

草酸脱羧酶的性质及应用研究进展

贺俊斌, 林日辉*, 韦成昱, 龙 寒, 梁宇薇, 陈阳阳, 高 华, 杜侣佩

(广西民族大学海洋与生物技术学院, 化学与生物转化过程新技术广西高校重点实验室, 广西 南宁 530006)

摘 要: 草酸脱羧酶 (oxalate decarboxylase, Oxdc) 属Cupin蛋白超家族, 是一种包含 Mn^{2+} 的均一聚合酶, 能够在没有辅因子的条件下催化草酸转化为甲酸和 CO_2 , 是植物、微生物中促使草酸代谢降解的主要酶之一。该酶已在农业、食品、工业生产、医疗和生物监测等领域得到了广泛的应用。本文综述近年来在Oxdc来源、结构、作用以及实际应用方面的研究, 着重讨论其在泌尿系统草酸盐结石病症方面的作用, 为有效预防治疗泌尿系统结石症的研究提供理论参考。

关键词: 草酸; 草酸脱羧酶; Cupin蛋白超家族; 泌尿系统

Properties and Applications of Oxalate Decarboxylase

HE Junbin, LIN Rihui*, WEI Chengyu, LONG Han, LIANG Yuwei, CHEN Yangyang, GAO Hua, DU Lüpei

(Key Laboratory of New Techniques for Chemical and Biological Conversion Process, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

Abstract: Oxalate decarboxylase (Oxdc) is a homogenous polymerase with manganese ion and belongs to the Cupin protein superfamily. In plants and microorganisms, Oxdc is one of the main enzymes which can catalyze the decomposition of oxalate into formic acid and CO_2 without cofactors. It has been applied widely in agriculture, food, industrial process, medical, biological monitoring and other fields. In this paper, the source, structure, function and practical applications of Oxdc are reviewed, with particular discussion on the role and advantages of Oxdc in urinary oxalate stones. This will provide important theoretical reference for the effective prevention and treatment of urinary tract stones.

Key words: oxalic acid; oxalate decarboxylase; Cupin protein superfamily; urinary system

中图分类号: Q55

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 01-0262-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201501050

草酸 (oxalic acid, OA) 是自然界中酸性最强的有机二元羧酸, 其分子式是 HO_2C-CO_2H , 它能溶于水和乙醇, 不溶于乙醚, 通常由植物、微生物通过水解草酰乙酸或氧化乙醛酸、抗坏血酸产生^[1]。草酸是一种惰性的代谢终产物, 虽然结构极其简单, 但其既可作为质子供体, 又可作为电子供体, 对金属阳离子有非常强的螯合性^[2], 这些特性使之对动植物、微生物以及人类的生产生活产生了不同程度的危害, 如造成粮食的减产^[3]、蔬菜水果的营养缺失、造纸和啤酒工业管道堵塞^[4-5]。同时, 草酸在体内的蓄积可产生各种泌尿系统疾病, 如肾结石、尿道结石和高草酸尿症^[6]等。因此, 研究抑制草酸的产生、加速草酸的分解使其水平降低具有重要的科学和现实意义。

目前生物界降解草酸的酶包括草酸氧化酶 (EC 1.2.3.4)、草酸脱羧酶 (EC 4.1.1.2) 和草酰辅酶A脱羧酶

(EC 4.1.1.8), 见图1。这3种降解草酸的酶中, 由于草酸氧化酶和草酰辅酶A脱羧酶的提取条件苛刻、周期长, 对酶保藏的稳定性的要求较高, 因此不适用于实验室操作^[7]。而Oxdc有广泛的微生物来源, 提取和反应条件要求简单, 所以得到了广泛应用。

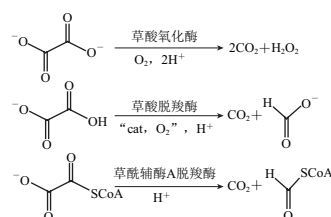


图1 3种降解草酸的酶

Fig.1 Three oxalate-degrading enzymes

草酸脱羧酶 (oxalate decarboxylase, Oxdc, EC 4.1.1.2) 是一种包含 Mn^{2+} 的均一聚合酶, 属Cupin蛋白超

收稿日期: 2014-03-12

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (教外司留[2012]1707号); 广西民族大学科研项目 (2013MDYB031)

作者简介: 贺俊斌 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为酶工程。E-mail: hejunbin556298@163.com

