

赭曲霉毒素 A 降解酶 Af-OTd 的酶学性质分析

宋佳¹, 范寰², 闫雪³, 王文杰², 赵晨^{1*}

(¹ 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮食储运国家工程研究中心 北京 100037

² 天津市畜牧兽医研究所 天津 300381

³ 新希望六和股份有限公司 农业农村部饲料及畜禽产品质量安全控制重点实验室 成都 610023)

摘要 赭曲霉毒素 A(OTA)是一种广泛分布在食品中的真菌毒素,减少或脱除食品及其原料中的赭曲霉毒素 A,对提高食品质量、保障国民食品安全具有重要意义。本实验室前期从粪产碱菌中获得可降解 OTA 的酰胺水解酶 Af-OTd,本研究通过基因重组实现 Af-OTd 蛋白的高效表达,并对纯化的 Af-OTd 蛋白进行酶学性质分析。结果表明:纯化的 Af-OTd 酶对 OTA 的降解率达 90%以上,降解活性受温度、pH 值、酒精含量及金属离子的影响。该酶最适温度 50 ℃,最适 pH 7.5。酒精含量增加会导致酶活性下降,当酒精含量增至 8%,剩余酶活几乎为 0。1 mmol/L 的金属离子 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 及 EDTA 对该酶具有不同程度的抑制作用;微量的 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 对 Af-OTd 酶活性有明显的促进作用。

关键词 赭曲霉毒素 A; 表达纯化; 降解酶; 酶学性质

文章编号 1009-7848(2022)01-0031-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.004

赭曲霉毒素包括 7 种结构类似的化合物,其中分布最广,毒性最大,对农产及食品污染最严重,对人类健康影响最大的是赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)^[1]。OTA 主要由赭曲霉、青霉、炭黑曲霉等霉菌产生的次级代谢产物^[2],常见于霉变谷物、饲料、咖啡豆、坚果、葡萄等食品中^[3-6],物理和化学性质极其稳定,在产品中很难将其去除或降解^[7]。OTA 具有强烈的肾毒性^[8]、肝毒性^[9]、免疫毒性^[10]、致畸性^[11]和致癌性^[12],是继黄曲霉毒素后又一个引起世界广泛关注的真菌毒素。开发高效环保的脱毒方法,减少或脱除食品及其原料中的赭曲霉毒素 A,对提高粮食及食品质量,保障国民食品安全具有重要意义。

生物脱毒主要是通过生物吸附或酶促反应降解毒素或修饰毒素分子结构而达到脱毒的目的,与物理、化学脱毒方法相比,具有特异性强、高效等优点^[13],目前已成为脱毒领域的研究热点。据相关文献报道,许多微生物如细菌、酵母菌、丝状真菌以及一些蛋白酶能够吸附或降解 OTA^[14]。其中

降解 OTA 的过程中可能涉及两条途径:(1) 通过水解酰胺键生成 L - β -苯丙氨酸和 $\text{OT}\alpha$ 两种无毒水解产物;(2) 通过内酯环的水解而降解 OTA,最终降解产物为开环的 OTA 内酯(OP-OTA),与 OTA 具有相似的毒性,前者通常被认为是真正的解毒途径^[15]。羧肽酶是最早发现的能够降解 OTA 为无毒产物的一种酶^[16],除此之外,某些过氧化物酶、蛋白水解酶、脂酶都被发现可以降解 OTA^[17-18]。

本实验室前期从粪产碱菌中鉴定出一种酰胺水解酶(WP_123049291.1),可高效降解 OTA,命名为 Af-OTd。本研究将 *af-OTd* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中克隆、表达和纯化,并探究温度、pH、酒精含量、金属离子等条件对重组表达后的 Af-OTd 的酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

粪产碱菌、蛋白表达菌株大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)、表达载体 pET28a(+),由本实验室保存;OTA 标准品,青岛普瑞邦生物工程有限公司;LA Taq 酶, Takara 生物工程有限公司; *Nco* I、*Xho* I、T4 连接酶, NEB 生物工程有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,天根生化科技有限公司。

收稿日期: 2021-01-16

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0501207);天津市奶牛现代农业产业技术体系创新团队专项资金(ITTCRS2018022)

