

## 研究报告

来源于 *Rhinochadiella mackenziei* 的玉米赤霉烯酮水解酶的  
表达纯化与酶学性质胡翔颖<sup>1,2</sup> 刘文婷<sup>2</sup> 刘卫东<sup>2</sup> 詹秀倩<sup>2</sup> 郭瑞庭<sup>2</sup> 李华钟<sup>1\*</sup> 郑迎迎<sup>2\*</sup>

(1. 工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 工业酶国家工程实验室 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)是污染最广泛的霉菌毒素之一,对饲料行业和畜牧业造成了巨大的经济损失。目前研究最为广泛的玉米赤霉烯酮降解酶 ZHD101 因其热稳定性较差,无法满足工业应用上的要求。【目的】为实现玉米赤霉烯酮降解酶在工业上的应用,寻找酶学性质更突出的 ZEN 降解酶。【方法】基于对 GenBank 数据库的挖掘,发现一个来源于麦氏喙枝孢霉(*Rhinochadiella mackenziei* CBS 650.93)的 *Rmzhd* 基因,构建 pET-46-*Rmzhd* 质粒。利用大肠杆菌表达体系和亲和层析、离子交换纯化体系对蛋白进行表达和纯化,通过高效液相色谱分析酶学性质。【结果】发现一个新的 ZEN 水解酶 RmZHD, RmZHD 在 pH 8.6 和 45 °C 条件下的活性最高,而且具有较高的耐热性。结构分析表明,较高的盐桥数目和溶剂暴露脯氨酸含量可能是造成其高耐热性的原因。【结论】本研究为促进玉米赤霉烯酮降解酶在工业上的应用打下基础。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮水解酶, 表达纯化, 酶学性质, 热稳定性

Expression, purification and characterization of a novel zearalenone  
hydrolase from *Rhinochadiella mackenziei*HU Xiang-Ying<sup>1,2</sup> LIU Wen-Ting<sup>2</sup> LIU Wei-Dong<sup>2</sup> ZHAN Xiu-Qian<sup>2</sup> GUO Rui-Ting<sup>2</sup>  
LI Hua-Zhong<sup>1\*</sup> ZHENG Ying-Ying<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Industrial Enzymes National Engineering Laboratory, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** [Background] Zearalenone (ZEN) is one of the most widely contaminated mycotoxins, which causes huge economic losses to feed industry and animal husbandry. The lactonase ZHD101 is the most widely studied ZEN-detoxifying enzyme. However, its application in industry was limited by the low thermostability. [Objective] In order to realize the application of zearalenone-degrading

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31400678)

**\*Corresponding authors:** E-mail: LI Hua-Zhong: hzhli@jiangnan.edu.cn; ZHENG Ying-Ying: zheng\_yy@tib.cas.cn

**Received:** January 31, 2018; **Accepted:** April 20, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 12, 2018

**基金项目:** 国家自然科学基金(31400678)

**\*通信作者:** E-mail: 李华钟: hzhli@jiangnan.edu.cn; 郑迎迎: zheng\_yy@tib.cas.cn

**收稿日期:** 2018-01-31; **接受日期:** 2018-04-20; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-05-12

enzyme in industry, this study explored a ZEN-detoxifying enzyme with more prominent enzymatic properties. **[Methods]** We found an *Rmzhd* gene from *Rhinoctadiella mackenziei* CBS 650.93 in the GenBank database, and constructed the pET-46-*Rmzhd* plasmid. *E. coli* system was used to express the target protein. The protein was purified by using affinity chromatography and ion exchange purification system. Enzymatic properties were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** In this study, we characterized a novel ZEN hydrolase, denoted as RmZHD. RmZHD exhibits the highest activity at pH 8.6 and 45 °C, and has a higher thermostability. Analyzing the structure of RmZHD, we found that the higher contents of salt bridges and solvent-exposed prolines might contribute to higher protein thermostability. **[Conclusion]** This study provides foundation for improving the industrial applications of zearalenone hydrolases.