*通信作者: 林日辉 (1972—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为发酵工程、酶工程。E-mail: rihuilin@aliyun.com

家族；它可以在没有辅因子的条件下催化草酸转化为甲酸和 CO_2 ，是植物、微生物中草酸代谢降解的主要催化酶之一^[8]。该酶最早由Shimazono^[9]发现于白腐菌中，它主要来源于黑曲霉、核盘菌、金针菇和褐腐菌等真菌^[10-11]，一些细菌中也发现了该酶，但动物中只在豚鼠（天竺鼠）的肝脏中发现该酶^[12]。枯草芽孢杆菌在低pH值下也能诱导合成Oxdc^[13]。基于Oxdc对底物的高度特异性和酶促反应的高效性等特点，该酶已被成功地应用于农业、食品、工业生产、医疗等领域中。本文综述近年来Oxdc的研究进展，重点讨论了其在泌尿系统草酸盐结石病症方面的应用前景和意义。

1 草酸脱羧酶的性质

1.1 理化性质

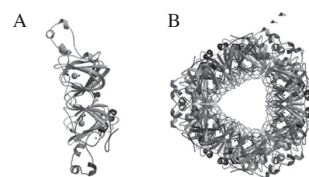
目前为止已经分离和提纯了10多种不同微生物来源的Oxdc^[11]，并初步研究了它们的生化性质。不同来源的Oxdc蛋白的分子质量有较大的差异，但一般都处于55~264 kD范围内。不同微生物来源的Oxdc的最适反应pH值也有较大的差异，但一般都在1.1~3.0之间^[14]。研究表明Oxdc的N端结构域主要介导草酸的分解，而C端结构域是否具有催化功能目前还不清楚，但定点突变及高场电子顺磁共振光谱方面的证据表明C端结构域与酶活性的维持密切相关^[15-16]。此外，来自*Collybia velutipes*的Oxdc具有较强的热稳定性和抗去污剂的能力；该酶虽能特异地分解草酸，但对柠檬酸、醋酸、草乙酸、琥珀酸、蚁酸等都不产生作用^[17-18]。

1.2 结构性质

随着生物化学与分子生物学技术的发展，以及对Oxdc通过核磁共振、电子顺磁共振（electron paramagnetic resonance, EPR）光谱、晶体衍射和蛋白序列测定等的研究，对Oxdc的空间结构特性有了较为深入的研究。Oxdc属Cupin蛋白超家族的Bicupin亚族，Cupin蛋白具有相同的蛋白质前体和三级结构。Kesarwani等^[19]通过5'-cDNA末端快速扩增（5'-rapid-amplification of cDNA ends, 5'-RACE）技术和聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术首次克隆出oxdc基因的cDNA全长序列，并通过cDNA序列在其基因组文库中筛选出该酶的基因组克隆，基因序列研究表明，该酶基因大小2.4 kb，与cDNA序列的比对分析发现，该基因含18个外显子和17个内含子。所有内含子均含保守的5'和3'剪接点，大小为40~60 bp；外显子为18~300 nt。

目前，来源于枯草芽孢杆菌的Oxdc已被克隆表达，对其空间结构及蛋白序列测定等的研究较为深入，并获得了一些高分辨率的晶体结构X射线衍射图。Anand等^[20]通过对来源于*Bacillus subtilis*的Oxdc的氨基酸序列进行测

定和分析，表明该酶大约由379个氨基酸残基组成，是一个由3个Cupin二聚体单体组成的六聚体结构（图2B）；每个亚基分子质量为43 kD，每个单体包含两个结合 Mn^{2+} 的结构域（图2A），该酶的N端和C端Cupin结构域具有27%的同源性，是由保守的6股 β -折叠形成的桶状结构，具有相同的 Mn^{2+} 结合残基（由3个组氨酸残基及1个谷氨酸残基构成八面体环境）。其中结构域I包含56~233个氨基酸残基，在 Mn^{2+} 周围除结合一分子 H_2O_2 和一分子甲酸外还结合4个保守的氨基酸His95、His97、His140和Glu101；结构域II包含234~379个氨基酸残基，在N端还有一段8~55个的氨基酸序列， Mn^{2+} 周围除结合两分子 H_2O_2 外还结合4个氨基酸His273、His275、His319和Glu280。两个结构域中的 Mn^{2+} 相距大约26 Å^[16,20]。之前的研究中Anand等^[20]认为Domain II是催化活性位点，因为只有该位点的Glu333是质子供体。而运用分子动力学模拟，研究Oxdc催化产生的 CO_2 是如何从反应中心转移到酶分子表面的结果表明Domain I很可能是该酶的活性位点^[21]。此外，研究证明在N端结构域上，由161~165氨基酸残基构成一个称为盖子（lid）的五肽环。盖子结构决定了催化反应过程酶活性中心的“开”、“闭”构型，这种蛋白构型的转换使Glu-162接近活性中心的 Mn^{2+} ，Glu-162可能是脱羧反应的质子供体^[22]。盖子结构还与酶促反应的特异性有关，对构成盖子的氨基酸残基进行定点突变，可以使酶的脱羧酶活性转变为草酸氧化酶（oxalate oxidase, OXO）活性^[1,15]。最近的研究表明，N末端和C末端结构域都可能具有催化去碳酸基反应的能力^[23]。



