

研究报告

赭曲霉毒素 A 降解菌株的筛选及脱毒酰胺水解酶的基因克隆和表达

刘斌¹, 全思语¹, 张豪¹, 宋卓琳¹, 黄明珠^{1,2}, 何健³, 陈雪岚^{*1,2}

1 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022

2 江西师范大学国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西 南昌 330022

3 南京农业大学生命科学学院 农业农村部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095

刘斌, 全思语, 张豪, 宋卓琳, 黄明珠, 何健, 陈雪岚. 赭曲霉毒素 A 降解菌株的筛选及脱毒酰胺水解酶的基因克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2837-2847.

LIU Bin, QUAN Siyu, ZHANG Hao, SONG Zhuolin, HUANG Mingzhu, HE Jian, CHEN Xuelan. Isolation of ochratoxin A-degrading bacteria strain, molecular cloning and expression of detoxification amidohydrolase[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2837-2847.

摘要:【背景】赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)是一种可以致癌的真菌毒素, 其污染严重影响食品安全, 危害人类健康。生物降解法去除 OTA 污染是近些年的研究热点, 发掘高效的 OTA 降解脱毒酶资源具有重要的意义。【目的】筛选高效的 OTA 降解菌株并从中克隆降解基因, 为生物脱毒方法的开发提供基因和酶资源。【方法】利用 OTA 为唯一碳源的筛选培养基从土壤中筛选纯化 OTA 降解菌株, 通过 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位, 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析其降解产物。通过同源序列比对的方法克隆降解基因并与载体 pET-29a(+)相连, 然后在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。利用 Ni²⁺亲和层析对表达产物进行纯化, 研究其对 OTA 的降解活性和酶学特征。【结果】筛选到一株高效的 OTA 降解菌株, 在 12 h 内能够完全降解 1 μg/mL 的 OTA; 初步鉴定该菌株属于 *Niastella*, 编号为 JX-6; 菌株 JX-6 通过酰胺键断裂途径降解 OTA 生成无毒的 OTα; 从菌株 JX-6 中鉴定了一个 OTA 酰胺水解酶, 命名为 NcOTase; NcOTase 与已报道的 OTA 酰胺水解酶序列相似性较低, 仅为 31%–53%; 纯化的 NcOTase 具有 OTA 水解活性, 比酶活为 60.3 U/mg, 活性显著高于大部分已报道的 OTA 降解酶。【结论】NcOTase 是一个高效的 OTA 降解脱毒酶, 在去除食品和饲料中 OTA 污染方面具有很好的应用前景。

资助项目: 江西省自然科学基金(20224BAB215005); 国家自然科学基金(31960014, 31660019); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ210323)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20224BAB215005), the National Natural Science Foundation of China (31960014, 31660019), and the Science and Technology Research Project of Jiangxi Provincial Education Department (GJJ210323).

*Corresponding author. E-mail: xuelanchen162@163.com

Received: 2022-09-25; Accepted: 2022-10-29; Published online: 2023-01-04

关键词：真菌毒素；赭曲霉毒素 A；生物降解；酰胺水解酶；酶活性

Isolation of ochratoxin A-degrading bacteria strain, molecular cloning and expression of detoxification amidohydrolase

LIU Bin¹, QUAN Siyu¹, ZHANG Hao¹, SONG Zhuolin¹, HUANG Mingzhu^{1,2}, HE Jian³, CHEN Xuelan^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

2 National R&D Center for Freshwater Fish Processing, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

3 Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Ochratoxin A (OTA) is one of the most potent carcinogens, threatening food safety and human health. In recent years, biodegradation of OTA has attracted the interest of scholars, but the currently available OTA-detoxifying enzymes are limited. Therefore, it is of great significance to explore efficient OTA-degrading and -detoxifying enzyme resources. [Objective] To screen efficient OTA-degrading strain, clone the degradation-related gene, and thus to provide gene and enzyme resources for eliminating OTA. [Methods] The selective medium with OTA as the sole carbon source was used to screen OTA-degrading strain from the sludge. The strain was identified based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The degradation products of OTA by the strain were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The degradation-related gene was obtained by homologous sequence alignment, cloned into the expression vector pET-29a(+), and then expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The expressed product was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography, and its OTA degradation activity and enzymatic characteristics were determined. [Results] A strain with high OTA degradation efficiency was screened out, which could completely degrade 1 µg/mL OTA within 12 h. The strain was identified to belong to *Niastella* and named JX-6. OTA was transformed by JX-6 through the hydrolysis of the amide bond to generate non-toxic OTα. An OTA amidohydrolase was identified in JX-6 and named NcOTase. The sequence similarity between NcOTase and the reported OTA amidohydrolase was low (31%–53%). The purified NcOTase showed OTA hydrolysis activity with specific enzyme activity of 60.3 U/mg, which was significantly higher than that most of the characterized OTA-degrading enzymes. [Conclusion] NcOTase is a highly efficient OTA-detoxifying enzyme, which has good application prospects in the removal of OTA in food and feed.