作者简介: 宋佳(1994—),女,硕士,助理研究员

通信作者: 赵晨 E-mail: zc@ags.ac.cn

1.2 仪器与设备

Gene Explorer PCR 仪,杭州博日科技有限公司;凝胶成像仪、AKTApurifier 蛋白快速纯化系统,美国 GE 公司;LC-10Avp plus 高效液相色谱仪,日本岛津公司;低温冷冻离心机,美国 Beckman 公司。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒 pET28a(+)-Af-OTd 的构建 根据 NCBI 序列信息,设计引物 Af-OTd-F: CAGTC CATGGATGGGCGCCAGTAATCCCATGATG, Af-OTd-R: CAGTCTCGAGCGGCTTTTGTTCCTCCATC。以粪产碱菌基因组为模板扩增目的基因,纯化后的 DNA 片段和 pET28a (+) 质粒分别进行 *Nco* I, *Xho* I 双酶切,胶回收正确片段进行 T-4 ligase 连接及电转化,完成 pET28a(+)-Af-OTd 重组载体的构建并转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,测序结果正确的阳性克隆子用于下一步的蛋白诱导表达。

1.3.2 Af-OTd 降解酶的诱导表达 将 1.3.1 节测序结果正确的 pET28a(+)-Af-OTd 阳性克隆子接种于 5 mL LB 液体培养基 (kan^r质量浓度: 50 μg/mL) 中, 37 °C, 180 r/min 培养 16 h 进行活化。以 1% 的比例转种于 200 mL 含有相同抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 培养至 OD_{600nm} = 0.6~0.8。将菌液分装为 4 等份于 300 mL 摇瓶中, 每份 40 mL, 并按终浓度 0, 0.1, 0.4, 1 mmol/L 添加 IPTG, 置于 25 °C, 180 r/min 过夜诱导表达 Af-OTd 蛋白。离心收集菌体并用 Binding Buffer (20 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑; pH=7.4) 洗涤菌体 2 次, 10 mL Binding Buffer 缓冲液重新悬浮菌体后于冰上超声破碎。将充分破碎后的菌液 4 °C, 12 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片, 取上清离心, 再次取上清经 0.22 μm 滤膜过滤, 得 Af-OTd 粗酶液。

通过 AKTA 蛋白纯化系统纯化胞内蛋白: 用 Binding Buffer 平衡 Ni⁺层析柱后, Elution Buffer (20 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L Imidazole; pH=7.4) 洗脱目标蛋白, 根据洗脱峰收集纯化后的蛋白液。将所收集的蛋白液倒入超滤离心管 (3 ku, Millipore) 中, 4 °C, 5 000×g 离心 3 h, 截留的上清液用保存缓冲液 (20 mmol/L Tris-

HCl, 50% 甘油; pH=7.4) 重悬, -80 °C 保存, 用于后续酶活测定。

1.3.3 Af-OTd 降解酶降解 OTA 活性测定 取上述酶液 990 μL 加入 10 μL OTA 储备溶液 (甲醇: 乙腈=1:1 溶解 OTA 标准品, 配成 1 mg/mL 的标准储备液), 37 °C 分别反应 15 min 和 30 min 时取样, HPLC-FLD 检测 OTA 浓度。色谱柱: C18 柱, 柱长 150 mm×4.6 mm; 流动相: 乙腈: 水: 冰乙酸 = 96: 102: 2; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测波长: 激发波长 333 nm, 发射波长 460 nm。

OTA 降解率 = (酶解前含量 - 酶解后含量) / 酶解前含量 × 100% (1)

1.3.4 温度对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响 以 OTA 降解率测定的方法为基础, 设定反应温度为 30, 40, 50, 60, 70 °C。反应体系 1 000 μL: 990 μL 酶液 + 10 μL OTA 储备液。将反应体系混匀后于不同温度下反应 15 min 后加入等体积的流动相终止反应。检测 OTA 的残留量, 计算 OTA 的降解率, 确定最佳反应温度。