**Keywords:** Zearalenone hydrolase, Expression and purification, Enzymatic properties, Thermostability

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN), 又称 F-2 毒素, 是一种具有类雌激素作用的非类固醇类真菌毒素, 主要由禾谷镰刀菌和三线镰刀菌等真菌在玉米、大麦、小麦、高粱等谷物中释放, 是最常见的一种镰刀菌毒素<sup>[1]</sup>。玉米赤霉烯酮作为全球污染粮食最广泛的霉菌毒素之一, 在大部分谷物以及农副产品中都可检测到它的存在。玉米赤霉烯酮具有类雌激素的活性, 能与雌激素受体结合, 引起种猪等家畜或者家禽早熟, 导致生殖周期紊乱, 给养殖业带来巨大的损失<sup>[2-4]</sup>。此外, 玉米赤霉烯酮具有潜在的致癌性, 经食物链流入人体后, 引起食道癌、乳腺癌等发病率增加<sup>[5-6]</sup>。

物理吸附和化学降解是目前市场上使用较多的脱毒方法, 但物理吸附由于缺乏对 ZEN 的选择性, 常造成其他营养物质的损失, 而化学降解则可能产生新的有毒物质, 不能实现完全脱毒<sup>[7-8]</sup>。近年来生物酶法脱毒受到越来越广泛的关注, 酶法脱毒条件温和, 不产生有害的化学物质, 并可将营养成分的损失降到最低<sup>[9]</sup>。目前研究较多的 ZEN 降解酶是来源于粉红粘帚菌的玉米赤霉烯酮水解酶 ZHD101<sup>[10-11]</sup>, 因其具有高效降解 ZEN 的能力而受到越来越广泛的关注, 但 Takahashi-Ando 等<sup>[12]</sup>对 ZHD101 的酶学性质表征表明, ZHD101 最适温度为 37–45 °C, 最适 pH 为 10.5, 在 50 °C 条件下没有活性, 过于温和的反应条件使其无法实现在工业上的大规模应用。为了实现玉米赤霉烯酮的生物法完全脱毒, 需要进一步挖掘酶学性质更加突出的 ZEN 降解酶。

本研究通过对 GenBank 数据库的挖掘, 发现了一种来源于麦氏喙枝孢霉的蛋白 RmZHD (GenBank 登录号: ACW19936.1), 其与 ZHD101 (GenBank 登录号: ALI16790.1) 的蛋白序列相似性最高, 为 65% (图 1)。通过对 RmZHD 蛋白进行质粒构建、表达纯化以及酶学性质的表征, 发现 RmZHD 对 ZEN 的水解活力与 ZHD101 相当, 但 RmZHD 具有更高的热稳定性, 使得 RmZHD 具有较高的应用潜力。通过与 ZHD101 的比较, 本研究发现了一些影响热稳定性的重要结构和序列特征, 这些结果将对玉米赤霉烯酮降解酶的耐热性改造及应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 引物与载体

正向引物(5'-GACGACGACAAGATGGCTGCTACCAGAAC-3')和反向引物(5'-GAGGAGAAGCCCGGTACTTCAGGTACTTTCTGGAGG-3')由华大基因公司合成; 实验中所用载体 pET-46 EK/LIC 购自 NOVAGEN 公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Phusion 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶, Thermo Science 公司; DNA Marker, 上海捷瑞生物工程有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、BCA 试剂盒, 康维世纪生物科技有限公司; 蛋白 Marker, Invitrogen 公司; 咪唑, Merck 公司; LB 培养基, 碧迪医疗器械(上海)有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