Keywords: mycotoxins; ochratoxin A; biodegradation; amidohydrolase; enzymatic activity

赭曲霉毒素是由曲霉属和青霉属产生的一类真菌毒素，为 L-β-苯丙氨酸与异香豆素结合的衍生物，存在 7 种结构类似物，其中以赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 毒性最强、分布

最广，对农产品污染最严重^[1-2]。OTA 主要污染谷物、饲料、咖啡豆、可可豆、香料、坚果和葡萄汁等食品，其对人类和动物具有肾毒性、肝毒性、致畸性、致癌性、致突变和免疫毒性

等^[3-4]。然而 OTA 化学性质较稳定, 很难将其从食品中去除。尽管全球有多个国家和地区针对食品和饲料中 OTA 的限量制定了相关标准^[5], 但 OTA 污染的饲料引起的禽类中毒现象时有发生, 造成严重经济损失的同时也带来了食品安全问题。因此, 研究 OTA 降解脱毒技术具有重要意义。

OTA 的降解脱毒方法主要有物理吸附、化学降解、生物吸附和生物降解等^[6]。相较于物理化学方法, 生物降解脱毒具有高效、专一性强、对环境友好且不会产生二次污染等优点, 因此具有广阔的应用前景^[7]。目前国内外已报道了许多能够降解脱毒 OTA 的细菌和真菌^[2,8-9], 但对微生物降解机制的研究还很少。已报道的 OTA 降解酶有羧肽酶^[9-11]、脂肪酶^[12]、蛋白酶^[13]和酰胺水解酶^[14-15]等, 这些酶都能够催化 OTA 酰胺键的水解, 生成无毒的 L-β-苯丙氨酸和 OTα, 该水解途径也被认为是 OTA 最有效的脱毒途径。尽管有些降解酶已进行了商业化应用, 如羧肽酶 A 和羧肽酶 Y, 但这些酶脱毒效率还很低。例如, 67 mg/mL 市售的羧肽酶 A 在 1 h 内仅能降解 10% 的 OTA (起始浓度为 50 mg/L)^[11,14]。因此有必要发掘更高效的 OTA 降解脱毒微生物和酶资源。

本文采集了不同生境的土壤样品, 通过富集驯化的方法从中筛选具有良好 OTA 降解效率的菌株并进行鉴定, 分析其降解途径, 克隆关键降解基因并进行功能鉴定, 以期 OTA 生物脱毒技术的开发提供性能优良的微生物和酶资源。

1 材料与方法

1.1 样品来源和培养基

土壤样品采集自农药厂排污口、农田等不同环境。

R2A 培养基(g/L): 胰蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.50, 酵母浸粉 0.50, 可溶性淀粉 0.50, K_2HPO_4 0.30, $MgSO_4$ 0.10, 丙酮酸钠 0.30, 蛋白胨 0.25, 葡萄糖 0.50。

基础盐培养基和 LB 培养基参照文献^[16]配制。

1.2 主要试剂和仪器

OTA (纯度>98%), 山东美正生物科技有限公司; OTα (纯度>98%), 上海源叶生物科技有限公司; 克隆载体 pMD19-T、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I, 大连宝生物公司; 高保真 DNA 聚合酶和重组克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 仪, 杭州博日科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; 高效液相色谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 OTA 降解菌的富集、筛选和纯化

称取 5 g 污泥样品接种于 100 mL 以 1 μg/mL OTA 为唯一碳源的基础盐培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床中富集培养 5 d 后, 以 5% 的接种量转接至含相同浓度 OTA 的基础盐培养基中。连续传代培养 5 次, 期间利用 HPLC 检测富集液中 OTA 的含量, 将降解效果良好的富集液梯度稀释后涂布于 R2A 平板上, 30 °C 培养 5–7 d 至平板上出现单菌落。对所有形态不同的单菌落进行划线纯化, 纯化的菌株通过扩大培养后验证其降解效果。

1.4 菌株的鉴定

降解菌株生理生化特性的测定参照褚翠伟等^[16]和李娜等^[17]的方法进行。利用高盐法^[18]提取菌株 JX-6 的基因组 DNA, 以基因组 DNA

为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 参考文献[19] PCR 扩增菌株的 16S rRNA 基因。将 PCR 产物测序所得的 16S rRNA 基因序列提交至网站 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) 进行在线比对分析, 下载相似性较高的模式菌株的 16S rRNA 基因序列, 在 MEGA 7.0 中利用邻接法构建降解菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树。

1.5 降解基因的克隆

以菌株 JX-6 基因组 DNA 为模板, 使用特异性引物 NcOTase-F (5'-AAGAAGGAGATATACATATGAAGAGATTACTGCTTTTGCTGTT-3') 和 NcOTase-R (5'-TGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCTTATAAATAACTCCCTCCTTCA-3') (下划线为同源臂), PCR 扩增 NcOTase 基因; 利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对质粒 pET-29a(+) 进行双酶切, 利用凝胶纯化回收试剂盒对 NcOTase 基因片段和线性化载体进行回收纯化。通过同源重组酶将 NcOTase 基因克隆至载体 pET-29a(+), 并转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养至出现单菌落。从平板上随机挑取 3 个转化子委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.6 蛋白表达和纯化

NcOTase 的蛋白表达和纯化参考 Liu 等^[20]报道的方法。将测序验证正确的重组表达菌株以 1% 的接种量转接于 100 mL 的 LB 液体培养基中(含有 50 mg/L 卡那霉素), 37 °C、200 r/min 振荡培养, 待 OD_{600} 约为 0.6 时取出, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 置于 22 °C、180 r/min 摇床中继续培养, 诱导培养 12 h 后取出。采用超声波破碎法破碎细胞: 功率 200 W, 超声

1 s、间歇 2 s, 冰浴超声 10 min。超声结束后 12 000 r/min 离心 30 min 收集上清, 上清经镍柱亲和纯化后获得目的蛋白。目的蛋白透析后利用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。

