

漆酶降解花生饼中黄曲霉毒素 B₁ 的工艺优化 及分子对接分析

曹玲, 廖瑞凤, 冯江涛, 贺军波, 齐玉堂, 张维农

(武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023)

摘要:为促进漆酶在花生饼粕中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 脱除中的实际应用, 以霉变花生饼为实验对象, 利用漆酶降解 AFB₁, 考察加酶量、体系 pH、反应温度、反应时间及料液比对 AFB₁ 降解率的影响, 优化漆酶降解花生饼中 AFB₁ 的工艺条件, 并通过分子对接分析漆酶与 AFB₁ 的相互作用方式。结果表明: 漆酶降解花生饼中 AFB₁ 的最优工艺条件为加酶量 5 U/g、体系 pH 6.0、反应时间 48 h、反应温度 45 °C、料液比 1:10, 在此条件下漆酶对花生饼中 AFB₁ 的降解率高达 83.5%, AFB₁ 残留量为 15.8 μg/kg, 符合国标要求 (≤50 μg/kg); 分子对接分析表明 AFB₁ 与漆酶活性空腔中的氨基酸残基 His109、Ser110、His111、Ser113、His452、Asp456 间形成了氢键网络, 漆酶降解 AFB₁ 的机制可能与该氢键网络有关。综上, 漆酶对花生饼中 AFB₁ 具有高效的降解活性, 在发霉花生饼脱毒处理中有较大应用前景。

关键词:漆酶; 花生饼; AFB₁; 分子对接

中图分类号: TS229; TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)05-0083-05

Process optimization and molecular docking analysis of laccase degradation of aflatoxin B₁ in peanut cake

CAO Ling, LIAO Ruifeng, FENG Jiangtao, HE Junbo, QI Yutang, ZHANG Weinong

(College of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In order to promote the practical application of laccase in the removal of aflatoxin B₁ (AFB₁) in peanut cake/meal, moldy peanut cake was used as the experimental object to degrade AFB₁ by laccase. The effects of enzyme dosage, system pH, reaction temperature, reaction time and solid-liquid ratio on the degradation rate of AFB₁ were investigated, and the process conditions for the degradation of AFB₁ in peanut cake by laccase were optimized. The interaction model between laccase and AFB₁ was analyzed by molecular docking. The results showed that the optimal conditions for the degradation of AFB₁ in peanut cake by laccase were obtained as follows: enzyme dosage 5 U/g, system pH 6.0, reaction time 48 h, reaction temperature 45 °C and solid-liquid ratio 1:10. Under these conditions, the degradation rate of AFB₁ in peanut cake was as high as 83.5%, and the residual amount of AFB₁ was 15.8 μg/kg, which met the requirements of national standard (≤50 μg/kg). Molecular docking results showed that a hydrogen bond network was formed between AFB₁ and the amino acid residues His109, Ser110, His111, Ser113,

His452 and Asp456 in the active cavity of laccase.

The mechanism of degradation of AFB₁ by laccase might be related to the hydrogen bond network. In summary, laccase has high degradability to AFB₁, which has great application prospect in detoxification treatment of moldy peanut cake.

Key words: laccase; peanut cake; aflatoxin B₁; molecular docking

收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2024-01-04

基金项目: “十三五”国家重点研发计划课题“油料及其制品加工链条安全控制技术集成与示范”(2020YFC1606805); 武汉轻工大学引进(培养)人才科研启动资金(2021RZ072)

作者简介: 曹玲(1997), 女, 硕士研究生, 研究方向为油脂加工与安全(E-mail) 1163904343@qq.com。

通信作者: 冯江涛, 讲师, 博士(E-mail) jtfeng@whpu.edu.cn; 张维农, 教授, 博士(E-mail) zhangweinong@163.com。

花生饼粕是花生榨油后的副产物,其蛋白质含量高、营养丰富、适口性好、可消化率高,是理想的饲料原料^[1-2]。然而花生及花生饼粕在储藏等过程中极易被黄曲霉、寄生曲霉等霉菌污染,从而导致花生饼粕中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 含量过高^[3]。研究表明,长期摄入 AFB₁ 会引起动物生长减缓、体质量降低,甚至死亡^[4]。因此,我国 GB 13078—2017 规定用于饲料原料的花生饼粕中 AFB₁ 含量不得超过 50 μg/kg。