1.3.5 pH 对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响 以 OTA 降解率测定的方法为基础, 设定反应 pH 值为 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0。反应体系 1 000 μL: 990 μL 酶液 + 10 μL OTA 储备液。将反应体系混匀后于最适温度下反应 15 min 后加入等体积的流动相终止反应。检测 OTA 的残留量, 计算 OTA 的降解率, 确定最佳反应 pH 值。

1.3.6 酒精含量对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响

以 OTA 降解率测定的方法为基础, 设定反应酒精含量为 0%, 2%, 4%, 6%, 8%。反应体系 1 000 μL: 910 μL 酶液 + 80 μL 不同浓度酒精 + 10 μL OTA 储备液。将反应体系混匀后于最适温度和最佳 pH 条件下反应 15 min 后加入等体积的流动相终止反应。检测 OTA 的残留量, 计算 OTA 的降解率, 确定酒精含量对酶活的影响。

1.3.7 金属离子及 EDTA 对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响 选取对蛋白酶具有影响作用的常见金属阳离子 Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, K⁺ 及金属螯合剂 EDTA, 加入下述反应体系中, 使其终浓度为 1 mmol/L。反应体系 1: 980 μL 酶液 + 10 μL 100 mmol/L 金属离子/EDTA 溶液 + 10 μL OTA 储备液。反应体系 2: 980 μL 酶液 + 5 μL 200 mmol/L

金属离子溶液+5 μL 200 mmol/L EDTA 溶液+10 μL OTA 储备液。将反应体系混匀后于最适温度和最适 pH 条件下反应 15 min 后加入等体积的流动相以终止反应。检测 OTA 的残留量,计算 OTA 的降解率,初步确定金属离子对酶活的影响。

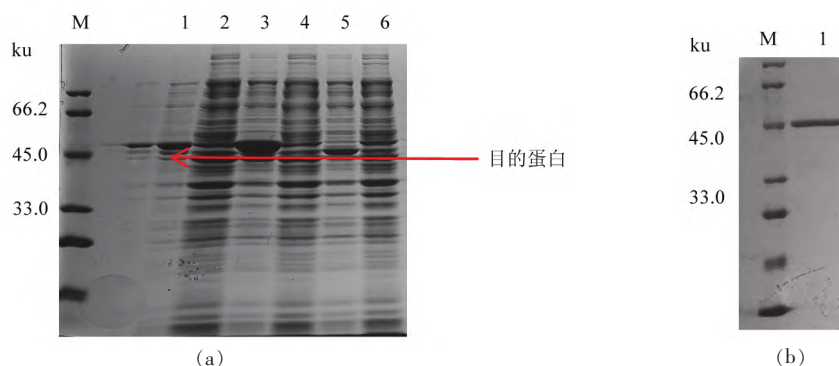
2 结果与分析

2.1 Af-OTd 降解酶的表达与纯化

通过 signalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析,Af-OTd 具有信号肽。为获得胞内表达 Af-OTd,设计引物扩增除信号肽外序列,并将信号肽后第一位氨基酸谷氨酰胺(CAA)替换为甘氨酸(GGC),C 端与 6xHis 标签融合表

达。通过 PCR 扩增后得到的特异性目的基因条带与 pET28a(+)连接,成功构建 pET28a(+)-Af-OTd 重组质粒,将质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)中,对阳性克隆测序验证,测序正确的重组菌株用于后续蛋白的表达纯化。

重组菌株菌液分别以 0,0.1,0.4,1 mmol/L 的 IPTG 诱导,胞内蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶检测,结果如图 1a 所示,1~6 泳道均在 45 ku 附近出大小与预期相符的蛋白条带,其中 1、3、5 泳道(经 IPTG 诱导)条带比 2、4、6 泳道(未经 IPTG 诱导)条带颜色更深,说明 Af-OTd 基因在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达,且 IPTG 终浓度 0.4 mmol/L 为蛋白最适诱导浓度。



注:a. M. 蛋白质 Marker;1、3、5. 经 IPTG 诱导后的总蛋白;2、4、6. 未经 IPTG 诱导后的总蛋白;b. M. 蛋白质 Marker;1. 纯化后 Af-OTd 降解酶。

图 1 Af-OTd 蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE gel electrophoresis of Af-OTd protein