1.7 酶活性分析

在 50 mmol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液中加入 1.0 μ g 纯化的 NcOTase 和 0.5 μ g OTA, 建立总体积为 500 μ L 的酶促反应体系。反应体系置于 40 °C 恒温水浴锅中反应 10 min 后添加等体积的甲醇终止酶促反应。以不添加酶作为对照, 利用 HPLC 检测 OTA 的减少量来测定 NcOTase 的活性。1 个酶活力单位定义为在最适条件下每分钟水解 1.0 nmol 底物所需的酶量。

色谱条件: UltiMate[®]3000 Titanium System 高效液相色谱仪; Amethyst C18-H 色谱柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm); 流动相为甲醇:水(60:40, 体积比); 流速 1 mL/min; 进样体积 10 μ L; 紫外检测器, 检测波长为 333 nm; 柱温 30 °C。

1.8 NcOTase 的酶学特征

将纯化的 NcOTase 置于 50 mmol/L 不同的缓冲液体系中(Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液, pH 3.0–5.0; Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液, pH 6.0–7.0; Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0–9.0; 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH 10.0–11.0) 来测定 NcOTase 的 pH 耐受范围和最适反应 pH。在 50 mmol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液中加入适量底物和纯化的 NcOTase 建立酶促反应体系, 然后在 10–80 °C 温度范围内测定 NcOTase 的温度耐受范围和最适反应温度。参照 Luo 等^[15]的方法测定不同的金属离子(Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ba^{2+})、金属螯合剂 EDTA 和蛋白质变性剂 SDS 对 NcOTase 酶活性的影响。金属离子、EDTA 和 SDS 的浓度分别为 1.0 mmol/L、100 mmol/L 和 1% (质量体积分数)。

2 结果与分析

2.1 OTA 降解菌株的分离与鉴定

经过 5 次连续传代富集驯化, 获得能在 2 d 内完全降解 1 $\mu\text{g/mL}$ OTA 的富集液。对该菌的富集液进行稀释涂布培养后, 挑取了 50 个不同形态的单菌落进行降解效果验证, 从中获得 6 株能够降解 OTA 的细菌。比较 6 株菌对 OTA 的降解能力, 其中一株对 OTA 表现出较高的降解效率, 编号为 JX-6。菌株 JX-6 在 12 h 内能够完全降解 1 $\mu\text{g/mL}$ OTA, 而其他菌株只能降解 10%–60%, 因此选取 JX-6 进行后续研究。

菌株 JX-6 在 R2A 琼脂培养基上 30 $^{\circ}\text{C}$ 生长 5 d 后, 菌落呈白色、不透明、圆形, 表面光滑湿润, 革兰氏染色阴性。透射电镜显示 JX-6 菌体形态为杆状, 大小约为 $(0.3\text{--}0.4)\ \mu\text{m} \times (4.5\text{--}5.0)\ \mu\text{m}$, 无鞭毛(图 1)。菌株 JX-6 的 16S rRNA 基因序列

(GenBank 登录号为 OP457174)与 *Niastella* 的亲缘关系最近, 其中与 *Niastella caeni* HX-16-21^T 相似度最高, 为 99.86%, 与 *Niastella* 其他模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似度超过 95%。采用邻接法构建菌株 JX-6 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树(图 2), 结果表明, 菌株 JX-6 与 *Niastella* 的模式菌株聚类在一起, 并与模式菌株

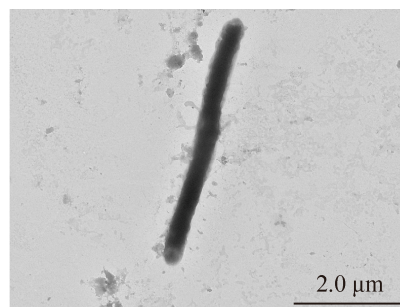


图 1 菌株 JX-6 透射电镜照片

Figure 1 Transmission electron micrograph of strain JX-6.