目前,脱除 AFB₁ 的方法主要包括物理法、化学法和生物法^[5-8]。物理法如高温加热、紫外线辐射等会破坏饲料中的营养成分。化学法如添加强氧化剂、强碱等容易导致二次污染。生物法包括微生物降解、酶降解等,该法因安全、高效的优点近年来得到了人们的广泛关注。酶降解法主要利用特定生物酶的催化作用破坏 AFB₁ 的结构,达到脱除 AFB₁ 的目的^[9]。目前关于 AFB₁ 降解酶的研究报道较多,如锰过氧化物酶 (MnP)^[10]、黄曲霉毒素氧化酶 (AFO)^[11]、吡哆胺 5'-磷酸氧化酶 (PNPOxs)^[12]、漆酶 (Laccase) 等^[13]。其中,漆酶是报道较多的 AFB₁ 降解酶之一^[14-15],其在实验室条件下对 AFB₁ 纯品的降解率高达 98%,降解产物为毒性较弱的 AFQ₁, AFQ₁ 对人和其他动物基本无毒害作用^[16-18]。采用漆酶降解 AFB₁ 被认为是一种安全、高效且无二次污染的方法。然而目前大多研究仅限于用漆酶降解 AFB₁ 纯品,使用漆酶降解花生饼粕中 AFB₁ 的研究报道较少。

本文以霉变花生饼为实验材料,采用漆酶降解花生饼中的 AFB₁。通过探索加酶量、体系 pH、反应温度、反应时间及料液比等对漆酶降解 AFB₁ 活性的影响,优化漆酶降解花生饼中 AFB₁ 的工艺条件,并通过分子对接分析漆酶与 AFB₁ 的相互作用方式,初步探索漆酶降解 AFB₁ 的机制,以期在花生饼粕中 AFB₁ 脱除的实际应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

花生仁,购于武汉某菜市场;漆酶(源于灵芝,120 U/g),上海源叶生物科技有限公司;AFB₁ 标准品(纯度 98%),Sigma-Aldrich 公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钠、甲醇、乙腈等,国药集团化学试剂有限公司;AFB₁ 免疫亲和柱,北京中科汇仁科技有限公司;黄曲霉菌种 ATCC9643,北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 仪器与设备

ME204E 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;JY602B 电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;H1750R 湘仪离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BJ-400A 粉碎机,德清拜杰电器有限公司;ZYJ9028 型榨油机,贝尔斯顿公司;HNY-100B 智能恒温振荡器,天津欧诺仪器股份有限公司;THZ-82 水浴恒温振荡器,江苏金坛亿通电子有限公司;Agilent 1260 型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;PHRED-HR 光化学衍生器,北京中科汇仁科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 霉变花生饼的制备

以花生仁为原料,加水润湿,接种 1% 的黄曲霉菌种 ATCC9643,密封后置于 37℃ 培养箱中 15~20 d,直至长出灰绿色的黄曲霉菌。取出样品,于 50℃ 烘 2~3 h,通过榨油机压榨得花生饼,置于粉碎机粉碎,并过 150 μm (100 目) 筛,密封避光保存备用。经测定,该霉变花生饼中 AFB₁ 含量为 (95.39 ± 1.01) μg/kg,严重超标。

1.2.2 漆酶降解花生饼中 AFB₁

称取 2 g 霉变花生饼,按一定料液比加入一定 pH 的 PBS 缓冲溶液中,加入一定量的漆酶,于一定温度、200 r/min 下振荡一段时间,于 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀即为脱毒后的花生饼。

1.2.3 AFB₁ 含量的测定

1.2.3.1 标准曲线的绘制

称取 1 mg AFB₁ 标准品,用甲醇溶解并定容至 100 mL,于 -20℃ 避光保存备用。将上述 AFB₁ 标准储备液用甲醇稀释 100 倍至 100 ng/mL,分别移取上述溶液 50、200、500、1 000、2 000、4 000 μL 至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,得到质量浓度分别为 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 ng/mL 的 AFB₁ 标准溶液,再进高效液相色谱仪测定。以 AFB₁ 质量浓度 (X) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制 AFB₁ 的标准曲线,得到的回归方程为 $Y = 1.11443X - 0.18875$ ($R^2 = 0.9994$)。