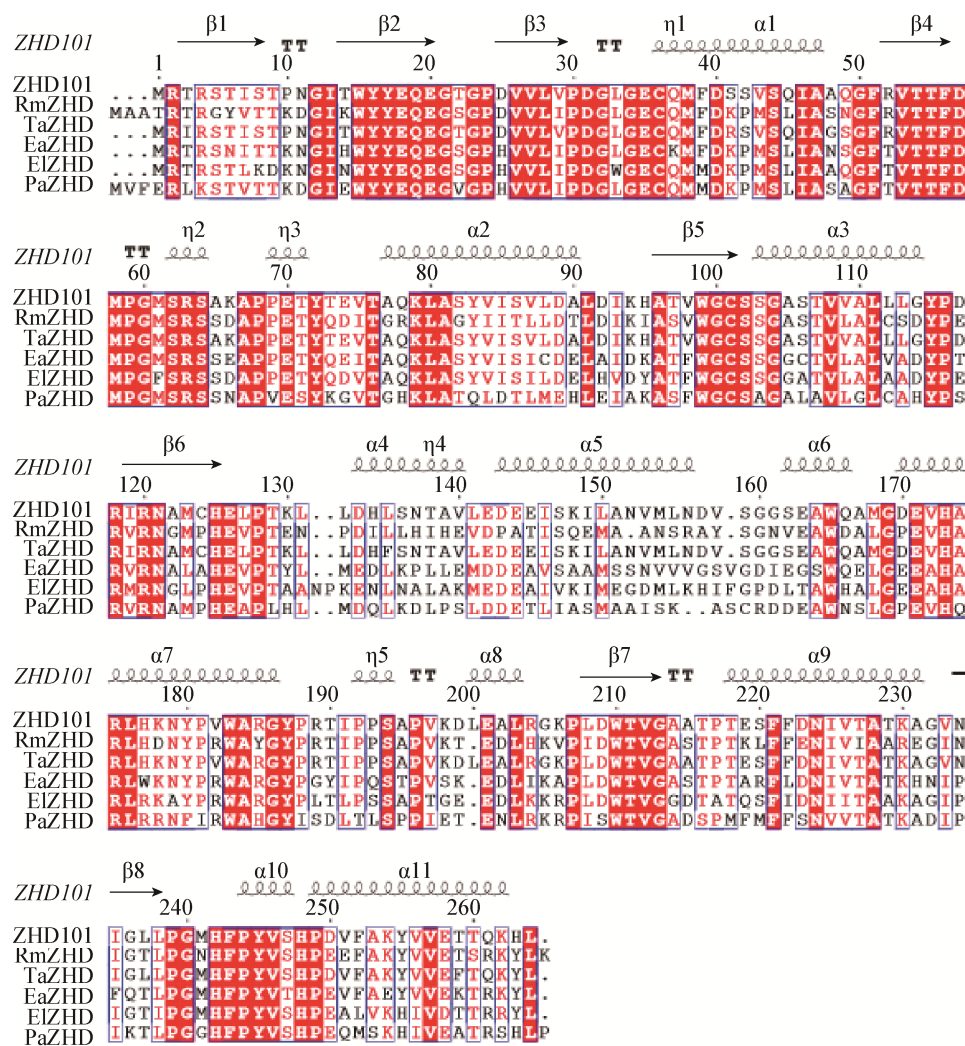


图 1 RmZHD 和 ZHD101 等同源蛋白序列比对

Figure 1 Sequence alignment of RmZHD, ZHD101 and other homologous proteins

PCR 仪、高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 核酸电泳仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; AKTA purifier 纯化系统、Ni-NTA 亲和层析柱、DEAE 阴离子交换柱, GE 公司; 低温高压细胞破碎机, 广州聚能生物科技有限公司; 台式冷冻离心机, Thermo 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。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒构建

通过将 ZHD101 的氨基酸序列在 GenBank 中进

行 BLASTp 比对, 选取序列相似性在 50%–70% 之间, 及活性中心附近氨基酸有差异的序列进行基因合成和催化活性分析, 发现来源于麦氏喙枝孢霉的 *Rmzhd* 基因具有较高的催化活力。因此本研究选择 *Rmzhd* 基因进行深入研究。

委托华大基因公司对 *Rmzhd* 基因进行序列全合成, 运用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)对 *Rmzhd* 基因进行体外扩增。PCR 反应体系 (50 μL): 2 U/μL Phusion DNA 聚合酶 0.5 μL, 100 ng/μL 的模板 1 μL, 10 μmol/L 正、反向引物各 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP mix 4 μL, 100% DMSO

1.5  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ GC buffer 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 28  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min。得到的 PCR 产物纯化后运用 pET-46 EK/LIC 载体试剂盒构建到 pET-46 EK/LIC 载体上, 将构建好的载体转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 然后将菌液涂到含有氨苄青霉素(Amp)抗性的 LB 平板上, 次日挑取单菌落送至华大基因公司测序。测序正确的克隆提取质粒存于-20  $^{\circ}\text{C}$ , 用于后续的表达纯化实验。