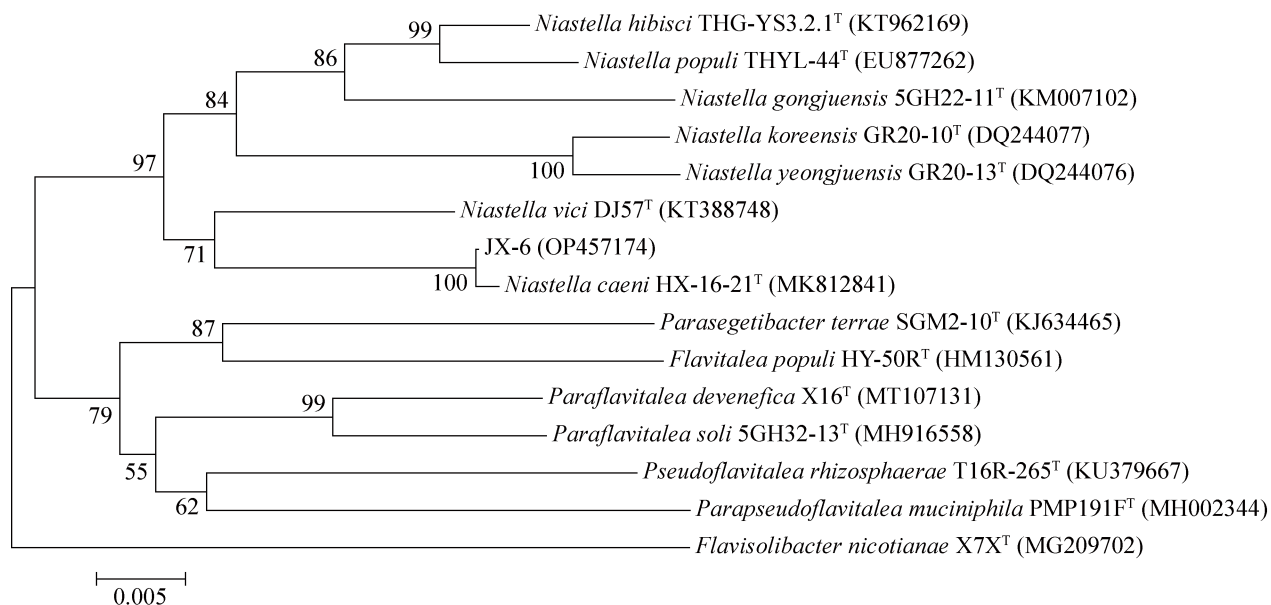


图 2 菌株 JX-6 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号代表对应菌株的 16S rRNA 基因 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示可信度; 刻度 0.005 表示序列偏差值

Figure 2 Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences of strain JX-6. The serial number in parentheses represents the sequences accession number in GenBank; The number at the branch node indicates the credibility; Bar 0.005 represents sequence divergence.

Niastella caeni HX-16-21^T 和 *Niastella vici* DJ57^T 处在一个分支上, 因此将菌株 JX-6 初步鉴定属于 *Niastella*。

2.2 菌株 JX-6 对 OTA 的降解途径

通过 HPLC 分析监测菌株 JX-6 对 OTA 的降解过程和降解产物。如图 3 所示, 与对照相比, 经 JX-6 细胞处理 6 h 后, OTA 的吸收峰显著降低, 同时出现 1 个产物峰, 其保留时间与 OT α 相同。随着处理时间的延长, OTA 逐渐被降解, 并伴随着产物 OT α 的生成。在 12 h 后, OTA 完全被降解, 但产物 OT α 未减少, 表明该菌株不能进一步降解 OT α 。

2.3 菌株 JX-6 中 OTA 脱毒酰胺水解酶基因的克隆

以上结果表明菌株 JX-6 通过酰胺键水解途径降解 OTA 生成无毒的 OT α 。已报道能够催化 OTA 酰胺键断裂的酶包括肽酶、蛋白酶、酰胺

酶、脂肪酶和羧肽酶等。最近, Luo 等^[15]报道了一种超高效 OTA 酰胺水解酶 ADH3, 其催化活性要显著高于先前报道的水解酶 AfOTase、OTase 和商业化羧肽酶 CPA。由于菌株 JX-6 的基因组未测定, 而 *N. caeni* HX-16-21^T 的基因组已测定。因此, 为了探寻菌株 JX-6 中是否有 ADH3 的同源序列, 首先以 ADH3 氨基酸序列为模板, 在 *N. caeni* HX-16-21^T 蛋白序列文库中进行 BLASTp 比对分析, 结果发现一个与 ADH3 序列一致性为 53% 的酰胺水解酶 (WP_136575765.1)。由于菌株 JX-6 和 *N. caeni* HX-16-21^T 的亲缘关系很近, 因此推测该酰胺水解酶也存在于菌株 JX-6 中。

根据该酰胺水解酶基因设计引物, 以菌株 JX-6 基因组 DNA 为模板, 从中成功克隆到 NcOTase 基因。将 NcOTase 基因克隆至表达载体 pET-29a(+) 中, 然后导入大肠杆菌中进行