液相色谱条件:C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为水-甲醇-乙腈 (体积比 55:35:10),流速 0.9 mL/min,激发波长 360 nm,发射波长 440 nm,柱温 40℃,进样量 10 μL。

1.2.3.2 花生饼中 AFB₁ 的提取与检测

称取 5 g 花生饼于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 甲醇-水 (体积比 70:30) 溶液,涡旋混匀,置于水浴摇床中振荡 20 min,在 5 000 r/min 下离

心 10 min, 取上清液备用。在上清液中加入 23 mL 含 1% 吐温-20 的磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液混匀。混合液以自然流速过 AFB₁ 免疫亲和柱, 最后用 1 mL 甲醇洗脱至试管中, 洗脱液用 0.22 μm 有机超滤膜过滤, 按 1.2.3.1 条件进行高效液相色谱测定, 并将测定结果代入标准曲线方程, 计算得到 AFB₁ 含量。

1.2.4 漆酶与 AFB₁ 的分子对接

使用 SYBYL7.0 软件画出 AFB₁ 的结构, 在其结构中加入氢原子, 并通过能量优化获得最佳构象。从 PDB 数据库中获得漆酶的晶体结构 (PDB:1GYC), 删除其铜催化活性空腔中的 Cu²⁺ 和水分子, 所有位于漆酶铜催化中心 0.65 nm 范围内的原子都被选择进入活性位点。然后利用 SYBYL7.0 软件包的 SURFLEX 模块进行分子对接, 根据软件自带的打分函数获得 AFB₁ 与蛋白质的最佳结合模式。确定 AFB₁ 与漆酶的相互作用方式后, 运用 Pymol 软件画出 AFB₁ 与蛋白质的结合模型。

1.2.5 数据处理

所有实验重复 3 次, 采用 Excel 2019 对数据进行处理和分析, 并用 Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 漆酶降解花生饼中 AFB₁ 的工艺优化

2.1.1 加酶量对 AFB₁ 降解的影响

在料液比 1:10、体系 pH 7.0、反应温度 37℃、反应时间 24 h 条件下, 探究加酶量对花生饼中 AFB₁ 脱除效果的影响, 结果如图 1 所示。

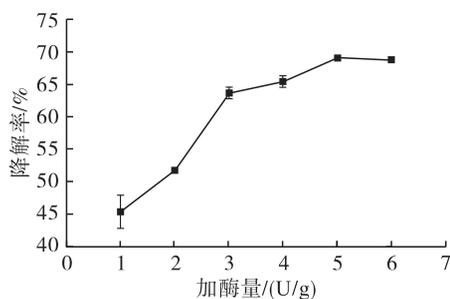


图 1 加酶量对 AFB₁ 降解率的影响

由图 1 可知, 漆酶对 AFB₁ 的降解率随着加酶量的增加而升高, 加酶量由 1 U/g 增加到 5 U/g 时, AFB₁ 降解率由 45.4% 升高至 69.2%, 此时花生饼中 AFB₁ 的残留量降至 29.4 μg/kg。继续增加加酶量, AFB₁ 降解率变化不大。这是因为酶促反应速度与酶的浓度相关, 初始时随着漆酶浓度的增加, AFB₁ 降解率逐渐增加, 而当体系中的酶趋于饱和时, AFB₁ 降解率趋于平稳, 因此选择最佳加酶量为 5 U/g。

