZHD518 催化位点的比较

Figure 5 Comparison between ZHD11F and ZHD518 catalytic sites. Grey stick residues and numbers represented the positions and distances between catalytic residues of ZHD11F (Ser105-Glu128-His245). Black stick residues and numbers represented the positions and distances between catalytic residues of ZHD518 (Ser105-Glu129-His243).

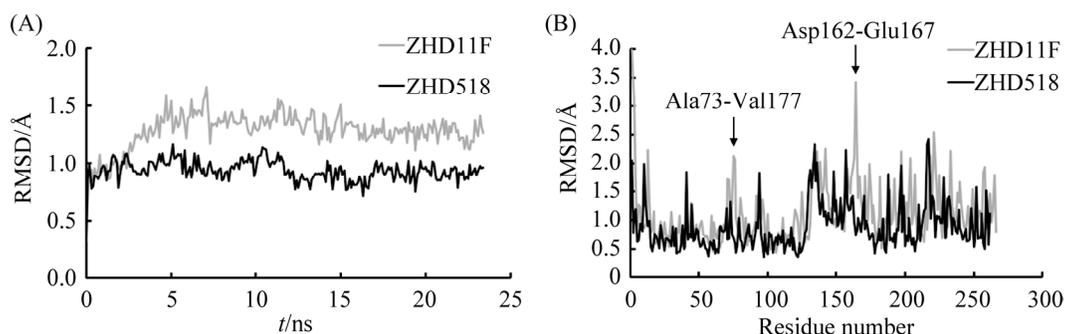


图 7 ZHD11F 与 ZHD518 的 RMSD 值以及 RMSF 值用于热稳定性分析

Figure 7 The RMSD and RMSF values of ZHD11F and ZHD518 are used for thermal stability analysis. A: RMSD value of ZHD11F and ZHD518 during the 20 ns MD simulation; B: RMSF value of ZHD11F and ZHD518 during the 20 ns MD simulation.



图 6 ZHD11F 与 ZHD518 结构比较

Figure 6 Structure comparison between ZHD11F and ZHD518. The three-dimensional structure of ZHD11F was grey colored, and that of ZHD518 was black colored. The increased loop region in ZHD11F was marked with black circle.

ZHD11F 相比 ZHD518<sup>[9]</sup>的热稳定性显著降低, 为了分析热稳定性降低的可能原因, 通过分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟比较 ZHD11F 与 ZHD518 之间的差异。根据主干原子的均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD), 所有酶在 10 ns 内达到平衡。文献显示整体的 RMSD 值越低, 蛋白质灵活性越低, 热稳定性越高<sup>[17]</sup>。图 7A 中显示, ZHD11F 的 RMSD 值低于 ZHD518, 表明 ZHD518 的结构更加稳定。接着将轨迹文件转换为 RMSF 随时间的波动数据以分析 ZHD11F 的灵活区域(图 7B), RMSF 代表每个残基的柔韧性, 柔韧性强

的氨基酸残基在 MD 模拟中就会出现较大幅度的波动, 相对应的 RMSF 的值就会很高。图 7B 中显示, ZHD11F 中的 Ala73-Val77 与 Asp162-Glu167 区域比 ZHD518 的相应位置更灵活, 推测 Ala73-Val77 与 Asp162-Glu167 区域可能是 ZHD11F 灵活性增加的因素之一, 从而降低了 ZHD11F 整体的热稳定性。

### 3 讨论与结论

玉米赤霉烯酮在世界范围内十分常见, 是由镰刀菌产生的一种 F2 霉菌毒素, 具有很强的雌激素毒性, 广泛存在于谷类食物中<sup>[18]</sup>。利用生物酶法降解 ZEN, 将 ZEN 转化为无毒产物, 相对于理化方法来说安全且高效。本研究结合生物信息学与酶学性质分析鉴定了一个 *Phialophora attae* 来源 ZEN 内酯水解酶 ZHD11F, ZHD11F 是一个全新的 ZEN 内酯水解酶。