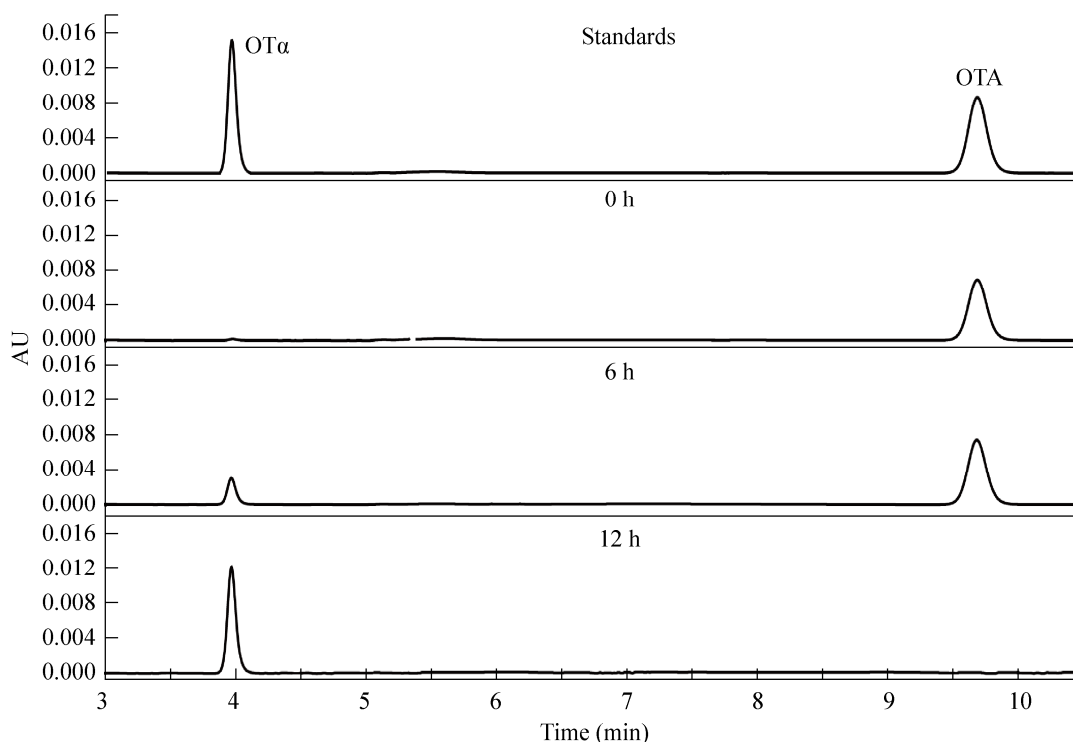


图 3 菌株 JX-6 降解 OTA 的 HPLC 检测图谱

Figure 3 HPLC spectrums of OTA degradation by strain JX-6.

过表达。酶活性测定表明重组的 NcOTase 表现出 OTA 水解活性。测序结果表明 NcOTase 基因大小为 1 272 bp, GC 含量为 46%, 编码 423 个氨基酸。多重序列比对结果表明, NcOTase 属于酰胺水解酶超家族; NcOTase 除了与 ADH3 序列相似性较高外, 与其他报道功能的酰胺水

解酶序列相似性较低, 最高也只有 31%, 为另一个来自黑曲霉的 OTA 酰胺水解酶 OTase。与 ADH3 和 OTase 一样, 在 NcOTase 活性位置也有一个保守的金属离子结合位点, 由 4 个组氨酸和 1 个天冬氨酸残基组成, 分别为 His81、His83、His247、His267 和 Asp340 (图 4)。

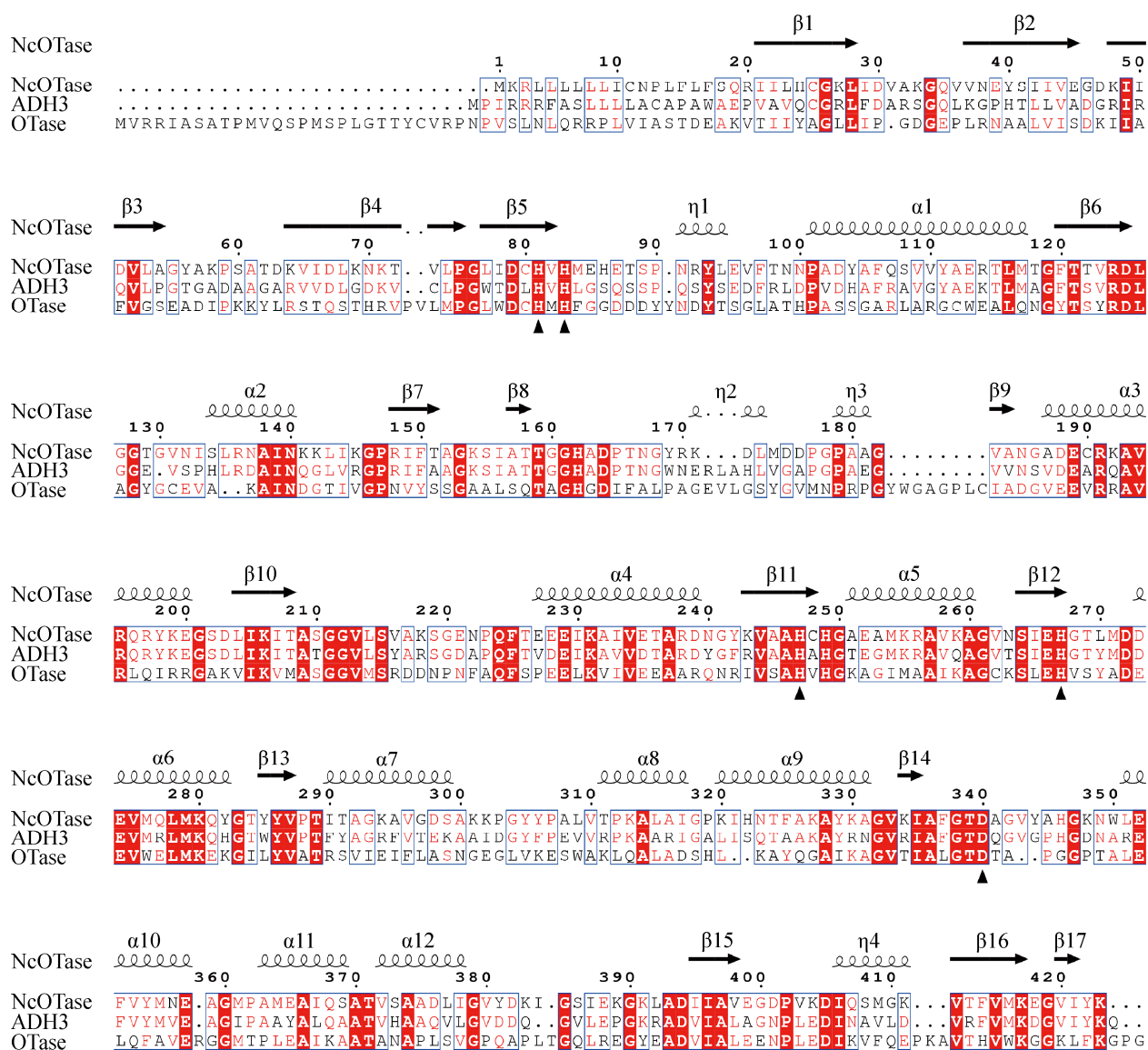


图 4 NcOTase 与已报道的 2 个 OTA 酰胺水解酶序列比较 序列上方是预测的二级结构, 黑色填充三角形标记的为活性中心严格保守的金属离子结合位点

Figure 4 Multiple sequences alignments of NcOTase and two reported OTA amidohydrolases. The predicted secondary structure is shown above the alignment. Strictly conserved residues (His81, His83, His247, His267 and Asp340 in NcOTase) labeled with black-filled triangles are the metal ion binding site.