2.2 Af-OTd 降解酶酶活性的分析

按 1.3.3 节反应体系加入 Af-OTd 纯化后酶液和 10 μL OTA 储备液,OTA 终质量浓度达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 。反应时间 2 min 时,HPLC 测定结果如图 2b 所示,与图 2a 相比,保留时间在 8 min 左右的 OTA 峰明显缩小,经计算,OTA 降解率超过 60%。同时,在保留时间 4.5 min 左右出现新峰,根据文献[19]所述,该峰为降解产物 OT α 。当反应时间延长至 15 min 时,OTA 被 Af-OTd 完全降解,该结果说明,纯化的 Af-OTd 具有高效的 OTA 降解活性。

为利于后续酶学特性试验结果分析,将 Af-OTd 酶液用保存缓冲液按照 200,400,600,800,

1 000 的倍数对酶液进行稀释,置于相同反应体系中,在反应时间为 15 min 和 30 min 时,分别加等体积的流动相终止反应。OTA 降解率结果如图 3 所示,当 Af-OTd 稀释 600 倍,反应时间 15 min 时,OTA 降解率未到 95%,此时,在 HPLC 色谱图中便于观察 OTA 含量;反应时间 30 min 时,OTA 降解率接近 100%,该稀释度利于对酶活在一定反应时间内进行检测,故后续试验使用稀释 600 倍的 Af-OTd,取样时间定为 15 min。

2.3 温度对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响

Af-OTd 产生菌生存环境在 30 $^{\circ}\text{C}$,本研究通过检测 Af-OTd 在不同温度下的降解活性,确定其最适酶活温度。由图 4 可知,随着温度的升高,

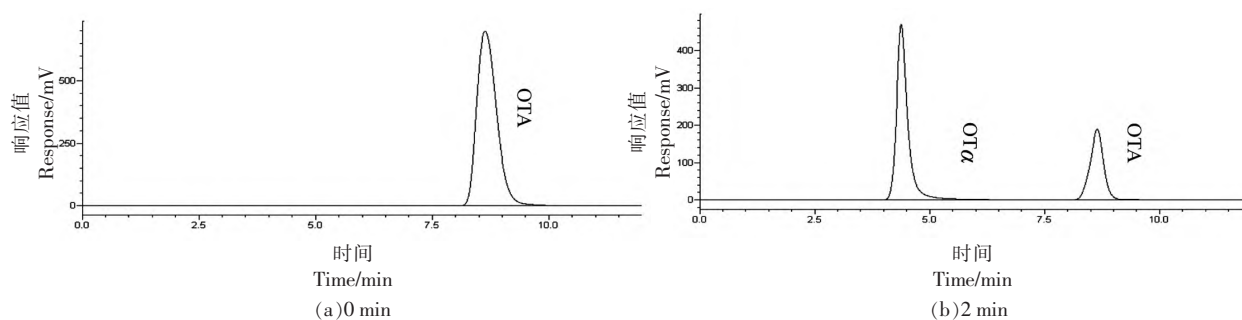


图2 HPLC 检测不同反应时间 OTA 的色谱图

Fig2 HPLC Chromatograms of OTA for different reaction times

降解酶 Af-OTd 对 OTA 降解率逐渐升高,当反应温度为 50 ℃时,OTA 降解率达 99%,温度继续升高,OTA 降解率则呈下降趋势,故 50 ℃为 Af-OTd 降解 OTA 的最适温度。当高于 50 ℃时,Af-OTd

活力开始下降,在 70 ℃时,OTA 降解率依然可以保持在 60%左右,说明高温可能使酶分子表面构象发生变化,而 Af-OTd 已具有较好的耐高温能力。

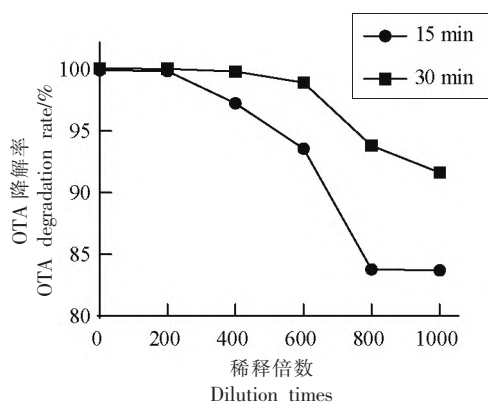


图3 不同稀释倍数对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.3 Effects of different dilution times on Af-OTd enzyme activity

