王进瑶, 叶永丽, 杨阳, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解酶的异源表达及应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 172−180. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010109

WANG Jinyao, YE Yongli, YANG Yang, et al. Heterologous Expression and Application of Deoxynivalenol-degrading Enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 172−180. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010109

·生物工程·

脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解酶的异源表达及应用

王进瑶[1,2,3], 叶永丽[1,2,3,*], 杨　阳[1,2,3], 高　松[1,2,3], 纪　剑[1,2,3], 孙秀兰[1,2,3]

（1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;
2.国家市场监督管理总局重点实验室（食品安全风险物质甄别与防控）, 江苏无锡 214122;
3.江苏集萃未来食品技术研究所有限公司, 江苏宜兴 214200）

摘　要: 本研究聚焦于评估两种酶—*Gs*LiP（源自 *Gelatoporia subvermispora* 的木质素过氧化物酶）和 *Cr*Mnp（源自 *Ceriporiopsis rivulosa* 的锰过氧化物酶）对脱氧雪腐镰刀菌烯醇（Deoxynivalenol，DON）的降解能力及其酶学性质。结果表明，在 pH4.5 和 30 ℃ 的条件下，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 均能有效降解 DON，且在 24 h 时降解率均超过 50%。分子对接模拟显示两种酶与 DON 之间的结合能为−34.78 kcal/mol 和−33.38 kcal/mol，表明其具有较强的 DON 降解能力。经酶处理后的 DON 对 Caco-2 细胞的毒性显著降低，1 μg/mL 的 DON 经过降解后对细胞抑制率低于 10%。此外，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 两种酶在小麦基质中对 DON 的降解率分别达到 23.07%±0.59% 和 24.63%±0.20%。综上，这两种酶在温和条件下对 DON 具有高效降解能力，在细胞毒性评估和小麦基质应用中展现出显著的降毒效果和实际应用潜力。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 生物降解, 过氧化物酶, 细胞毒性
中图分类号: TS201.6　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0172−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010109
本文网刊:

Heterologous Expression and Application of Deoxynivalenol-degrading Enzymes

WANG Jinyao[1,2,3], YE Yongli[1,2,3,*], YANG Yang[1,2,3], GAO Song[1,2,3], JI Jian[1,2,3], SUN Xiulan[1,2,3]

（1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2.Key Laboratory of Screening, Prevention, and Control of Food Safety Risks, State Administration for Market Regulation, Wuxi 214122, China;
3.Institute of Future Food Technology, JITRI, Yixing 214200, China）

Abstract: This study investigated the degradation efficiency and enzymatic characteristics of two fungal enzymes—*Gs*LiP (lignin peroxidase derived from *Gelatoporia subvermispora*) and *Cr*Mnp (manganese peroxidase derived from *Ceriporiopsis rivulosa*)—against deoxynivalenol (DON). Under optimized conditions of pH4.5 and 30 ℃, both enzymes exhibited significant DON-degrading activity, achieving degradation rates exceeding 50% within 24 h. Molecular docking analysis revealed strong binding affinities between the enzymes and DON, with binding energies of −34.78 kcal/mol for *Gs*LiP and −33.38 kcal/mol for *Cr*Mnp, supporting their high degradation potential. DON cytotoxicity was significantly reduced following enzymatic treatment, as evidenced by a cell inhibition rate of less than 10% in Caco-2 cells at a DON concentration of 1 μg/mL. In a wheat matrix, *Gs*LiP and *Cr*Mnp achieved degradation efficiencies of 23.07%±0.59% and

收稿日期: 2025−01−14
基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目（CX(22)2042）; 玉米产业技术体系科学家项目（CARS-02-40）。
作者简介: 王进瑶（2000−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: 1300650257@qq.com。
*** 通信作者:** 叶永丽（1990−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: yyly0222@jiangnan.edu.cn。

24.63%±0.20%, respectively. These findings underscore that *Gs*LiP and *Cr*Mnp can effectively degrade DON under mild conditions, significantly reducing its toxicity, and highlight their potential applications in mitigating DON contamination in food safety and agricultural contexts.

Key words: deoxynivalenol; biodegradation; peroxidase; cytotoxicity

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（Deoxynivalenol, DON）是一种由镰刀菌属真菌产生的次级倍半萜类代谢产物，是小麦赤霉病和玉米赤霉病主要病原菌所产生的单端孢菌毒素[1−2]。DON 污染严重可导致小麦、玉米、大麦和水稻等禾谷类粮食作物产量下降，并具有系列生物毒性[3]。因此，DON 的广泛污染给农业和畜牧业带来严重损失。猪对 DON 特别敏感，猪饲料中 DON 含量超过 1 μg/kg 时，即可引起猪食欲下降、呕吐甚至拒食，导致体重增长缓慢[4−5]。帝斯曼（DSM）公司关于动物饲料中真菌毒素污染的调查研究发现，2023 年中亚地区抽检样品中 DON 含量高于风险阈值的比例达到 100%，而中国受 DON 污染高于风险阈值的样品比例为 78%（结论来源于：http://www.biomin.net）。人和动物暴露于 DON 后，易引发免疫功能障碍、生殖问题、畸形效应、癌症风险增加以及细胞间通信的异常[2,6−7]。DON 的毒性机制在于其与核糖体结合，干扰 60S 亚基活性，抑制蛋白质合成，并错误激活相关激酶和 MAPK 信号通路，破坏线粒体和细胞膜，诱导脂质过氧化，影响细胞生长分裂[8]。DON 同时危及农作物生产以及人与动物的健康，其广泛存在和高毒性使其成为食品安全和公共卫生领域亟待解决的重要问题。

DON 具有高度的化学稳定性和耐热性[9]。已有一些研究探索了利用物理、化学及生物方法来降解 DON[10−11]。然而，物理和化学法降解毒素由于去除效果不稳定、难以规模化处理、营养成分损失大和化学物质残留等缺点而受到限制[12−13]。生物降解方法因其绿色、高效、特异性强等优势而备受关注。研究表明，微生物可利用其自身结构实现对毒素的吸附，细菌细胞壁中的葡聚糖和甘露聚糖是吸附 DON 的关键成分[14−15]。已有超过 20 种微生物在其代谢路径中被确认为对 DON 具有活性作用[16]。