2.4 NcOTase 的表达和纯化及活性测定

将 NcOTase 基因克隆至 pET-29a(+) 表达载体, 然后转化至 *E. coli* BL21(DE3) 进行蛋白表达。C 端带有 6 个 His 标签的融合蛋白通过 Ni^{2+} -NTA 亲和纯化, SDS-PAGE 蛋白电泳检测结果显示纯化的蛋白条带单一, 纯度较高, 分子量大约为 45.6 kDa, 与理论值大小相符(图 5)。活性分析表明, 纯化的 NcOTase 能够催化 OTA 生成 OT α , 比酶活为 60.3 U/mg。

2.5 NcOTase 的酶学特征

NcOTase 在 pH 6.0–8.0 范围内具有较高的活性, 在 pH<5.0 和 pH>10.0 时基本丧失活性, 最适 pH 为 8.0 (图 6A)。NcOTase 在 20–50 °C 显示出较高的活性, 最适反应温度为 40 °C (图 6B)。金属离子和化学试剂对 NcOTase 活性的影响如图 6C 所示, Ca^{2+} 对 NcOTase 的活性基

本无影响, Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对 NcOTase 的活性具有微弱抑制作用, 而其他金属离子能够显著抑制 NcOTase 的活性; EDTA 和 SDS 也能显著抑制 NcOTase 的活性。

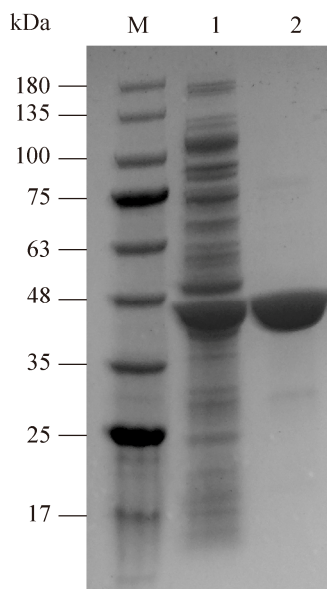


图 5 NcOTase SDS-PAGE 检测图 M: 蛋白 marker; 1: NcOTase 诱导粗酶液; 2: 纯化的 NcOTase

Figure 5 SDS-PAGE analysis of the purified NcOTase. Lane M: Standard protein molecular marker; 1: The crude enzyme of NcOTase; 2: Purified NcOTase.

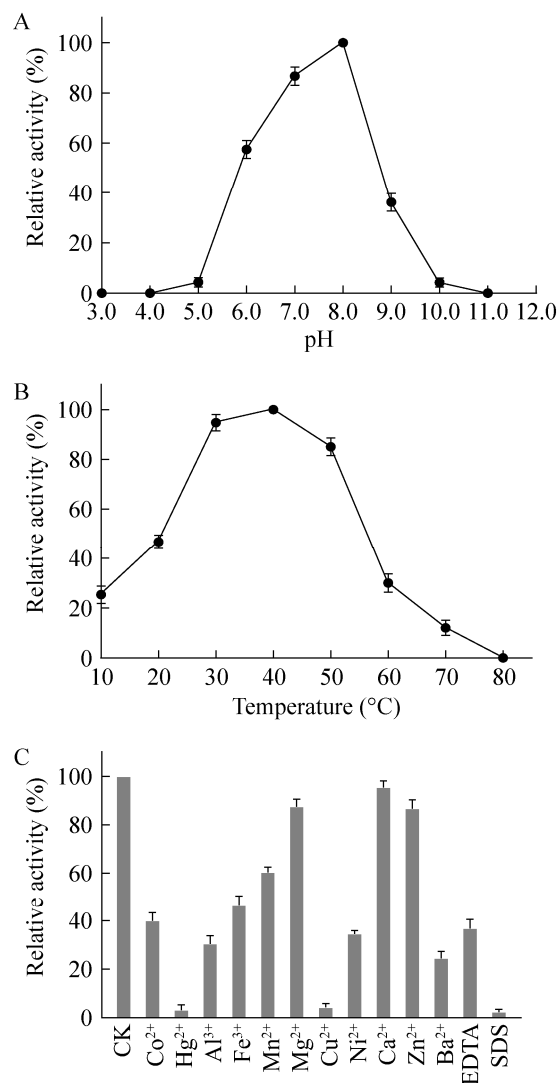


图 6 NcOTase 的酶学特征 A: NcOTase 的 pH 耐受范围和最适 pH. B: NcOTase 的温度耐受范围和最适反应温度. C: 金属离子、EDTA 和 SDS 对 NcOTase 酶活的影响

Figure 6 Enzymatic characteristics of NcOTase. A: The pH tolerance range and optimal pH. B: The temperature tolerance range and optimal temperature. C: The effects of metal ion, EDTA and SDS on NcOTase activity.