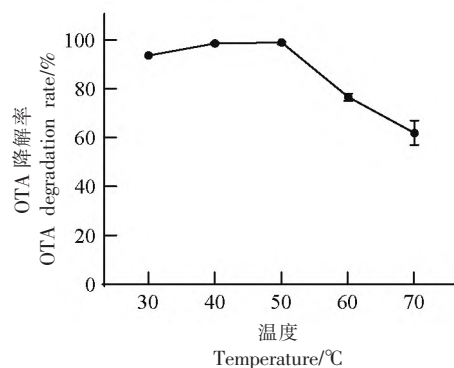


图4 不同温度对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.4 Effects of different temperature on Af-OTd enzyme activity

2.4 pH 对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响

pH 对酶活具有较大影响^[20],因此探究 Af-OTd 在不同 pH 条件下的活性是十分必要的。按 1.3.5 节反应体系在最适温度 50 ℃条件下反应 15 min 后终止,计算 OTA 降解率。图 5 中可知,pH=7.5 是降解酶 Af-OTd 的最适 pH 值,OTA 降解率最高,碱性增强,OTA 降解率呈下降趋势,当在 pH < 7 的酸性条件下,降解效率大幅降低,该结果说明 Af-OTd 的耐酸性较弱。

2.5 酒精含量对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响

OTA 常见于葡萄酒中^[21],因此本小节通过检测 Af-OTd 在不同酒精浓度条件下对 OTA 的降解

活性,探究其酒精耐受情况,为后续在葡萄酒生物脱毒领域的应用提供理论基础。不同酒精浓度的反应体系在 pH=7.5,温度为 50 ℃条件下孵育 15 min,OTA 降解率结果如图 6 所示,酒精会降低降解酶 Af-OTd 的酶活力,且随着反应体系内酒精浓度的不断加大,OTA 降解率大幅度降低,当反应体系内酒精含量加至 8%时,降解酶 Af-OTd 的酶活力几乎降至 0,此时为其最大酒精耐受度。

2.6 金属离子及 EDTA 对降解酶 Af-OTd 酶活性的影响

水解酶类蛋白一般为金属蛋白,具有金属中心结构^[22-23]。为探究 Af-OTd 活性与金属离子的关

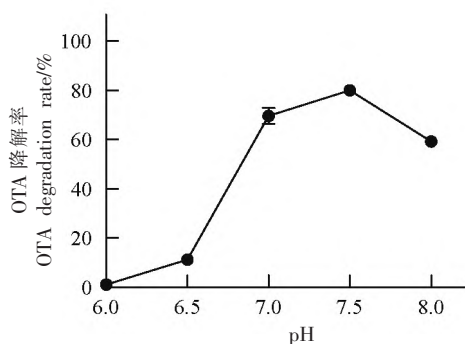


图5 不同 pH 值对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.5 Effects of different pH values
on Af-OTd enzyme activity

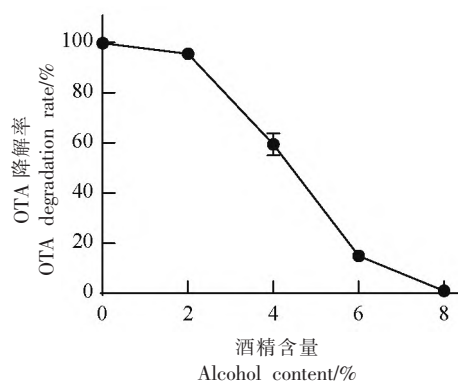


图6 酒精含量对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.6 Effect of alcohol content
on Af-OTd enzyme activity