### 1.2.2 RmZHD 的表达纯化

将构建好的 pET-46-Rmzhd 质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 然后将菌液涂到含有氨苄青霉素(Amp)抗性的 LB 平板上, 次日挑取单菌落于 5 mL 含有 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素(Amp)的小试管中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养使菌体生长至  $OD_{600}$  值达 0.6–0.8 时, 转接至 100 mL 的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养使菌体生长至  $OD_{600}$  值达 0.6–0.8 时转入 5 L 的 LB 大瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 4 h 降温至 16  $^{\circ}\text{C}$ , 加诱导剂 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 降温诱导 18 h 后离心收集菌体。

将得到的菌体用 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、pH 7.5 的缓冲液重悬, 经低温高压细胞破碎机破碎(4  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min)后 4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 500 r/min 离心 90 min, 离心后的上清液即为粗酶液。将粗酶液加入到用 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、pH 7.5 的缓冲液平衡的 Ni-NTA 亲和层析柱中, 使用咪唑梯度(20–250 mmol/L)洗脱 His-标记的蛋白。然后将蛋白透析到 25 mmol/L Tris、pH 7.5 的缓冲液中, 再用 DEAE 阴离子交换柱进一步纯化, 蛋白用 0–250 mmol/L NaCl 线性洗脱。以上所有纯化步骤都是在 4  $^{\circ}\text{C}$  使用 AKTA purifier 纯化系统进行的。然后将含有目标组分的蛋白浓缩至 25 mg/mL, 储存在 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 7.5 的缓冲液中、保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2.3 活性测定

RmZHD 的酶活定义为: 每分钟反应减少 1  $\mu\text{mol}$

的底物所需酶量定义为 1 U。每个反应体系 210  $\mu\text{L}$ , 其中包括 5  $\mu\text{L}$  底物(5 mg/mL ZEN)和 5  $\mu\text{L}$  酶(0.25 mg/mL RmZHD), 200  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 7.5 反应缓冲液。30  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 之后, 加入 50  $\mu\text{L}$  1 mol/L HCl 和 300  $\mu\text{L}$  甲醇终止反应。产物过滤后取 20  $\mu\text{L}$  使用配备有 Welch Ultimate XB-C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )的高效液相色谱系统分析。样品在柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下用 60% 的乙腈以 0.6 mL/min 的流速洗脱下来, 吸光度检测波长为 254 nm, 底物的出峰时间为 13 min, 根据峰面积计算底物的减少量。

蛋白在 pH 6.0、7.0、8.0 (磷酸盐缓冲液), pH 7.5、8.0、8.5、9.0 (Tris-HCl 缓冲液), pH 8.6、9.6、10.6 (甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)的反应缓冲液中反应 10 min 确定其最适反应 pH 值。加有底物的反应缓冲液(25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5)分别在 25、30、35、40、42、45、47、50、55  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 2 min, 加入蛋白在不同温度条件下反应 10 min 确定其最适反应温度。蛋白分别在 40、45、50、55、60  $^{\circ}\text{C}$  下加热处理 1、2、4、6、10 min, 处理后的蛋白溶液立即放入 30  $^{\circ}\text{C}$  冷却, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 1 min 后取上清测残余酶活, 确定其热稳定性。所有实验均进行 2 次平行实验, 实验结果取平均值。

### 1.2.4 序列和结构分析

多序列比对使用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)和 ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 进行<sup>[13]</sup>; 利用 ESBRI 在线工具 (<http://bioinformatica.isa.cnr.it/ESBRI>)计算盐桥数目; 氢键数目和蛋白表面特征利用 DSSP 程序<sup>[14]</sup>计算。结构比对图利用 Pymol 软件生成(<http://pymol.sourceforge.net/>)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RmZHD 蛋白的表达纯化