A. 单体结构；B. 六聚体结构；3D结构来源于RCSB蛋白质数据库（www.pdb.org输入1j58）^[20]。

图2 枯草芽孢杆菌草酸脱羧酶的空间结构预测图
Fig.2 Structural prediction of *Bacillus subtilis* Oxdc

2 草酸脱羧酶的催化机理

根据Oxdc结构特点，Anand^[20]和Svedružić^[24]等推测Oxdc催化脱羧反应历程为：单质子化的草酸根及氧分子结合到酶的活性中心上，氧化活性中心的 Mn^{2+} 转变为 Mn^{3+} ，同时伴随形成 Mn^{3+} 结合的草酸超氧化物；活性中心谷氨酸残基介导质子偶联电子的转移，使起始复合物形成 Mn^{2+} 结合的草酸阴离子自由基；受到金属离子及活性中心谷氨酸残基及精氨酸残基的影响，草酸分子C—C

键异裂,发生脱羧反应,产生 Mn^{2+} 结合的甲酸阴离子自由基;活性中心的谷氨酸残基质子化甲酸阴离子自由基,使电子再次由金属发生转移,产生 Mn^{3+} 结合的甲酸根,甲酸根和氧分子解离后,活性中心恢复为 Mn^{2+} 。为研究Oxdc的结构域中 Mn^{2+} 中心的电子性质,Campomanes等^[25]采用定点突变及密度泛函理论/分子力学方法评估了 Mn^{2+} 中心的EPR精细结构参数,建立的方法为运用量子力学法研究与蛋白质结合的金属离子中心的电子结构特性提供了重要依据。草酸脱羧反应属于非氧化脱羧反应,但分子氧对于酶的脱羧活性是必需的^[26],目前运用膜进样质谱法研究在分子氧消耗的条件下NO对Oxdc催化活性的作用,发现NO可逆的抑制Oxdc的催化活性,而X频带电子顺磁共振波谱(X-band EPR)测定结果未能直接证明NO与Oxdc中 Mn^{2+} 中心的相互作用,Mario等^[27]认为该酶中可能存在一个隔离的分子氧结合位点。对于Oxdc催化过程中分子氧的作用,最近研究表明分子氧可能促进质子耦合电子的转移^[28]。

3 草酸脱羧酶的应用

3.1 Oxdc在农业生产中的应用

Oxdc在农业生产中的应用主要是控制由草酸毒素引起的植物病害,其中以控制由菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)侵染植物的研究备受瞩目。Oxdc可以催化草酸转化为无毒的甲酸,因此在植物中引入oxdc基因对抗高草酸分泌积累造成的植物病害是目前重要的研究方向。随着基因工程技术的不断发展,越来越多的植物体基因组中转入了oxdc基因,从而提高了植株对菌核病的抗性。Kesarwani等^[19]运用5'-RACE技术从*F. velutipes*中扩增出oxdc基因,并将此基因转入烟草和番茄中,经接种实验鉴定,发现表型正常且能够稳定遗传的转基因植株对菌核病具有明显的抗性。Walz等^[29]将来自云芝(*Trametes versicolor*)的oxdc基因转入到烟草中后,发现菌核菌致病过程中草酸的含量减少,并且减缓了菌核病的扩散速率。Dias等^[30]运用农杆菌介导法在莴苣(*Lactuca sativa*)中转入来自*Flammulina* sp.的oxdc基因后,通过离体叶片接种菌核病菌进行检测发现转基因植株对*S. sclerotiorum*表现出抗性。Jin Zhaoxia等^[31]用表达Oxdc的*Pandorea* sp. OXJ-11菌株处理油菜(*Brassica napus*)的离体叶片,结果后者表现出抑制菌核病扩散的现象。此外,陈晓婷等^[32]从已测序菌株枯草芽孢杆菌中克隆得到oxdc基因Yvrk,并构建其植物表达载体,通过农杆菌浸花转化拟南芥,为缓解真菌病害提供了有益的借鉴。最近Cunha等^[33]将*Flammulina* sp.的oxdc基因转入到大豆中,T2代自花授粉所获得的转基因系通过检测,发现对菌核病表现出高抗性;离体叶片接种表明,