酶降解法作为一种利用微生物分泌酶进行解毒的技术，能够将 DON 转化为毒性较低或无毒的物质[17]。酶降解法不受微生物生长周期的限制，能够实现对解毒反应更为精确的调控，并有效规避微生物可能带来的致病风险。但目前 DON 降解酶类报道有限，亟需挖掘可有效降解 DON 的酶类。木质素酶可通过环氧开环反应氧化苯环，作用于酚类、非酚类芳香化合物和氨基芳香化合物，产生酚氧化物和羟基自由基[18]。这类酶包括木质素过氧化物酶（Lignin peroxidase, LiP）、锰过氧化物酶（Mn-dependent peroxidase, MnP）和漆酶（Laccase）等[19]。研究表明，从金针菇中提取的过氧化物酶在 50 U/g 用量下，仅有 60% 的 DON 被降解[20]。此外，白腐真菌中的锰过氧化物酶需经过 72 h 孵育，对 DON 的降解才能达到 92%[21]。然而，这类酶在降解 DON 时存在所需的酶量较大、反应时间较长，且应用场景有限等缺陷。鉴于木质素降解酶在降解 DON 方面的研究价值和应用前景，且不同来源的酶活性各异，因此，从多种微生物中筛选出更多能高效降解 DON 的木质素酶显得尤为重要，这不仅有助于丰富酶资源库，还可能在降解性能和应用上带来新的优势。本研究通过 BlastP 比对，从 NCBI 数据库中筛选出两种新的木质素降解酶 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp，对这两种酶进行克隆表达，并对其酶学特性进行表征，验证其对 DON 的有效降解能力，并利用 Caco-2 细胞模型进行毒性分析，拟为这些酶在粮食和食品工业中的实际应用提供研究基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

质粒提取试剂盒　天根生物技术有限公司；咪唑、氨苄青霉素、异丙基-*β*-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-*β*-D-thiogalactoside, IPTG）　生工生物工程有限公司；DON（纯度≥97%）　青岛普瑞邦生物工程有限公司；2,20-连氮基-双（3-乙基苯并噻唑啉-6 磺酸）（ABTS）、氯化钠、磷酸氢二钠、硫酸锰、丙二酸、一水合丙二酸钠、聚氰基丙烯酸正丁酯（Bicinchoninic acid, BCA）蛋白定量试剂盒、基因表达宿主菌株 *E. coli* BL21（DE3）　上海泰坦科技股份有限公司；氯化血红素　伊诺凯科技有限公司；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）凝胶快速制备试剂盒、蛋白 Marker、蛋白上样缓冲液　上海雅酶生物医药科技有限公司；Cell Counting Kit8（CCK-8）试剂盒、无缝克隆试剂盒、蛋白纯化试剂盒　上海碧云天生物技术有限公司；含有目的基因的 pET28（+）质粒　天霖生物科技无锡有限公司；Caco-2 人结肠癌细胞株　上海赛百慷生物技术股份有限公司。

Agilent 6470B LC/TQ、Agilent 1290 Infinity II 液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）　安捷伦科技有限公司；JY92-IIN 超声波细胞粉碎机　宁波新芝生物科技股份有限公司；Nano-300 微量可见分光光度计　上海元析仪器有限公司；BJ-150 型多功能粉碎机　德清拜杰电器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 质粒构建　本研究所用的 2 组 DON 降解酶基因序列来自 *Gelatoporia subvermispora* 菌株木质素过氧化物酶 *Gs*LiP（GenBank：AAO61784.1）和来自 *Ceriporiopsis rivulosa* 菌株锰

过氧化物酶 *Cr*Mnp(GenBank: ABB83812.1),并将其克隆到(+)pCold Ⅱ中。使用的引物见表 1,使用三对引物通过 PCR 扩增出 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 两种目的酶以及 pCold Ⅱ载体,然后将三种 PCR 产物纯化,纯化后的产物通过无缝克隆试剂盒连接,以获得 pCold Ⅱ-*Gs*LiP 和 pCold Ⅱ-*Cr*Mnp,将这 2 个重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。测序正确后进行蛋白表达。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

引物	序列
R-pCold Ⅱ	CATATGATGATGATGATGCACTTTGTGATTC
F-pCold Ⅱ	GAATTCAAGCTTGTCGACCTGCAGTCTAG
R-*Cr*Mnp	CGACAAGCTTGAATTCGGATCCTTACG
F-*Cr*Mnp	CATCATCATCATATGGAGCTCATGGCTTTC
R-*Gs*LiP	CGACAAGCTTGAATTCGGATCCTTACG
F-*Gs*LiP	CATCATCATCATATGGAGCTCATGGCATTTG

1.2.2 酶蛋白表达和纯化 参考王晓璐[22]和汪洋等[23]的方法,将含有 pCold Ⅱ-*Gs*LiP 和 pCold Ⅱ-*Cr*Mnp 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株接种在含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,于 37 ℃ 以 220 r/min 振荡培养 8 h。按照 1% 的接种量将预培养物接种到 200 mL 的 LB 培养基中培养至 OD_{600}=0.6~0.8,添加终浓度为 2 mmol/L 的 IPTG,并在 16 ℃ 下 180 r/min 振荡 20 h,在添加 IPTG 的 6 h 后,每隔 2 h 添加 20 μL 的 1 mol/L 氯化钙和 100 μL 的 10 g/L 氯化血红素,总计 5 次。诱导结束后,收集表达细胞重悬于 1×PBS 缓冲溶液并进行超声破碎。将超声处理的混合物在 4 ℃ 下以 10000 r/min 离心 30 min,随后上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后加入到 3 mL Ni-NTA 琼脂糖纯化柱中。用 3 mL 洗涤缓冲液(20 mmol/L 磷酸氢二钠,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)和 1 mL 洗脱缓冲液(20 mmol/L 磷酸氢二钠,500 mmol/L NaCl,40~100 mmol/L 咪唑)纯化目的酶。通过 10 kDa 超滤管浓缩蛋白并去除咪唑。采用 SDS-PAGE 电泳检测表达情况,通过凝胶成像系统拍摄电泳图谱,并与蛋白 Marker 进行对比,将达到电泳纯的酶合并。将合并后的酶液装入透析袋(Mw: 7000)中,随后置于 1×PBS 缓冲溶液中透析 6 h,共计 2 次,所获酶液于 4 ℃ 保存。采用 BCA 法测定酶蛋白浓度,将牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)进行梯度稀释后加入工作液,37 ℃ 孵育 30 min,然后在 562 nm 处测定吸光度并绘制标准曲线。同样的方法用于处理待测酶液,依据标准曲线计算实际浓度。纯化后的酶在 50 mmol/L pH4.5 丙二酸缓冲液中进行紫外-可见光谱分析。扫描范围为 230~800 nm。通过计算 Rz 值($Rz=A_{407}/A_{280}$)来评估蛋白质的复性效率。