系,本试验使用金属螯合剂 EDTA 及部分金属离子:Ca²⁺,Co²⁺,Cu²⁺,Mg²⁺,Mn²⁺,Zn²⁺,K⁺探究其对 Af-OTd 酶活性的影响。1 mmol/L 的 EDTA 可完全抑制 Af-OTd 降解活性,初步判断该酶为金属蛋白结构。以未加金属离子的反应体系为对照,7 种金属离子对 Af-OTd 的酶活都具有抑制效果,其中 Co²⁺,Cu²⁺,Mn²⁺,Zn²⁺抑制效果最为明显,均超过 90%(图 7)。为进一步验证是否为金属离子对 Af-OTd 酶活产生的影响,在各反应体系中同时加入 1 mmol/L 金属离子和 1 mmol/L EDTA,7 种金属离子对 Af-OTd 酶活性的抑制效果均得到缓解(图 7)。

添加等摩尔 Co²⁺与 EDTA、Zn²⁺与 EDTA 的两组反应,Af-OTd 酶活性不仅抑制效果被缓解,还呈现出促进效果,初步分析,在调节 1 mmol/L EDTA 溶液的 pH 值时,EDTA 溶液有微量稀释,导致反应体系中微量金属离子剩余促进了 Af-OTd 酶活性。为了进一步验证,分别在反应体系中添加 1,10,100,1 000 μmol/L 的 Co²⁺、Zn²⁺,探究微量金属离子对 Af-OTd 酶活的影响,结果见图 8。Co²⁺,Zn²⁺在 1,10 μmol/L 条件下,均促进 Af-OTd 降解活性,当继续增大浓度到 100 μmol/L 时,Co²⁺,Zn²⁺再次表现出抑制 Af-OTd 酶活。

综上所述,金属离子对降解酶 Af-OTd 的酶活性具有显著影响,其影响机制将在接下来对 Af-OTd 的三维结构解析工作中进行深入分析。

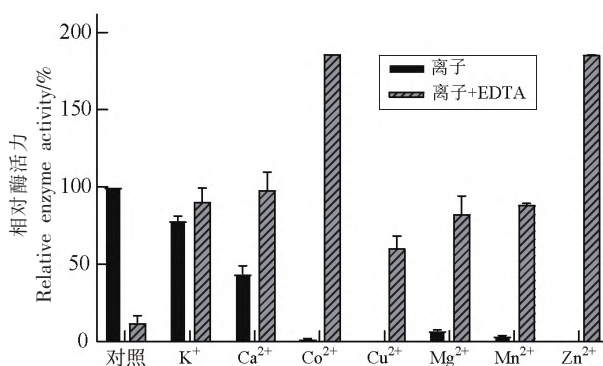


图7 金属离子及化学试剂对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.7 Effects of metal ions and chemical reagents
on Af-OTd enzyme activity

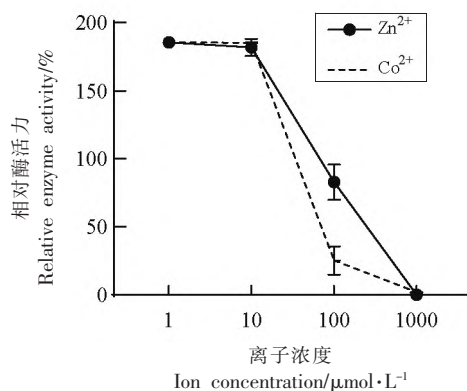
图8 Co²⁺和 Zn²⁺对 Af-OTd 酶活性的影响

Fig.8 Effects of Co²⁺ and Zn²⁺ on Af-OTd enzyme activity

3 结论

将实验室已获得的 OTA 降解酶 Af-OTd 在大肠杆菌中进行重组表达及蛋白纯化,并对部分酶学特性进行初步探索。试验结果表明:Af-OTd 的酶活性受温度、pH 值、酒精含量和金属离子的影响。该酶表现出较宽的温度范围(30~70 ℃),50 ℃为其最适反应温度;该酶在弱碱性条件下的酶活更好,最适 pH 值为 7.5,酸性条件下酶活受影响较明显;该酶对酒精呈现一定的耐受能力,当酒精含量为 4%时,OTA 降解率仍可维持在 60%左右,然而当酒精含量大于 8%,OTA 降解率几乎降为 0。而常见赭曲霉毒素 A 的葡萄酒酒精含量在 8%~15%之间^[24],食品、饲料、包括葡萄酒的 pH 值都为中性偏酸性^[25],因此后续试验应着重通过易错 PCR 或定点突变等手段降低降解酶 Af-OTd 的最适 pH 值,提高其酒精耐受度,从而提升酶的品质。同时,试验还发现,Af-OTd 酶活与金属离子有着密切的关系。一方面,在金属螯合剂 EDTA 及 7 种金属离子单独存在的反应体系中,Af-OTd 的相对酶活力都出现不同程度的下降;另一方面,当 EDTA 分别与 7 种金属离子同时在反应体系中时,相对酶活力较前一试验都有明显提升。该现象可能与多种作用机制有关,如引起酶蛋白表面电荷的变化,从而影响酶的活性^[26];在此过程中还发现,微摩尔级的 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 离子对 Af-OTd 酶活性有明显的促进作用,这可能是 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 离子作为辅因子与酶形成复合物,成为活性中心的组成部分^[27],也可能是作为酶的激活剂或辅基激活提高酶活力^[28],具体机制还需通过后续试验进一步分析。