对 ZHD11F 与其他已报道的 ZEN 内酯水解酶的酶学性质进行比较分析。第一, ZHD11F 的最适反应温度为 35 °C, 这与大多数 ZEN 内酯水解酶相似(35–40 °C)。有趣的是, ZHD11F 在 20 °C 时保留了 40% 的酶活性, 10 °C 保留了 20% 以上的活性, 这是目前尚未报道过的具有耐低温性质的 ZEN 内酯水解酶。热稳定性分析表明, ZHD11F 在 35 °C 以下具有较好的热稳定性, 明显低于大多数的 ZEN 内酯水解酶(<45 °C)。第二, ZHD11F 的最适 pH 值为 8.0, 除 *Clonostachys rosea* IFO 7063 来源的 ZHD101<sup>[6]</sup> 的最适 pH 为 9.0 以及 *Gliocladium roseum* MA918 来源的 ZENG<sup>[12]</sup> 的最适 pH 值为 7.0, 其余 ZEN 内酯水解酶最适 pH 值均为 8.0。ZHD11F 相比大多数 ZEN 内酯水解酶拥有更广泛的 pH 值范围, ZHD11F 在 pH 6.0–9.5 的范围内保留了超过 60% 的残余活性, 而 ZHD518<sup>[9]</sup>、CbZHD<sup>[8]</sup>、ZHD607<sup>[11]</sup>、

ZENG<sup>[12]</sup> 和 ZHD11B<sup>[13]</sup> 分别在 pH 6.0–9.0、pH 6.5–9.0、pH 6.0–8.5、pH 7.0–10.0 和 pH 6.0–9.5 的范围内保留了 60% 以上的活性。第三, ZHD11F 与其他 ZEN 内酯水解酶一样为非金属依赖酶。

ZHD11F 和大部分已经报道过的 ZHD 家族 ZEN 内酯水解酶一样, 具有较宽的反应温度、pH 范围, 且在中性条件下对 ZEN 的降解能力最强。但和其他已报道的 ZEN 降解酶不同, 其具备低温下的活性优势。ZHD11F 与已报道的 ZEN 内酯水解酶同源性最高的是 ZHD518, 结构分析显示, ZHD11F 的 loop 区相较于 ZHD518 明显增加。Loop 区的增多导致酶结构柔韧性的增加, 使得酶的构象更容易发生改变, 从而减少低温催化时的活化能, 维持低温状态下酶的高活性。因此 loop 区增多导致蛋白柔性结构的增加可能是影响 ZHD11F 冷活性的重要因素。当然, 不同的低温酶使用不同的策略维持低温下的柔韧性<sup>[19]</sup>。ZHD11F 的热稳定性明显低于 ZHD518, 分子动力学模拟推测 Ala73-Val77 与 Asp162-Glu167 可能是影响 ZHD11F 的柔性结构的相关氨基酸残基, 从而影响 ZHD11F 的热稳定性。关于 ZHD11F 冷活性的性质, 值得在后续工作中进一步深入探讨和验证。在未来的研究中, 可以对 ZHD11F 结构中的 loop 区以及整体结构中的柔性结构进行合理改造以用于工业应用。

本研究通过基因挖掘鉴定了 1 个 *Phialophora attae* 来源的低温 ZEN 内酯水解酶 ZHD11F, 对 ZEN 的催化活性为 40.04 U/mg, 在 pH 6.0–9.5 的范围内具有超过 60% 的酶活力。ZHD11F 在 35 °C 以下具有较好的稳定性, 其活性在 10 °C 和 20 °C 时分别能保持 20% 和 40%。更多的 loop 区增加结构柔韧性是 ZHD11F 稳定性较差、在低温活性比较高的主要原因。因此, ZHD11F 的低温特性和宽广 pH 范围使得其可以作为 ZEN 降解酶机制研究