1.2.3 酶活性测定 1 mL 重组酶(2 mg/mL)在 50 mmol/L 丙二酸(1 mmol/L ABTS、1 mmol/L $MnSO_4$ 和0.1 mmol/L H_2O_2, pH4.5, 25 ℃)缓冲溶液中反应 3 min,紫外分光光度计监测 420 nm 处 ABTS(ε420=36000 $(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$)的氧化速率确定酶的活性。一个单位(1 U)的酶活性被定义为在标准分析条件下每分钟催化 1 μmol 底物的酶量。

1.2.4 酶对 DON 的降解效果 DON 的降解反应在 pH4.5 的 50 mmol/L 丙二酸缓冲液中进行。体系包括: 5 U/mL 酶、1 mmol/L $MnSO_4$、0.1 mmol/L H_2O_2 和 5 μg/mL DON。在 30 ℃ 下反应 0、1、3、6、12、24 和 36 h,同时轻轻摇动,以确定最佳生物降解时间。在 98 ℃ 加热反应 2 min 终止反应。以不加酶的反应体系作为阴性对照。

1.2.5 酶学性质探究

1.2.5.1 探究 pH 和温度对重组酶活力的影响 选择 pH4~6 范围的丙二酸缓冲溶液制备反应液,于 25 ℃ 孵育,酶活最高的 pH 条件被视为最适 pH,将该最适 pH 条件下的相对酶活设定为 100%。选择 pH4.5 的丙二酸缓冲溶液,在 20~40 ℃ 下水浴孵育。酶活最高的温度条件被视为最适温度,将该温度条件下的相对酶活设定为 100%。

1.2.5.2 探究 pH 和温度对酶对呕吐毒素降解效果的影响 研究酶在 pH4.5 下,不同温度(20、30、40、50、60、70、80 ℃)对 DON 的降解效果;研究温度为 30 ℃ 时,不同 pH(3、3.5、4、4.5、5、5.5、6)对 DON 的降解效果。在 98 ℃ 加热反应 2 min 终止反应。以不加酶的反应体系作为阴性对照。

1.2.6 分子对接模拟 使用 Autodock Tools 1.5.6 进行降解酶和 DON 之间的对接研究。通过 AutoDock Tools 对蛋白质和配体进行预处理,包括添加氢原子、计算电荷和删除水分子(对蛋白质)以及能量最小化(对配体)。然后,在 AutoDock Tools 中定义一个对接盒以覆盖蛋白质的活性位点。使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,并设置相关参数(蛋白质和配体的文件路径、对接盒的参数、输出文件的路径等)。对接完成后,分析多个配体构象的对接得分,选择最佳构象进行进一步分析。使用分子可视化工具查看和分析最佳构象,分析蛋白质与配体之间的相互作用。

1.2.7 体外细胞毒性实验 Caco-2 细胞株在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养,培养条件为恒温 37 ℃ 和 5% CO_2 环境。经过两次细胞传代后,离心收集细胞,并将其接种至 96 孔培养板中,每孔的细胞密度设定为 1.0×10^5 cell/mL, 37 ℃ 培养 24 h[24]。加入含有不同浓度 DON 的培养液,控制终浓度分别为 1、2、5 mg/L;设置对照组为正常培养的 Caco-2 细胞,实验组则包括: a.添加不同浓度 DON(1、2、5 mg/L)的细胞培养液;b.在相应 DON 浓度下,经过酶降解处理后产物的细胞培养液。使用 CCK-8 试剂盒,按照说明书测定细胞活性的抑制率[25]。

$$抑制率(\%)=\left(1-\frac{实验组OD值}{对照组OD值}\right)\times 100 \qquad 式（1）$$

1.2.8　酶对霉变小麦的降解效果的验证　使用粉碎机将小麦磨碎，过 80 目筛。称取粉状小麦 5.0 g 加入 50 mL 离心管中后灭菌。将发霉小麦（经检测 DON 含量为 2.31~2.44 mg/L）浸泡在含有 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 的丙二酸缓冲溶液中。在 30 ℃ 和 pH4.5 的环境下反应，分别在 0、12 和 24 h 取样，98 ℃ 加热反应 2 min 终止反应，旋涡振荡 5 min，10000 r/min 离心 1 min，利用 1 mL 无菌注射器吸取上清液，过 0.22 μm 的水系滤膜收集到进样小瓶中，处理后的样品保存在-20 ℃。DON 降解率(%)计算方法如下：

$$R(\%)=\frac{Rb-Ra}{Rb}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：R 表示 DON 降解率，%；Rb 表示原样品中 DON 含量，μg/mL；Ra 表示酶解后样品中剩余的 DON 含量，μg/mL。

1.2.9　液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）分析 DON 浓度　反应结束后取 1 mL 样品，0.22 μm 水系滤膜过滤后转移至色谱进样瓶中。液相色谱条件：通过装配 C_{18} 液相色谱柱（柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm）的 LC-MS 系统测定反应体系中的 DON 浓度。流动相 A 相：0.01% 氨水溶液；B 相：乙腈。梯度洗脱：2% B（0~0.8 min），24% B（3.0~4.0 min），100% B（6.0~6.9 min），2% B（6.9~7.0 min）；流速：0.35 mL/min；柱温：40 ℃；进样体积：10 μL。质谱条件：电喷雾离子源（负离子模式），母离子：295 m/z，锥孔电压：14 eV，定量离子：265 m/z，碰撞电压：12 eV，定性离子：138 m/z，碰撞电压：18 eV。采用 0.1~10 μg/mL 的 DON 标准品建立标准曲线，以浓度（X）对峰面积（Y）进行线性拟合，并据此计算样品中 DON 的浓度。