3 讨论与结论

本研究从土壤中分离、筛选和纯化得到 6 株可以降解 OTA 的细菌, 比较 6 株菌对 OTA 的降解能力, 选择了降解效果最好的菌株 JX-6 进行后续研究。通过 16S rRNA 基因测序及系统发育分析, 初步鉴定该菌属于 *Niastella*。研究表明, *Niastella* 具有耐受重金属、分解几丁质和降解污染物的能力(如芳烃化合物和除草剂)^[21-22]。例如, *N. vici* DJ57^T 表现出耐受多种重金属和抗生素及水解几丁质的能力^[21]; 而 *N. caeni* HX-16-21^T 可以降解芳烃化合物龙胆酸、原儿茶酸和对羟基苯甲酸以及除草剂精喹禾灵和禾草灵^[22]。在本研究中, 菌株 JX-6 可以高效降解 OTA 生成无毒的产物, 进一步丰富了 OTA 降解脱毒微生物资源, 拓展了 *Niastella* 的应用范围并加深了对其功能多样性的认识。

目前, 国内外已筛选到许多降解 OTA 的真菌和细菌, 其中细菌的降解效率要远高于真菌。如 Abrunhosa 等^[23]从葡萄中筛选到许多能够降解 OTA 的真菌, 但最好的一株黑曲霉完全降解 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA 也需要 6 d。Wei 等^[9]从土壤中分离到一株能够降解低浓度 OTA 的细菌 *Lysobacter* sp. CW239, 在 24 h 内将 30 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 完全降解。Luo 等^[15]分离的菌株 *Stenotrophomonas acidaminiphila* CW117 在 60 h 内能够完全降解 50 mg/L OTA。Zhang 等^[24]分离的菌株 *Alcaligenes faecalis* 0D-1 在 48 h 内将 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA 降解 92%, Chang 等^[25]分离的菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1 在 24 h 内将 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA 降解 98.5%, Peng 等^[26]分离到的菌株 *Brevundimonas naejangsansensis* 完全降解 1 $\mu\text{g/mL}$ OTA 需要 24 h, Shi 等^[27]分离的 *Bacillus subtilis* CW 14 在 24 h 内将 6 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA 降解 97.6%。与上述菌株相比, 本研究分离

的 OTA 降解菌株 JX-6 在 12 h 内能完全降解 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTA, 降解效率要高于大部分已报道的 OTA 降解菌株。因此, 菌株 JX-6 在 OTA 污染去除方面具有较高的应用价值。

截至目前, 已报道的 OTA 降解脱毒酶主要是羧肽酶和酰胺水解酶, 其中酰胺水解酶对 OTA 的降解活性要远高于羧肽酶^[15]。例如, 羧肽酶 CPA 和酰胺水解酶 OTase 都分离自黑曲霉, 但 OTase 对 OTA 的降解活性是 CPA 的 600 倍^[14]。除 OTase 外, 目前还报道了来自细菌的 2 种酰胺水解酶 AfOTase^[28]和 ADH3^[15]。在 3 个酰胺水解酶当中, ADH3 对 OTA 的活性最高, 比酶活为 70 U/mg, 催化效率达到 303 937.85 L/(mmol·s), 催化效率分别是 OTase 和 AfOTase 的 210 倍和 57 倍^[15]。在本研究中, 菌株 JX-6 对 OTA 表现出较高的降解效率, 且降解方式也是酰胺键断裂, 因此推测菌株 JX-6 中的酰胺水解酶在 OTA 的降解中起到了主要作用。通过序列比对分析, 从菌株 JX-6 中鉴定了一个与 ADH3 序列相似性为 53% 的 OTA 酰胺水解酶 NcOTase。在先前的研究中, Wei 等^[9]从菌株 *Lysobacter* sp. CW239 中克隆到一个能降解 OTA 的羧肽酶基因 *cp4*, 通过敲除 *cp4* 后发现敲除菌株还残留 OTA 的降解能力, 所以提出菌株 CW239 通过多种酶的联合作用降解 OTA。因此, 在今后的研究中也需要通过基因敲除的方式来进一步研究菌株 JX-6 对 OTA 的降解机制。与 ADH3 一样, NcOTase 对 OTA 也表现出良好的活性, 比酶活为 60.3 U/mg。但 NcOTase 与 ADH3 在酶学特征方面存在一些显著的差异, 如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 不会对 NcOTase 的活性造成显著的影响, 其活性还能保持 80% 以上(图 6C), 但这 3 种金属离子都能显著抑制 ADH3 的活性^[15]。