利用 Ni-NTA 亲和层析柱和 DEAE 阴离子交换柱对粗酶液进行纯化(表 1)。将纯化后的蛋白用

表 1 RmZHD 的纯化结果

Table 1 Purification of RmZHD

纯化步骤	总蛋白	总活力	回收率	比活力	纯化倍数
Purification step	Protein (mg)	Total activity (U)	Recovery (%)	Specific activity (U/mg)	Fold
Crude extracts	2 975.0	127.50	100.0	0.043	1
Ni-NTA	52.2	65.70	51.5	1.270	30
DEAE	25.0	34.75	27.2	1.390	32

SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)进行分析,结果如图 2 所示。目的蛋白的分子量为 29.5 kD,纯化的蛋白分子量与目的蛋白分子量相符合,确定为 RmZHD 蛋白,可用于后续酶学性质分析。

2.2 RmZHD 的酶学性质表征

RmZHD 蛋白纯化后稀释至 0.25 mg/mL 进行最适反应条件的测定,结果如图 3 所示。在酸性条件

下,RmZHD 的活性受到抑制,活性很低,随着 pH 值的升高,RmZHD 的活性逐渐增强,当 pH 值增加到 8.6 时酶的活性最高,pH 值继续增加时酶的活性降低,当 pH 值为 10.6 时蛋白仍有活性,但活性仅为最高活性的 28.5%(图 3A)。RmZHD 蛋白在不同温度的反应体系中反应 10 min 得到如图 3B 的测定结果,随着反应温度的升高,蛋白的活性逐渐增强,当温度到 45 °C 时蛋白活性最高,当温度继续升高蛋白活性开始降低,当温度为 55 °C 时蛋白的活性仅为最高活性的 8.3%。由此可确定 RmZHD 蛋白在 pH 8.6 和反应温度 45 °C 条件下的活性最高。

RmZHD 蛋白在 40、45、50、55、60 °C 下加热处理 1、2、4、6、10 min,处理过后的蛋白在反应体系中 30 °C 反应 10 min,得到如图 4A 所示的结果,结果显示 RmZHD 在温度达到 55 °C 时酶才开始失活,酶加热处理 2 min 之后还有 40%的活性。用相同的方法测定 ZHD101 的热稳定性,比较发现 ZHD101 在 50 °C 时酶就开始失活,酶加热处理 1 min 仅剩 30%的活性(图 4B),由此可确定 RmZHD 具有较高的热稳定性。

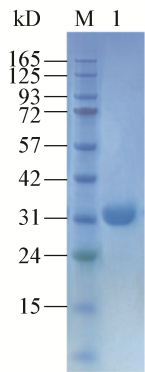


图 2 RmZHD 纯化电泳图

Figure 2 Purification and the SDS-PAGE analysis of RmZHD

注: M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 RmZHD 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: The purified RmZHD.

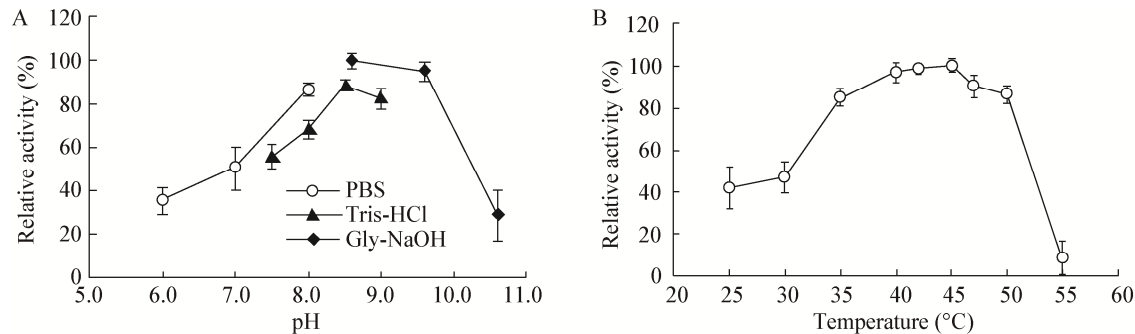


图 3 pH 和温度对 RmZHD 活性的影响

Figure 3 The effects of pH and temperature on RmZHD activities

注: A: pH 值对 RmZHD 活性的影响; B: 温度对 RmZHD 活性的影响。

Note: A: The effects of pH on RmZHD activities; B: The effects of temperature on RmZHD activities.