1.3　数据处理

每个实验重复 3 次，利用 GraphPad Prism 8、AutoDock Vina、PyMOL 进行数据图像绘制，统计计算使用 SPSS 26.0 分析（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1　质粒构建

将优化后的 *GS*LiP 和 *Cr*Mnp 基因插入到 BamHI 和 Xhol 之间的质粒 pColdⅡ中，得到重组质粒 pColdⅡ-*GS*LiP 和 pColdⅡ-*Cr*Mnp。用三对引物对载体 pColdⅡ和两个酶的目的基因进行 PCR 扩增，扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶鉴定后得到的实验结果显示（图 1），pColdⅡ载体大小为 4407 bp，*Gs*LiP 是源自 *Gelatoporia subvermispora* 基因组的一个木质素过氧化物酶基因，其长度为 1134 bp[26]。*Cr*Mnp 是从 *Ceriporiopsis rivulosa* 基因组中鉴别出的一个锰过氧化物酶基因，其长度为 1134 bp[27]，均与预期片段大小相符。

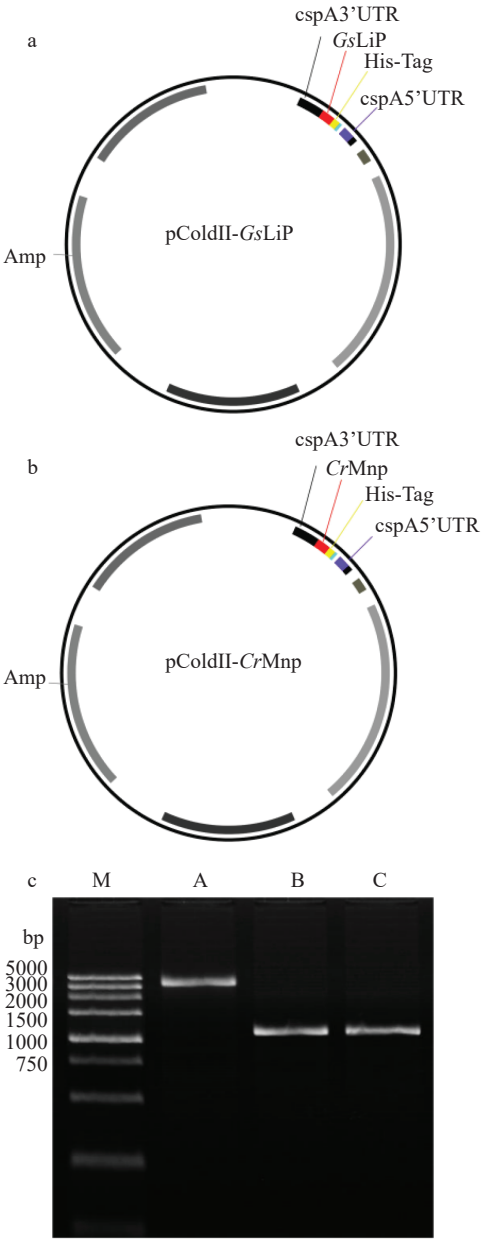


图 1　质粒的构建和 PCR 扩增结果

Fig.1　Construction of plasmids and PCR amplification results

注：（a）*Gs*LiP 质粒简图；（b）*Cr*Mnp 质粒简图；（c）pColdⅡ、*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 基因 PCR 扩增。其中，M 为 5000 bp 的 DNA 标记，A 为 pColdⅡ基因扩增，B 为 *Gs*LiP 基因扩增，C 为 *Cr*Mnp 基因扩增。

2.2　*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 的表达和纯化

*Gs*LiP 能编码 377 个氨基酸，Expasy 网站预测的分子量约为 41.3 kDa（图 2a）。*Cr*Mnp 能编码 378 个氨基酸，预测的分子量约为 41.8 kDa（图 2b）。经过蛋白电泳检测，这两种蛋白质的实际分子量均与理论预测值相符。

紫外-可见光谱分析结果显示，纯化后的 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 酶均呈现出与含有血红素酶相似的典型特征[28]。血红素是过氧化物酶的重要辅基，血红素中的铁原子在静止状态下通常处于 Fe^{3+}的氧化态，能够与过氧化氢等底物发生反应。具体来说，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 分别在 405 nm 和 408 nm 处存在一个明显

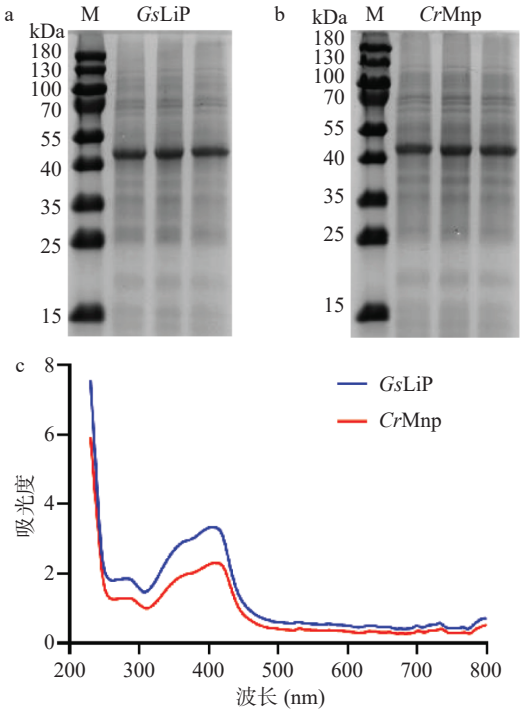


图 2　蛋白酶的纯化和分析

Fig.2　Purification and analysis of protease

注: (a)*Gs*LiP 的 SDS-PAGE 凝胶染色, 其中, M: 蛋白标记, 泳道 1~3 为 40~60 mol/L 咪唑洗脱的纯化蛋白; (b)*Cr*Mnp 的 SDS-PAGE 凝胶染色, 其中, M: 蛋白标记, 泳道 1~3 为 40~60 mol/L 咪唑洗脱的纯化蛋白; (c)*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 紫外-可见光谱扫描。