综上所述, 本研究筛选到一株 OTA 降解菌

株 JX-6, 并从中鉴定了一个 OTA 酰胺水解酶 NcOTase。NcOTase 能够高效催化 OTA 转化为无毒 OT α , 因此在去除食品和饲料中 OTA 污染方面具有很好的应用前景, 但关于 NcOTase 的催化动力学、催化机制及其应用技术开发和效果评价等方面都还需要进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 张健, 王小霞, 张颖, 高强. 一株产赭曲霉毒素 A 黑曲霉的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1010-1016.
ZHANG J, WANG XX, ZHANG Y, GAO Q. Screening and identification of an ochratoxin A-producing *Aspergillus niger* strain[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1010-1016 (in Chinese).
- [2] WANG L, HUA X, SHI J, JING NH, JI T, LÜ B, LIU LJ, CHEN Y. Ochratoxin A: occurrence and recent advances in detoxification[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2022, 210: 11-18.
- [3] MARIN-KUAN M, NESTLER S, VERGUET C, BEZENÇON C, PIGUET D, MANSOURIAN R, HOLZWARTH J, GRIGOROV M, DELATOUR T, MANTLE P, CAVIN C, SCHILTER B. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin A carcinogenicity in rat[J]. Toxicological Sciences, 2006, 89(1): 120-134.
- [4] STOEVE SD. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(9): 887-901.
- [5] DUARTE SC, LINO CM, PENA A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2010, 27(10): 1440-1450.
- [6] 纪剑, 于坚, 王良哲, 邹东, 付旭冉, 孙嘉笛, 张银志, 孙秀兰. 真菌毒素的降解技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(5): 1-10.
JI J, YU J, WANG LZ, ZOU D, FU XR, SUN JD, ZHANG YZ, SUN XL. Research progress in mycotoxin degradation technology[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(5): 1-10 (in Chinese).
- [7] 卢丹, 徐晴, 江凌, 黄和. 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 D, XU Q, JIANG L, HUANG H. Advances in enzymatic detoxification of mycotoxins[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(2): 49-56 (in Chinese).
- [8] RODRIGUEZ H, REVERON I, DORIA F, COSTANTINI A, de LAS RIVAS B, MUÑOZ R, GARCIA-MORUNO E. Degradation of ochratoxin a by *Brevibacterium* species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19): 10755-10760.
- [9] WEI W, QIAN YY, WU YB, CHEN Y, PENG C, LUO MZ, XU JF, ZHOU Y. Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase *cp4*[J]. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 2020, 258: 113677.
- [10] PITOUT MJ, NEL W. The inhibitory effect of ochratoxin A on bovine carboxypeptidase A *in vitro*[J]. Biochemical Pharmacology, 1969, 18(8): 1837-1843.
- [11] STANDER MA, STEYN PS, van der WESTHUIZEN FH, PAYNE BE. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A[J]. Chemical Research in Toxicology, 2001, 14(3): 302-304.
- [12] STANDER MA, BORNSCHEUER UT, HENKE E, STEYN PS. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5736-5739.
- [13] ABRUNHOSA L, SANTOS L, VENÂNCIO A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*[J]. Food Biotechnology, 2006, 20(3): 231-242.
- [14] DOBRITZSCH D, WANG HM, SCHNEIDER G, YU SK. Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme[J]. The Biochemical Journal, 2014, 462(3): 441-452.
- [15] LUO H, WANG G, CHEN N, FANG ZM, XIAO YZ, ZHANG M, GERELT K, QIAN YY, LAI R, ZHOU Y. A superefficient ochratoxin A hydrolase with promising potential for industrial applications[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(2): e0196421.
- [16] 褚翠伟, 刘斌, 朱启黎, 李娜, 何健. 杀草丹降解菌 *Bacillus* sp. T2 的筛选、鉴定及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(4): 921-927.
CHU CW, LIU B, ZHU QL, LI N, HE J. Isolation, identification, and the degradation characteristics of a thiobencarb-degrading bacterium *Bacillus* sp. T2[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(4): 921-927 (in Chinese).
- [17] 李娜, 彭乾, 何健, 张浩, 黄红慧, 李景照, 惠丰立. 麦草畏降解菌株 *Sphingobium* sp. Dca-5 的分离、鉴定

- 及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(4): 943-949.
- LI N, PENG Q, HE J, ZHANG H, HUANG HH, LI JZ, HUI FL. Isolation, identification and degradation characteristics of dicamba degrading strain *Sphingobium* sp. Dca-5[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2019, 25(4): 943-949 (in Chinese).
- [18] MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(3): 1215.
- [19] 吉雨霏, 王娜, 杨宁, 史吉平, 刘莉. 餐厨垃圾高温好氧生物减量菌种的筛选及特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4513-4524.
- JI YJ, WANG N, YANG N, SHI JP, LIU L. Screening of bacteria for thermophilic aerobic biodegradation of food waste and the degradation characteristics[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4513-4524 (in Chinese).
- [20] LIU B, WANG HY, ZHANG KY, ZHU JC, HE Q, HE J. Improved herbicide resistance of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Sphingobium* sp. TPM-19 through directed evolution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(44): 12365-12374.
- [21] CHEN L, WANG D, YANG SN, WANG GJ. *Niastella vici* sp. nov., isolated from farmland soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(4): 1768-1772.
- [22] SHENG MY, YANG Z, YANG XJ, XU JY, QIU JG, HE J, QIU SL. *Niastella caeni* sp. nov., isolated from activated sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4): 2261-2268.
- [23] ABRUNHOSA L, SERRA R, VENÂNCIO A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7493-7496.
- [24] ZHANG HH, WANG Y, ZHAO C, WANG J, ZHANG XL. Biodegradation of ochratoxin A by *Alcaligenes faecalis* isolated from soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 661-668.
- [25] CHANG XJ, WU ZD, WU SL, DAI YS, SUN CP. Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015, 32(4): 564-571.
- [26] PENG M, ZHAO Z, LIANG Z. Biodegradation of ochratoxin A and ochratoxin B by *Brevundimonas naejangsensis* isolated from soil[J]. Food Control, 2022, 133: 108611.
- [27] SHI L, LIANG ZH, LI JX, HAO JR, XU YC, HUANG KL, TIAN JJ, HE XY, XU WT. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(9): 1879-1885.
- [28] ZHANG HH, ZHANG YP, YIN T, WANG J, ZHANG XL. Heterologous expression and characterization of A novel ochratoxin A degrading enzyme, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase, from *Alcaligenes faecalis*[J]. Toxins, 2019, 11(9): 518.