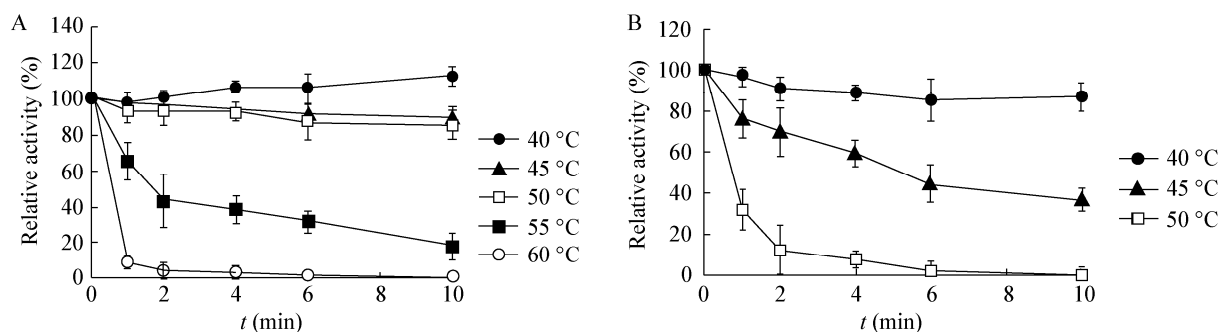


图4 RmZHD 和 ZHD101 的热稳定性比较

Figure 4 The thermostability comparison of RmZHD and ZHD101

注: A: RmZHD 热稳定性; B: ZHD101 热稳定性.

Note: A: The thermostability of RmZHD; B: The thermostability of ZHD101.

### 2.3 RmZHD 高耐热性的序列和结构基础

热稳定性是工业酶的重要性质。具有高热稳定性的酶在工业应用中可以减少用量, 提高催化效率, 降低微生物污染<sup>[15]</sup>。饲料业中的工业酶更需要具备高热稳定性以耐受造粒工艺的高温。蛋白热稳定性通常与分子中更多的相互作用(氢键、疏水作用、离子键、二硫键、金属键等)和更紧密的整体结构有关<sup>[16]</sup>。通过将 RmZHD 和 ZHD101 (PDB ID: 3WZL) 的结构<sup>[17-18]</sup>(2 个蛋白结构均已被本实验室解析)进行比较发现(表 2), RmZHD 和 ZHD101 结构中均没有二硫键和糖基化修饰, 氢键数目也类似。但 RmZHD 中盐桥的数目明显多于 ZHD101, 盐桥数目的增加通常被认为与热稳定性相关<sup>[19-20]</sup>。

表 2 影响 RmZHD 和 ZHD101 热稳定性的相关参数比较

Table 2 Comparison of related parameters that affecting thermostability of RmZHD and ZHD101

Enzyme	RmZHD	ZHD101
Disulfide bridge	0	0
Hydrogen bond	185	198
Salt bridge	23	17
Percentage of proline	22 (8.3%)	18 (6.8%)
Percentage of glycine	19 (7.1%)	20 (7.6%)
Percentage of arginine	13 (4.9%)	10 (3.8%)
Protein surface area exposed to the solvent (Å <sup>2</sup> )	11 123.1	11 031.6

另外, 通过对 2 个蛋白的氨基酸组成比对发现, RmZHD 的脯氨酸含量比 ZHD101 高(8.3%和 6.8%), 且 4 个多余脯氨酸中的 3 个位于暴露于溶剂的 Loop 区(图 5)。暴露于溶剂的脯氨酸被认为是可以赋予蛋白质高的热稳定性<sup>[21-22]</sup>, 推测较高的溶剂暴露脯氨酸含量可能赋予 RmZHD 较高的热稳定性。综上所述, 通过结构和序列比对分析, 本研究认为高的盐桥数目和溶剂暴露脯氨酸含量可能是导致 RmZHD 具有较高热稳定性的原因。