的优秀候选者，同时拓展了 *Phialophora attae* 来源酶的功能研究。

## 参考文献

- [1] Wang N, Wu W, Pan J, Long M. Detoxification strategies for zearalenone using microorganisms: a review. *Microorganisms*, 2019, 7(7): E208.
- [2] Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 60: 218–237.
- [3] Hassan YI, Zhou T. Promising detoxification strategies to mitigate mycotoxins in food and feed. *Toxins*, 2018, 10(3): E116.
- [4] Shanakhat H, Sorrentino A, Raiola A, Romano A, Masi P, Cavella S. Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(11): 4003–4013.
- [5] Varga J, Tóth B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2005, 53(2): 189–203.
- [6] Takahashi-Ando N, Kimura M, Kakeya H, Osada H, Yamaguchi I. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical Journal*, 2002, 365(1): 1–6.
- [7] Peng W, Ko TP, Yang YY, Zheng YY, Chen CC, Zhu Z, Huang CH, Zeng YF, Huang JW, Wang AHJ, Liu JR, Guo RT. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2014, 4(107): 62321–62325.
- [8] Hui R, Hu X, Liu W, Liu W, Zheng Y, Chen Y, Guo RT, Jin J, Chen CC. Characterization and crystal structure of a novel zearalenone hydrolase from *Cladophialophora bantiana*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 2017, 73(pt 9): 515–519.
- [9] Wang M, Yin L, Hu H, Selvaraj JN, Zhou Y, Zhang G. Expression, functional analysis and mutation of a novel neutral zearalenone-degrading enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(pt a): 1284–1292.
- [10] Zheng YY, Liu WT, Chen CC, Hu XY, Liu WD, Ko TP, Tang XK, Wei HL, Huang JW, Guo RT. Crystal structure of a mycoestrogen-detoxifying lactonase from *Rhinochadiella mackenziei*: molecular insight into ZHD substrate selectivity. *ACS Catalysis*, 2018, 8(5): 4294–4298.
- [11] Yu X, Tu T, Luo H, Huang H, Su X, Wang Y, Wang Y, Zhang J, Bai Y, Yao B. Biochemical characterization and mutational analysis of a lactone hydrolase from *Phialophora americana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2570–2577.
- [12] Zhang Z, Xu W, Wu H, Zhang W, Mu W. Identification of a potent enzyme for the detoxification of zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(1): 376–383.
- [13] Jiang TZ, Wang MX, Li XY, Wang H, Zhao GQ, Wu P, Lu ZH, Zhang GM. The replacement of main cap domain to improve the activity of a ZEN lactone hydrolase with broad substrate spectrum. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 182: 108418.
- [14] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320–W324.
- [15] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2010, 5(4): 725–738.
- [16] Tang YM, Wu P, Jiang SJ, Selvaraj JN, Yang SH, Zhang GM. A new cold-active and alkaline pectate lyase from Antarctic bacterium with high catalytic efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(13): 5231–5241.
- [17] Liu Y, Wan Y, Zhu J, Yu Z, Tian X, Han J, Zhang Z, Han W. Theoretical study on zearalenol compounds binding with wild type zearalenone hydrolase and V153H mutant. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): E2808.
- [18] Caldwell RW, Tuite J, Stob M, Baldwin R. Zearalenone production by *Fusarium* species. *Applied Microbiology*, 1970, 20(1): 31–34.
- [19] Gianese G, Argos P, Pascarella S. Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2001, 14(3): 141–148.



**张桂敏**，北京化工大学教授，博导。毕业于华中农业大学，获微生物学博士学位，中国科学院微生物研究所博士后，美国佛罗里达大学访问学习。2000年至2021年在湖北大学工作，2021年9月调至北京化工大学工作，获霍英东青年教师奖，湖北省杰出青年基金，湖北省中青年突出贡献专家等。主要从事微生物资源和酶制剂及相关产品的研发工作，擅长酶的分子改造和高效表达技术，近5年以通讯作者在 *Nucleic Acids Research*、*Journal of Biological Chemistry* 等期刊发表SCI论文31篇，含二区及以上22篇，授权发明专利20项，实现成果转化6项，以第一或第二完成人获得湖北省科技进步奖3项，中国科技产业化促进会科技创新一等奖1项，湖北高校十大科技成果转化项目1项。