本文实现 Af-OTd 异源高效表达并完成该酶的酶学性质的初步探究,为 Af-OTd 性能的进一步优化积累了数据,将为促进毒素脱毒酶在相关行业的应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] ALI N. Co-occurrence of citrinin and ochratoxin A in rice in Asia and its implications for human health [J]. J Sci Food Agric, 2018, 98(6): 2055-2059.
- [2] LARSEN T O, SVENDSEN A, SMEDSGAARD J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3630-3635.
- [3] MAHDJOUBI C K, ARROYO-MANZANARES N, HAMINI-KADAR N, et al. Multi-mycotoxin occurrence and exposure assessment approach in food-stuffs from Algeria[J]. Toxins (Basel), 2020, 12(3): 194.
- [4] VIANI R. Effect of processing on ochratoxin A (OTA) content of coffee[J]. Adv Exp Med Biol, 2002, 504(1): 189-193.
- [5] TAGHIZADEH S F, REZAEI R, DAVARYNEJAD G, et al. Risk assessment of exposure to aflatoxin B1 and ochratoxin A through consumption of different Pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars collected from four geographical regions of Iran[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 61(1): 61-66.
- [6] OSTRY V, MALIR F, RUPRICH J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin[J]. Toxins (Basel), 2013, 5(9): 1574-1586.
- [7] MONDANI L, PALUMBO R, TSITSIGIANNIS D, et al. Pest management and ochratoxin A contamination in grapes: A review[J]. Toxins (Basel), 2020, 12(5): 303.
- [8] MALLY A, HARD G C, DEKANT W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(11): 2254-2260.
- [9] WANG H, WEI Y, XIE Y, et al. Ochratoxin A and fumonisin B₁ exhibit synergistic cytotoxic effects by inducing apoptosis on rat liver cells[J]. Toxicon, 2020, 181(1): 19-27.
- [10] PARK H, PARK H S, LIM W, et al. Ochratoxin A suppresses proliferation of Sertoli and Leydig cells in mice[J]. Med Mycol, 2020, 58(1): 71-82.
- [11] MAYURA K, REDDY R V, HAYES A W, et al. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats[J]. Toxicology, 1982, 25(2/3): 175-185.
- [12] PARKIN D M, BRAY F I, DEVESA S S, et al. Cancer burden in the year 2000. The global picture [J]. European Journal of Cancer, 2001, 37(8): 4-66.
- [13] ABRUNHOSA L, PATERSON R R, VENÂNCIO A. Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination[J]. Toxins (Basel), 2010, 2(5): 1078-1099.
- [14] 杨红娟. 解脂亚罗酵母 Y-2 降解赭曲霉毒素 A 机制