2.1.2 体系 pH 对 AFB₁ 降解的影响

在料液比 1:10、加酶量 5 U/g、反应温度 37℃、反应时间 24 h 条件下, 探究体系 pH 对花生饼中 AFB₁ 脱除效果的影响, 结果见图 2。

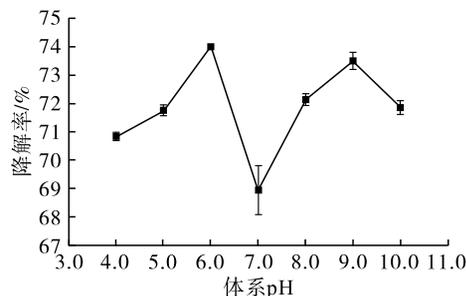


图 2 体系 pH 对 AFB₁ 降解率的影响

pH 通过改变漆酶活性位点中氨基酸残基的解离和电荷来影响酶对 AFB₁ 的降解活性。由图 2 可知, 体系 pH 从 4.0 升至 6.0 时, AFB₁ 降解率由 70.8% 升至 74.0%。体系 pH 为 6.0 时, 漆酶对 AFB₁ 的降解率最高, 此时花生饼中 AFB₁ 残留量仅为 24.8 μg/kg。然而继续增大体系 pH, AFB₁ 降解率有不同程度的降低, 说明过高或过低的 pH 都不利于漆酶对 AFB₁ 的降解, 这与 Wang 等^[18] 获得的漆酶最佳 pH 为 5.0 的结果比较接近, 因此选择最佳体系 pH 为 6.0。

2.1.3 反应温度对 AFB₁ 降解的影响

在料液比 1:10、加酶量 5 U/g、体系 pH 6.0、反应时间 24 h 条件下, 探究反应温度对花生饼中 AFB₁ 脱除效果的影响, 结果见图 3。

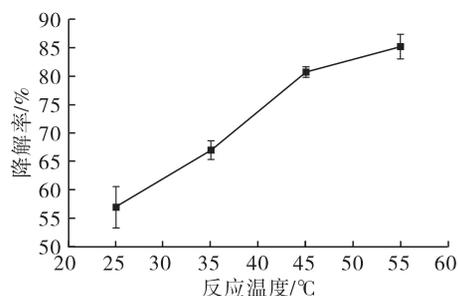


图 3 反应温度对 AFB₁ 降解率的影响

由图 3 可知, 漆酶对花生饼中 AFB₁ 的降解率随着反应温度升高而增加, 当反应温度升至 55℃ 时, AFB₁ 降解率为 85.2%。漆酶在 60~70℃ 时活性最高^[18], 然而温度过高会破坏花生饼中的营养成分, 结合成本考虑, 选择最佳反应温度为 45℃, 此时 AFB₁ 降解率为 80.8%, 花生饼中 AFB₁ 残留量为 18.4 μg/kg。

2.1.4 反应时间对 AFB₁ 降解的影响

在料液比 1:10、加酶量 5 U/g、体系 pH 6.0、反

应温度 45℃ 条件下,探究反应时间对花生饼中 AFB₁ 脱除效果的影响,结果见图 4。

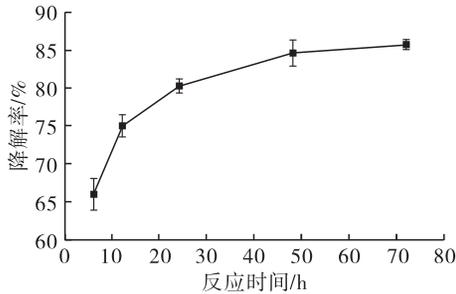


图 4 反应时间对 AFB₁ 降解率的影响

由图 4 可知,反应时间由 6 h 延长到 72 h 时,漆酶对花生饼中 AFB₁ 的降解率由 65.9% 上升至 85.7%,AFB₁ 残留量降至 13.6 μg/kg,表明漆酶对花生饼处理时间越长,越有利于 AFB₁ 的降解,反应 48 h 后,AFB₁ 降解率趋于稳定,这与 Liu 等^[19]的研究结果吻合。考虑到时间成本,选择最佳反应时间为 48 h,此时 AFB₁ 降解率为 84.6%,AFB₁ 残留量为 14.6 μg/kg。