的吸收峰, 这些特定的吸收峰是血红素辅基的典型光谱特征, 这充分证明了血红素基团已经被成功掺入到纯化的重组蛋白质中(图 2c)。此外, 纯化的 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 的 Rz 值(A_{405}/A_{280} 和 A_{407}/A_{280})均为 1.8。Rz 值的变化提示酶功能活性和稳定性的变化, Rz 值是表征酶分子中血红素辅基含量的关键指标。由于这两种酶的活性均依赖于血红素, 因此 Rz 值能直接反映其功能活性和结构稳定性: 高 Rz 值表明血红素结合完整, 预示着高活性与高稳定性; 反之, 其变化则提示酶功能可能受损[29]。

2.3　*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的降解效果

如图 3 所示, 含 5 U/mL 的纯化的 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 酶在 24 h 对 DON 的降解率达到 51.75%±0.52% 和 55.19%±0.43%, 在反应初期 0~3 h 内, 酶与 DON 的反应并不明显, 3 h 后降解率仅为 11.34%±0.73% 和 16.47%±0.31%, 在 3~24 h 中, 随着反应时间的延长, DON 的降解率不断升高。反应 24 h 后, 反应体系出现絮状沉淀, 酶逐渐失活, DON 的降解速率虽略有下降, 但其整体降解过程已进入稳定阶段。酶的纯度及其所来源的物种不同, 会对毒素的降解效果产生影响。不同物种来源的酶在结构、催化机制和底物特异性上可能存在差异, 这些差异会导致酶在相同反应条件下的催化效率、稳定性和产物特异性有所不同[30−32]。BsDyP 在反应初期降解 DON 速度较慢, 6 h 降解 1.99%, 12 h 后降解速度加快, 24 h 内

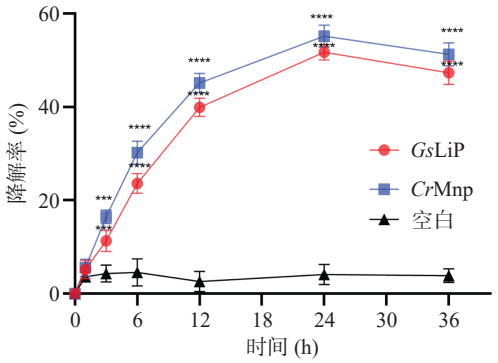


图 3　不同时间下 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的降解效果

Fig.3　Degradation effects of *Gs*LIP and *Cr*Mnp on DON at different times

注: ***表示差异极其显著, $P<0.001$, ****表示差异高度极其显著, $P<0.0001$。

降解 46.56%[33]。BaDyP 对 DON 的降解率从 6 h 的 10.69% 增至 48 h 的 72.98%[34]。这表明不同来源的酶在降解 DON 方面表现出了不同的效率和动力学特性。

2.4　酶学性质表征

酶的作用机制涉及将底物分子结合到其活性中心。活性中心的三维结构对于催化反应至关重要, 而 pH 的变化能够影响氨基酸残基的电荷状态, 进而改变活性中心的构型[35]。在 25 ℃ 条件下, 研究不同 pH 对酶活性的影响, 发现在 pH 为 4.5 时酶活性最高, 而在 pH6 时, *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 两种酶残余酶活降至最大值的 33.37% 和 42.27%(图 4a)。在 pH4.5 时, 考察 20~40 ℃ 温度范围内酶活性的变化, 结果显示, 两种酶在 30 ℃ 时活性最强, 而随着温度的升高或是降低, 酶活性逐渐减弱, 当温度升至 40 ℃ 时, 两种酶的剩余活性仅剩最大值的 34.46% 和 41.98%(图 4b)。

如图 4c 所示, 在 pH3~6 范围内, 两种降解酶在不同的 pH 下对 DON 具有相似的降解率, 在 pH3~4.5 时, 随着 pH 的升高, 酶活性不断提高, DON 的降解率也逐渐提高。在 pH4.5 时, *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的降解率分别达到 50.49%±1.29% 和 53.90%±1.62%。当 pH 超过 4.5 后, 降解率随着 pH 的提高不断下降; 在 pH 为 5.5 和 6 条件下孵育 24 h 后, 两种降解酶对 DON 的降解效果相当。*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 在 pH3~6 条件下对 DON 都有降解效果, 表明该两种酶在较宽的 pH 范围内具有一定的适应性。

在 pH4.5, 温度 20~80 ℃ 范围内, 考察温度对 DON 降解率的影响, 结果如图 4d 所示。*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 在 30 ℃ 时降解活性最高, 对 DON 的降解率达到 52.69%±0.71% 和 55.11%±0.50%, 并且在 20 ℃ 表现出 20% 以上的降解率。*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 在温度高于 40 ℃ 时活性急剧下降, 说明其对高温敏感。当温度超过 60 ℃ 后, *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 几乎无降解活性, 这与其他木质素降解酶相似, 在低温和酸性条件下酶活性达到最佳[36−37]。