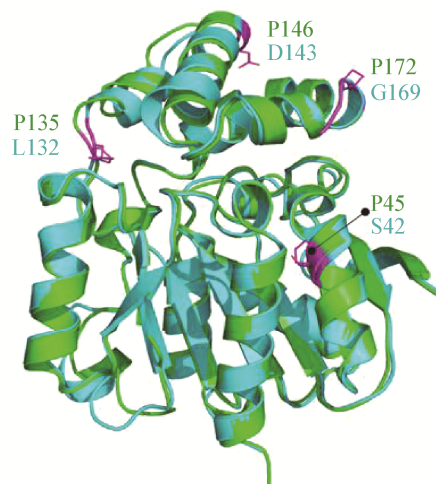


图5 RmZHD 和 ZHD101 的结构比较

Figure 5 The structural comparison of RmZHD and ZHD101

注: 绿色: RmZHD 结构; 蓝绿色: ZHD101 结构.

Note: Green: The structure of RmZHD; Cyan: The structure of ZHD101.



### 3 结论

本研究获得了一个新型玉米赤霉烯酮水解酶 RmZHD, 对 RmZHD 的酶学性质表征发现其具有较高的耐热性, 通过结构和序列比对分析, 发现较高的盐桥数目和溶剂暴露脯氨酸含量可能是导致 RmZHD 具有较高热稳定性的原因。下一步的研究将通过突变验证较高盐桥数目和溶剂暴露脯氨酸对 RmZHD 蛋白耐热性的影响, 并以此为依据对 RmZHD 进行分子改造, 为促进 ZEN 水解酶在工业上的应用提供基础。

### REFERENCES

- [1] Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): 1-18
- [2] Guan S, Ji C, Zhou T, et al. Aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(8): 1489-1503
- [3] Amézqueta S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review[J]. Food Control, 2012, 26(2): 259-268
- [4] Chen JC, Wiley AA, Kauffold J, et al. Perinatal zearalenone exposure affects RXFP1, RXFP2, and morphoregulatory gene expression in the neonatal porcine uterus[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1160(1): 188-189
- [5] Ahamed S, Foster JS, Bukovsky A, et al. Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells[J]. Molecular Carcinogenesis, 2001, 30(2): 88-98
- [6] Yu ZL, Hu DS, Li Y. Effects of zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2004, 58(2): 187-193
- [7] 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
- [8] Shan M, Xu ZR, Feng JL. Research progress of mycotoxin detoxification in feed[J]. Feed Research, 2005(11): 40-42 (in Chinese)  
单妹, 许梓荣, 冯健蕾. 饲料中霉菌毒素脱毒方法的研究进展[J]. 饲料研究, 2005(11): 40-42
- [9] Cai YH, Hu YC, Zhao HC, et al. Advance in toxicity and biodegradation of zearalenone[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(5): 102-105 (in Chinese)  
蔡雨函, 胡延春, 赵黑成, 等. 玉米赤霉烯酮的毒性及生物降解研究进展[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 102-105
- [10] 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
- [11] 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
- [12] 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
- [13] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W320-W324
- [14] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features[J]. Biopolymers, 1983, 22(12): 2577-2637
- [15] Eijssink VGH, Bjørk A, Gåseidnes S, et al. Rational engineering of enzyme stability[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 113(1/3): 105-120
- [16] Li WF, Zhou XX, Lu P. Structural features of thermozymes[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(4): 271-281
- [17] Peng W, Ko TP, Yang YY, et al. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*[J]. RSC Advances, 2014, 4(107): 62321-62325
- [18] Xu ZX, Liu WD, Chen CC, et al. Enhanced  $\alpha$ -Zearalenol hydrolyzing activity of a mycoestrogen-detoxifying lactonase by structure-based engineering[J]. ACS Catalysis, 2016, 6(11): 7657-7663
- [19] Wang GZ, Wu JJ, Lin J, et al. The disruption of two salt bridges of the cold-active xylanase XynGR40 results in an increase in activity, but a decrease in thermostability[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 481(1/2): 139-145
- [20] Guo J, Coker AR, Wood SP, et al. Structure and function of the thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis*[J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2017, 73(11): 889-895
- [21] Suzuki Y, Hatagaki K, Oda H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 34(6): 707-714
- [22] Watanabe K, Masuda T, Ohashi H, et al. Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 226(2): 277-283