2.1.5 料液比对 AFB₁ 降解的影响

在加酶量 5 U/g、体系 pH 6.0、反应温度 45℃、反应时间 48 h 条件下,探究料液比对花生饼中 AFB₁ 脱除效果的影响,结果见图 5。

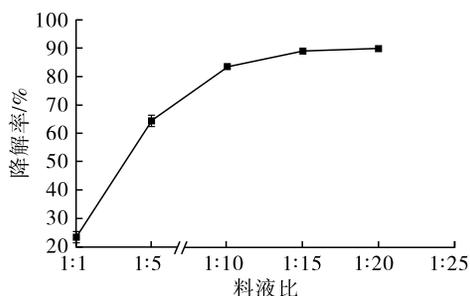


图 5 料液比对 AFB₁ 降解率的影响

由图 5 可知,随着料液比从 1:1 降低至 1:20,漆酶对花生饼中 AFB₁ 的降解率由 23.5% 升高至 89.8%。AFB₁ 难溶于水,因此适当增加反应体系中的缓冲液,有利于花生饼中 AFB₁ 的释放,从而提高漆酶对 AFB₁ 的降解。在料液比 1:10 时,AFB₁ 降解率可达 83.5%,此时 AFB₁ 残留量为 15.8 μg/kg,远低于国标规定的 50 μg/kg,且当料液比为 1:15 和 1:20 时,降解率增加缓慢,从成本方面考虑,选择最佳料液比为 1:10。

2.2 漆酶与 AFB₁ 的相互作用方式

漆酶是一类含 Cu²⁺ 催化中心的多酚氧化酶,其降解 AFB₁ 的机制比较复杂。据报道,漆酶降解 AFB₁ 的产物为一种毒性较弱的物质 AFQ₁^[17]。据

此通过分子对接探究了漆酶与 AFB₁ 的结合模式及催化过程,结果如图 6 所示。

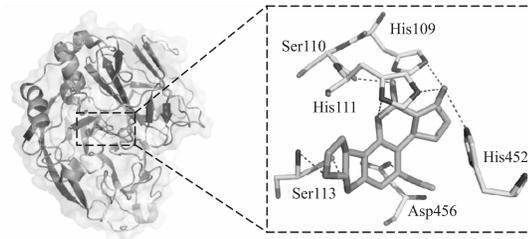


图 6 漆酶与 AFB₁ 的相互作用模型

由图 6 可知,漆酶活性空腔中的氨基酸残基 His109、Ser110、His111、Ser113、His452、Asp456 通过氢键与 AFB₁ 分子相互作用,并与活性空腔中的 Cu²⁺ 和水分子一起构成了氢键网络。虽然其具体机制尚不清楚,但该氢键网络在漆酶降解 AFB₁ 生成 AFQ₁ 的过程中具有重要作用。

3 结论

本文确定了漆酶降解花生饼中 AFB₁ 的最优条件,即加酶量 5 U/g、体系 pH 6.0、反应温度 45℃、反应时间 48 h、料液比 1:10。在最优条件下,AFB₁ 降解率高达 83.5%,花生饼中 AFB₁ 残留量为 15.8 μg/kg,远低于国标规定的 50 μg/kg。通过分子对接分析了漆酶与 AFB₁ 的作用方式,发现漆酶活性空腔中的氨基酸残基 His109、Ser110、His111、Ser113、His452、Asp456 与 AFB₁ 分子间存在较强的氢键作用,该氢键网络与漆酶降解 AFB₁ 的活性相关。

参考文献:

- [1] 王嘉豪,刘长忠,崔艳红. 发酵花生饼的营养价值及其在动物生产中的应用研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(4):154-157.
- [2] 赵丹,王立改,楼宝. 不同饲料蛋白源对黄姑鱼幼鱼生长性能、饲料利用、体组成成分和肌肉氨基酸含量的影响[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(6):509-516.
- [3] 樊庆山,刁其玉,毕研亮. 新型植物饼粕类饲料在反刍动物生产中的应用[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(2):79-85.
- [4] 尹清强,常娟,王平. 饲料中多种霉菌毒素的危害与生物防控[J]. 饲料工业, 2021, 42(21):9-14.
- [5] MAO J, HE B, ZHANG L X, et al. A structure identification and toxicity assessment of the degradation products of aflatoxin B₁ in peanut oil under UV irradiation [J/OL]. Toxins, 2016, 8(11):332 [2023-02-14]. <https://doi.org/10.3390/toxins8110332>.
- [6] DI STEFANO V, PITONZO R, CICERO N, et al. Mycotoxin contamination of animal feedstuff: Detoxification by gamma -

- irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations[J]. *Food Addit Contam A*, 2014, 31(12): 2034–2039.
- [7] VELAZHAHAN R, VIJAYANANDRAJ S, VIJAYASAMU NDEESWARI A, et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turill: Structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G₁ [J]. *Food Control*, 2010, 21(5): 719–725.
- [8] 刘配莲,张刚,陈焱. 食品与饲料中黄曲霉毒素脱除技术的研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(10):92–97.
- [9] 赵萌,高婧,褚华硕. 黄曲霉毒素 B₁ 的分子致毒机理及其微生物脱毒研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(11): 235–245.
- [10] YEHA R S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus* [J]. *Braz J Microbiol*, 2014, 45: 127–134.
- [11] XU T, XIE C, YAO D, et al. Crystal structures of aflatoxin – oxidase from *Armillariella tabescens* reveal a dual activity enzyme [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3): 621–625.
- [12] TAYLOR M C, JACKSON C J, TATTERSALL D B, et al. Identification and characterization of two families of F420 H₂ – dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(3): 561–575.
- [13] LOI M, FANELLI F, ZUCCA P, et al. Aflatoxin B₁ and M₁ degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators [J/OL]. *Toxins*, 2016, 8(9): 245 [2023 – 02 – 14]. <https://doi.org/10.3390/toxins8090245>.
- [14] BRANÀ M T, CIMMARUSTI M T, HAIDUKOWSKI M, et al. Bioremediation of aflatoxin B₁ – contaminated maize by king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) [J/OL]. *Plos One*, 2017, 12(8): e0182574 [2023 – 02 – 14]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182574>.
- [15] LOI M, FANELLI F, CIMMARUSTI M T, et al. *In vitro* single and combined mycotoxins degradation by Ery4 laccase from *Pleurotus eryngii* and redox mediators [J]. *Food Control*, 2018, 90: 401–406.
- [16] GUO Y, QIN X, TANG Y, et al. CotA laccase, a novel aflatoxin oxidase from *Bacillus licheniformis*, transforms aflatoxin B₁ to aflatoxin Q₁ and epi – aflatoxin Q₁ [J/OL]. *Food Chem*, 2020, 325: 126877 [2023 – 02 – 14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126877>.
- [17] KUMAR V, BAHUGUNA A, RAMALINGAM S, et al. Recent technological advances in mechanism, toxicity, and food perspectives of enzyme – mediated aflatoxin degradation[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(20): 5395–5412.
- [18] 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/OL]. *Toxins*, 2019, 11(10):609 [2023 – 02 – 14]. <https://doi.org/10.3390/toxins11100609>.
- [19] LIU Y, MAO H, HU C, et al. Molecular docking studies and *in vitro* degradation of four aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂) by a recombinant laccase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(4): 1353–1360.

(上接第29页)

参考文献:

- [1] POGGETTI L, FERFUIA C, CHIABÀ C, et al. Kernel oil content and oil composition in walnut (*Juglans regia* L.) accessions from north – eastern Italy[J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(3): 955–962.
- [2] OZCAN M M, IMAN C, ARSLAN D. Physicochemical properties, fatty acid and mineral content of some walnuts (*Juglans regia* L.) types [J]. *Agric Sci*, 2010, 1(2): 62–67.
- [3] 赵声兰,陈朝银,葛锋,等. 核桃油功效成分研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2010, 33(6): 71–74.
- [4] GAO P, LIU R, JIN Q, et al. Comparative study of chemical compositions and antioxidant capacities of oils obtained from two species of walnut: *Juglans regia* and *Juglans sigillata* [J]. *Food Chem*, 2019, 279: 279–287.
- [5] 张旋,方晓璞,杨学华,等. 我国不同产地核桃油与铁核桃油营养成分的分析比较[J]. *中国油脂*, 2022, 47(5): 60–64.
- [6] 高盼. 我国核桃油的组成特征及其抗氧化和降胆固醇功效评估[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.
- [7] 李晴,陆胜民,王阳光,等. 冷榨法和酶法提取对山核桃油活性成分的影响[J]. *中国油脂*, 2022, 47(2): 23–27.
- [8] 方文亮,宁德鲁. 云南核桃[M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- [9] 张睿. 食用植物油检测技术指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 2015.