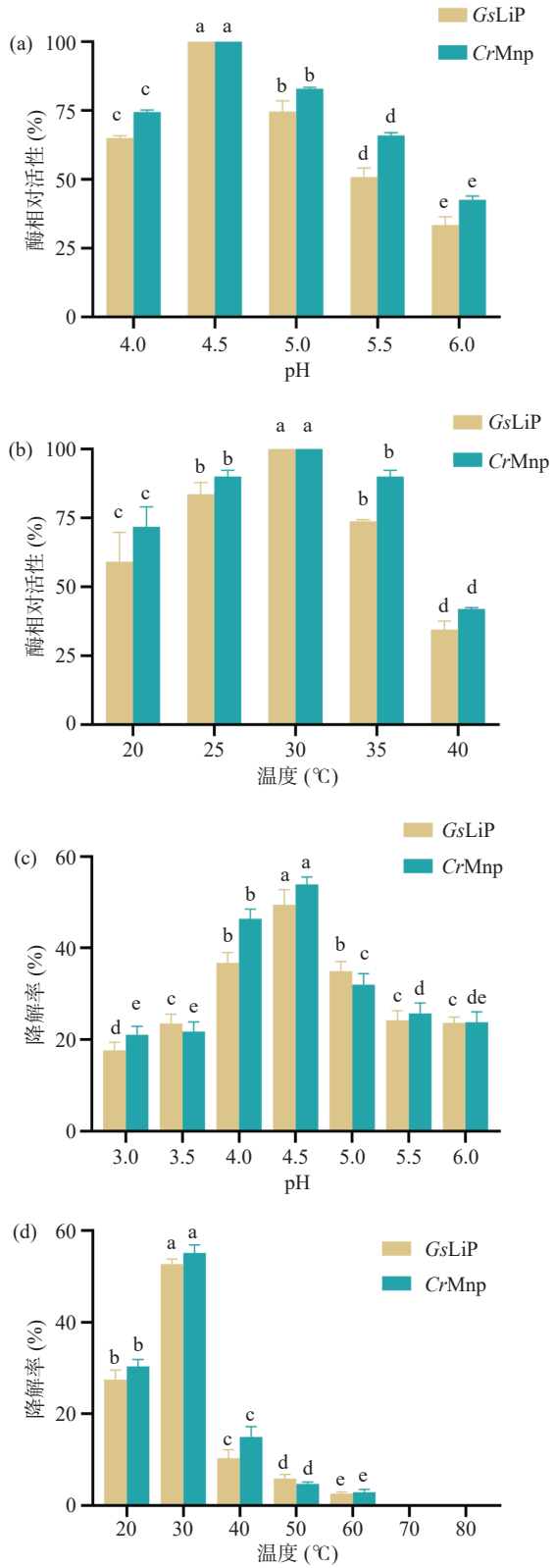


图 4　*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 的酶学性质

Fig.4　Characterization of the enzymatic properties of *Gs*LIP and *Cr*Mnp

注：(a)pH 对酶活性的影响；(b)温度对酶活性的影响；(c)pH 对 DON 降解率的影响；(d)温度对 DON 降解率的影响。

2.5　分子对接结合模型

为了阐明本研究中所使用的酶与底物结合模式，对降解酶和 DON 进行分子对接，通过分析结合模式和关键氨基酸残基来研究相互作用机制。*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 均能与 DON 相互作用，其结合能分别为 −34.78 kcal/mol 和−33.38 kcal/mol。相较于之前研究的白腐真菌杂色木霉产生的漆酶 53739，其对 DON 的降解效率为 40%，结合能为−6.26 kcal/mol[38]。较低的结合能通常表示配体与受体之间的结合更为紧密，亲和力越高，这意味着更强的催化活性[39]。实验证实了本研究中的两种酶展现出了更低的结合能，显示出更强的降解能力。

DON 降解的差异主要与残基的相互作用有关。DON 与 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 亲和力越高，其催化能力就越强。分子对接结果如图 5a、c 所示；在酶 *Gs*LiP 中，由 ARG63、HIS67、PRO162、ILE171、HIS193 形成的活性口袋紧密地包围 DON 分子(图 5b)，而 DON 在酶 *Cr*Mnp 中与 HIS67、PRO163、PRO165、HIS194、PHE211、LEU260 的侧链形成六个氢键(图 5d)。这些参与氢键结合的氨基酸残基对于酶与其底物之间的相互作用至关重要。此外，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对接的氨基酸残基差异如图 5a、c 所示。DON 与 *Gs*LiP 的 Asp233 以及 *Cr*Mnp 的 Asp233 形成的氢键长度均为 1.9 Å。这与 DON 的羟基与漆酶 53739 的 Glu142 形成的氢键长度一致，这些长度都比 DON 的氧原子与 Aolac2 的 Asp233 形成的氢键长度要短，较短的氢键长度有助于增强酶与毒素的结合力[38]，氢键越短，相互作用越强，从而增强了酶与 DON 之间的反应。氢键和范德华力对酶及真菌毒素的稳定性具有显著的影响[39]。

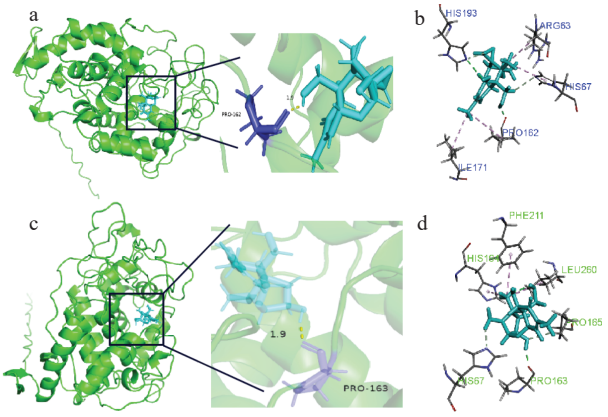


图 5　*Gs*LiP、*Cr*Mnp 与 DON 的分子对接结合模型

Fig.5　Binding model of *Gs*LiP and *Cr*Mnp with DON by molecular docking

注：(a)*Gs*LiP 与 DON 分子对接结果；(b)*Gs*LiP 与 DON 结合时附近的氨基酸残基；(c)*Cr*Mnp 与 DON 分子对接结果；(d)*Cr*Mnp 与 DON 结合时附近的氨基酸残基。

2.6　*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 终产物对细胞的毒性评价

本试验采用经过降解酶处理和未处理的不同浓度的 DON 毒素单独染毒 Caco-2 细胞，结果如图 6 所示。随着 DON 刺激浓度的不断升高，毒素对细胞生长的抑制越来越明显，在 DON 染毒浓度为 1 μg/mL 时，抑制率在 20% 左右，经 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 两种酶处理的 1 μg/mL 的 DON 的降解产物，对细胞活

性的抑制率为 9.51%±1.22% 和 8.27%±1.48%。当染毒浓度达到 2 μg/mL，细胞抑制率达到 35.70%±0.64%。而 2 μg/mL 浓度的 DON 经过降解后对细胞活性的抑制率都在 20% 以下；尽管 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 5 μg/mL 的 DON 降解率为 50% 左右，但降解后样品的细胞活性的抑制率仍维持在 20% 以上。实验结果表明，DON 毒素对 Caco-2 人克隆结肠腺癌细胞培养有显著性抑制作用，而酶降解 DON 毒素后，对 Caco-2 人克隆结肠腺癌细胞活性抑制率降低。由此推测，DON 经过酶处理后其产物毒性部分降低。