- 的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- YANG H J. Study on the mechanisms involved in degradation of ochratoxin A by *Yarrowia lipolytica* Y-2[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.
- [15] XIAO H, MADHYASTHA S, MARQUARDT R R, et al. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 137(2): 182-192.
- [16] PITOUT M J. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1969, 18(2): 485-491.
- [17] 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.
- [18] NORA N S, FELTRIN A C P, SIBAJA K V M, et al. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice[J]. *Braz J Microbiol*, 2019, 50(4): 1075-1082.
- [19] WANG X, BAI Y, HUANG H, et al. Degradation of aflatoxin B₁ and zearalenone by bacterial and fungal laccases in presence of structurally defined chemicals and complex natural mediators[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(10): 609.
- [20] 师磊, 许文涛, 田晶晶, 等. 一种降解赭曲霉毒素A的羧肽酶原在毕赤酵母中的表达[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(6): 39-44.
- SHI L, XU W T, TIAN J J, et al. The expression of bovine pancreatic procarboxypeptidase A in the *Pichia pastoris* yeast[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(6): 39-44.
- [21] DELAGE N, D'HARLINGUE A, CECCALDI B C, et al. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine[J]. *Food Control*, 2003, 14(4): 225-227.
- [22] 付静, 杨媚, 李理, 等. 雅致放射毛霉 3.2778 羧肽酶性质及其活性中心结构的研究[J]. *中国酿造*, 2010, 216(3): 30-33.
- FU J, YANG M, LI L, et al. Enzymatic properties of carboxypeptidase from *Actinomucor elegans* 3.2778[J]. *China Brewing*, 2010, 216(3): 30-33.
- [23] BISHT D, YADAV S K, GAUTAM P, et al. Simultaneous production of alkaline lipase and protease by antibiotic and heavy metal tolerant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Basic Microbiol*, 2013, 53(9): 715-722.
- [24] BRITTON A, O'NEILL D, BELL S. Underestimating the alcohol content of a glass of wine: The implications for estimates of mortality risk[J]. *Alcohol Alcohol*, 2016, 51(5): 609-614.
- [25] 王义春, 王龔, 江均平, 等. 玉米赤霉烯酮降解酶酶学性质研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2015, 344(12): 64-68.
- WANG Y C, WANG Y, JIANG J P, et al. Enzymatic properties of zearalenone degradation enzyme[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2015, 344(12): 64-68.
- [26] GRBAVČIĆ S, BEZBRADICA D, IZRAEL-ŽIVKOVIĆ L, et al. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(24): 11226-11233.
- [27] GOH P H, ILLIAS R M, GOH K M. Rational mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(5): 5307-5323.
- [28] 李静, 张剑, 赵永祥. 金属离子对蛋白酶作用的研究进展[J]. *日用化学工业*, 2017, 47(6): 345-351.
- LI J, ZHANG J, ZHAO Y X. Progress in research work field with respect to effects of metal ions on protease[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2017, 47(6): 345-351.

Analysis of Enzymatic Properties of Ochratoxin A Degrading Enzyme Af-OTd

Song Jia¹, Fan Huan², Yan Xue³, Wang Wenjie², Zhao Chen^{1*}

⁽¹⁾Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, National Engineering Research Center for Grain Storage and Transportation, Beijing 100037

⁽²⁾Tianjin Animal Science and Veterinary Research Institute, Tianjin 300381

³New Hope Liuhe Co., Ltd., Key Laboratory of Feed and Livestock and Poultry Products Quality & Safety Control,
Ministry of Agriculture, Chengdu 610023)

Abstract Ochratoxin A (OTA) is a fungal toxin widely distribute in food. Reducing or eliminating OTA in food and its raw materials is of great significance in improving food quality and ensuring national food safety. Previously, the amide hydrolase AF-OTd (*Alcaligenes faecalis* OTA degrading enzyme), which can degrade OTA, was identified from *Alcaligenes faecalis* in the laboratory. In this study, the protein AF-OTd was highly expressed through gene recombination, and the enzymatic properties of the purified AF-OTd protein were analyzed. The results showed that the degradation rate of the purified AF-OTd enzyme for OTA was over 90%, and the degradation activity was affected by temperature, pH, alcohol and metal ions. The optimal temperature and pH of the enzyme were 50 °C and 7.5, respectively. Increase of alcohol content lead to a decrease of enzyme activity. When the alcohol content increased to 8%, the remaining enzyme activity was almost zero. 1 mmol/L of metal ions Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} and EDTA have different degrees of inhibition on the enzyme. At the same time, it was also found in this study that trace amounts of Co^{2+} and Zn^{2+} could significantly promote the activity of AF-OTd.

Keywords ochratoxin A; expression and purification; degrading enzyme; enzymatic properties