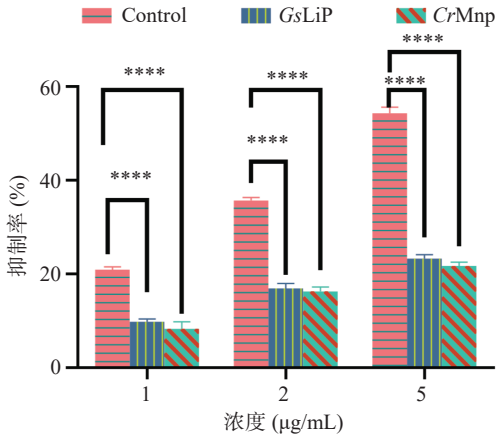


图 6 不同浓度 DON 毒素降解前后对细胞活性影响结果

Fig.6 Effects of DON toxin degradation at different concentrations on cell viability before and after degradation

注：****表示差异高度极其显著，$P<0.0001$。

2.7 酶促降解小麦中 DON 残留效率

在 30 ℃，pH4.5 条件下研究降解酶对小麦中 DON 残留量随时间变化的影响。结果如图 7 所示，受污染小麦的 DON 初始含量在 2.11~2.22 μg/mL 之间，随着反应时间的推移，两种酶均能逐渐降低受污染小麦中的 DON 残留量。具体来说，经过 12 h 的处理，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 处理的样品中 DON 残留量相近，分别为 1.88 μg/mL 和 1.89 μg/mL，对应的降解率分别为 13.45%±0.42% 和 11.29%±0.18%。在

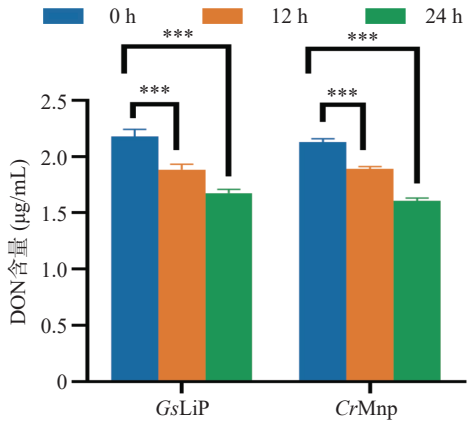


图 7 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 在小麦样品中的应用

Fig.7 Application of *Gs*LiP and *Cr*Mnp in wheat samples

注：***表示差异极显著，$P<0.001$。

12~24 h 时间段内，DON 降解速率有所减缓，24 h 后 *Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的降解率分别达到 23.07%±0.59% 和 24.63%±0.20%。尽管两种酶均显示出对 DON 的降解能力，但相较于电化学法在 60 min 后降解了 49.36%±0.81% 的 DON 仍有差距[40]，可能与食品的含水量[41] 和形态复杂性[42] 有关。

3 结论

本研究筛选了来源于 *Gelatoporia subvermispora* 的木质素过氧化物酶 *Gs*LiP 和来源于 *Ceriporiopsis rivulosa* 的锰过氧化物酶 *Cr*Mnp，皆在评估其对 DON 的降解能力、降解产物的细胞毒性以及在食品中的应用潜力。结果表明，这两种酶对 5 μg/mL 的 DON 处理 24 h 后降解率达到 50% 以上，在常温（30 ℃）、酸性（pH4.5）条件下表现出最佳活性。分子对接技术进一步揭示了两种酶的活性位点氨基酸残基与 DON 之间形成了强氢键，证实了其高效的降解机制。此外，经酶处理的 DON 降解产物对 Caco-2 细胞的毒性部分降低，且在 DON 阳性小麦样本中，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的降解率超过 20%。综上所述，*Gs*LiP 和 *Cr*Mnp 对 DON 的高效降解能力及降解产物的低毒性，为去除小麦中的呕吐毒素提供了新的策略。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] TIAN Ye, ZHANG Dachuan, CAI Pengli, et al. Elimination of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: Current status and future perspectives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 124: 96−107.

[2] WANG Li, LUO Yingpeng, LUO Xiaohu, et al. Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains[J]. Food Control, 2016, 66: 137−144.

[3] MCMULLEN M, BERGSTROM G, de WOLF E, et al. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight[J]. Plant Disease, 2012, 96(12): 1712−1728.

[4] SUN Yu, JIANG Jun, MU Peiqiang, et al. Toxicokinetics and metabolism of deoxynivalenol in animals and humans[J]. Archives of Toxicology, 2022, 96(10): 2639−2654.

[5] 周游. 呕吐毒素光催化降解产物安全性评价及其诱导的胞内氧化应激状态原位监测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [ZHOU You. Safety evaluation of deoxynivalenol photocatalytic degradation products and in situ monitoring methods of its induced intracellular oxidative stress[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]

[6] DALL'ASTA C, GALAVERNA G, BIANCARDI A, et al. Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1047(2): 241−247.

[7] PESTKA J J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human

exposure, and toxicological relevance[J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(9): 663−679.
[8] WANG Xichun, FAN Mengxue, CHU Xiaoyan, et al. Deoxynivalenol induces toxicity and apoptosis in piglet hippocampal nerve cells via the MAPK signaling pathway[J]. Toxicon, 2018, 155: 1−8.
[9] GUO Hongyan, JI Jian, WANG Jiasheng, et al. Deoxynivalenol: Masked forms, fate during food processing, and potential biological remedies[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(2): 895−926.
[10] BULLERMAN L B, BIANCHINI A. Stability of mycotoxins during food processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(1-2): 140−146.
[11] 谢茂昌, 王明祖. 用化学方法脱除赤霉病麦毒素(DON)[J]. 上海农业学报, 2000, 16(1): 4. [XIE Maochang, WANG Mingzu. Decontamination of deoxynivalenol by chemical methods for wheat infected by scab[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2000, 16(1): 4.]
[12] ZHANG Min, YE Zhumiao, XING Changrui, et al. Degradation of deoxynivalenol in wheat by double dielectric barrier discharge cold plasma: Identification and pathway of degradation products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(5): 2347−2356.
[13] 娄雨豪, 王冀菲, 曹冬梅, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染检测与控制研究进展[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(3): 25−29. [LOU Yuhao, WANG Jifei, CAO Dongmei, et al. Research progress on detection and control of deoxynivalenol pollution[J]. Cereals & Oils, 2022, 35(3): 25−29.]
[14] HASSAN Y I, BULLERMAN L B. Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from sourdough starter culture[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2013, 2(5): 2323−2325.
[15] ZHAI Yaoyao, HU Shanshan, ZHONG Lei, et al. Characterization of deoxynivalenol detoxification by *Lactobacillus paracasei* LHZ-1 isolated from yogurt[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(8): 1292−1299.
[16] SHI Yan, XU Wei, NI Dawei, et al. Identification and application of a novel deoxynivalenol-degrading enzyme from *Youhaiella tibetensis*[J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137609.
[17] WU Qinghua, WANG Xu, YANG Wei, et al. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: An update[J]. Archives of Toxicology, 2014, 88(7): 1309−1326.
[18] HOFRICHTER M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(4): 454−466.
[19] KUMAR A, CHANDRA R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment[J]. Heliyon, 2020, 6(2): e03170.
[20] TSO K H, LUMSANGKUL C, JU J C, et al. The potential of peroxidases extracted from the spent mushroom (*Flammulina velutipes*) substrate significantly degrade mycotoxin deoxynivalenol[J]. Toxins, 2021, 13(1): 72.
[21] WANG Xiaolu, QIN Xing, HAO Zhenzhen, et al. Degradation of four major mycotoxins by eight manganese peroxidases in presence of a dicarboxylic acid[J]. Toxins, 2019, 11(10): 566.
[22] 王晓璐. 广谱降解饲料中主要霉菌毒素的酶作用机制及高效表达[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. [WANG Xiaolu. The acting mechanisms and high-level expression of broad-spectrum enzymes detoxifying major mycotoxins in feed[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.]
[23] 汪洋, 赵冬蕾, 王楠希, 等. PQQ 依赖性呕吐毒素脱氢酶的鉴定与性能表征[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(5): 179−187. [WANG Yang, ZHAO Donglei, WANG Nanxi, et al. Identification and biochemical characterization of a PQQ-dependent deoxynivalenol dehydrogenase[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(5): 179−187.]
[24] XIA Shuang, ZHU Pei, PI Fuwei, et al. Development of a simple and convenient cell-based electrochemical biosensor for evaluating the individual and combined toxicity of DON, ZEN, and AFB_1[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 97: 345−351.
[25] MILLER J D, EWEN M A. Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant[J]. Natural Toxins, 1997, 5(6): 234−237.
[26] YAVER D S, WEBER B, MURRELL J. Global expression profiling of the lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* for the discovery of novel enzymes[J]. Applied Mycology & Biotechnology, 2003, 3: 261−269.
[27] HAKALA T K, HILDÉN K, MAIJALA P, et al. Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(4): 839−849.
[28] BAO Xue, LIU Aiqiu, LU Xuefeng, et al. Direct over-expression, characterization and H_2O_2 stability study of active *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(8): 1537−1543.
[29] PARK J Y, HAN S, KIM D, et al. Enhancing the thermostability of lignin peroxidase: Heme as a keystone cofactor driving stability changes in heme enzymes[J]. Heliyon, 2024, 10(17): e37235.
[30] PALMER M A, BENATZY Y, BRÜNE B. Murine Alox8 versus the human ALOX15B ortholog: Differences and similarities [J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2024, 476(12): 1817−1832.
[31] HAN Junwen, MUNAKATA R, TAKAHASHI H, et al. Catalytic mechanism underlying the regiospecificity of coumarin-substrate transmembrane prenyltransferases in Apiaceae[J]. Plant & Cell Physiology, 2025, 66(1): 1−14.
[32] 张瑜. 过氧化物酶对玉米赤霉烯酮和呕吐毒素降解效果的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2022. [ZHANG Yu. A primary study on the feasibility of the degradation of zearalenone and deoxynivalenol using industrial peroxidase preparations[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.]
[33] QIN Xing, SU Xiaoyun, TU Tao, et al. Enzymatic degradation of multiple major mycotoxins by dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis*[J]. Toxins, 2021, 13(6): 429.
[34] SHAO Huimin, SU Xiaoyun, WANG Yaru, et al. Oxidative degradation and detoxification of multiple mycotoxins using a dye-decolorizing peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*[J]. LWT, 2024, 206: 116597.
[35] XIE Ting, ZHOU Li, HAN Laichuang, et al. Modulating the pH profile of the pullulanase from *Pyrococcus yayanosii* CH1 by synergistically engineering the active center and surface[J]. Interna-

tional Journal of Biological Macromolecules, 2022, 216: 132−139.
[36] GIAP V D, DUC H T, HUONG P T M, et al. Purification and characterization of lignin peroxidase from white-rot fungi *Pleurotus pulmonarius* CPG6 and its application in decolorization of synthetic textile dyes[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2023, 68(6): 262−269.
[37] REKIK H, ZARAÎ JAOUADI N, BOUACEM K, et al. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 514−525.
[38] SUN Zhen, YOU Yingxin, XU Huidong, et al. Food-grade expression of two laccases in *Pichia pastoris* and study on their enzymatic degradation characteristics for mycotoxins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(16): 9365−9375.
[39] HAO Wenbo, GU Xiaodan, YU Xiaohu, et al. Laccase LacW detoxifies aflatoxin B_1 and degrades five other major mycotoxins in the absence of redox mediators[J]. Environmental Pollution, 2023, 338: 122581.
[40] YU Minghang, FENG Yunqi, PANG Yuehong, et al. Electrochemical degradation and toxicity evaluation of deoxynivalenol in wheat grains[J]. ACS Food Science & Technology, 2023, 3(1): 224−230.
[41] 崔周磊. 白囊耙齿菌锰过氧化物酶表达鉴定及在秸秆发酵中的菌酶协同作用[D]. 镇江: 江苏大学, 2020. [CUI Zhoulei. Expression and identification of manganese peroxidases from *Irpex lacteus* and effects of bacteria and enzymes synergistic interaction on straw fermentation[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.]
[42] 刘芳, 李萌萌, 卞科. 臭氧对食品中真菌毒素的降解效果及影响因素研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 282−286, 293. [LIU Fang, LI Mengmeng, BIAN Ke. Recent progress in the degradation effects of mycotoxins in food with ozone and the related influencing factors[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 282−286, 293.]