转基因植株相对于对照组都明显表现出延迟菌核病斑扩散的现象;反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)实验结果显示oxdc基因的表达与抗菌核病的能力有关,转基因植株抗性水平与基因表达水平成正相关。通过从*Flammulina velutipes*中克隆出oxdc基因(*FvOXDC*)转入到烟草中,对转基因烟草中的草酸含量进行测定发现,较对照组转基因烟草中草酸的含量减少约18%~75%;并对离体叶片观察发现*FvOXDC*对由草酸和NLP诱发的植物程序性死亡表现出明显的抗性^[34]。而舒佳宾^[35]从金针菇菌中克隆出oxdc基因,通过农杆菌介导法和植物组织培养技术将该基因转入甘蓝型油菜,对成功的转基因苗运用叶片离体菌核菌技术接种后发现,转基因植株具有明显的延迟和抵御菌核病侵染的能力。最近,Chakraborty等^[36]将来自*Flammulina velutipes*的oxdc基因转入到番茄后,通过对转基因番茄中的草酸含量及营养成分如VC、苹果酸等分析发现,与野生型番茄相比,转基因番茄中草酸的减少量高达90%,而营养成分含量也有所增加,从而为提高农作物营养价值的研究提供了重要依据。

3.2 Oxdc在工业生产中的应用

草酸的积累形成草酸盐沉淀而带来危害性的影响是工业生产中的一个常见问题。尤其是在造纸工业中,由于其过程是在封闭系统中进行,木质纤维素被强氧化剂氧化最终分解为草酸与废水中的 Ca^{2+} 结合造成草酸钙的沉淀积累,堵塞系统管道,阻塞滤网孔,引起热能的损失以及循环水流动不畅等问题^[4-5]。为此,从真菌中提取的Oxdc被广泛地用于去除造纸过程中产生的草酸。2011年瑞典制浆造纸研究所Nilvebrant等^[37]利用Oxdc处理造纸过程中的草酸钙沉积取得了良好的效果。Cassland等^[5]发现从黑曲霉(*A. niger*)中提取的Oxdc在处理二氧化氯漂白纸浆流程中产生的草酸时,与植物中提取的草酸氧化酶相比,效果更明显且不受氯离子的抑制。最近研究发现来源于*Trametes versicolor*的Oxdc在工业漂白滤过中的作用较其他草酸降解酶,尤其是较来源于*A. niger*的效果更明显^[38]。此外,在啤酒工业中,利用Oxdc可去除生产过程中草酸盐积累产生的沉淀废物,如啤酒石,从而改善啤酒生产的工艺^[39]。

3.3 Oxdc在生物监测中的应用

基于Oxdc对底物的高度特异性,其被广泛应用于测定各种材料中草酸的含量,Haas等^[40]利用来自*F. velutipes*中的Oxdc首次成功检测了麦芽汁和啤酒中的草酸含量。随着人类草酸尿和泌尿系统草酸盐结石发病率的增加,研究运用Oxdc检测尿液和血液中草酸含量的方法受到关注。Vadgama等^[41]利用丙烯酰胺凝胶包埋Oxdc与 CO_2 电极结合研制了Oxdc电极,成功应用于检测尿液中草酸的含量。Bishop等^[42]通过火焰电离等技术检测Oxdc分解

草酸后产生的 CO_2 浓度来测定尿液中草酸的浓度,在临床上得到了应用。运用酶/生物荧光检测技术结合来自*F. velutipes*中的Oxdc检测血浆中草酸的浓度也得到良好的效果^[43]。此外,结合Oxdc和甲酸脱氢酶,联合分光光度分析法测定尿液和血液中草酸的浓度,并且结合草酸浓度自动检测分析技术,在临床上得到广泛应用^[44-46]。随着研究的深入,Oxdc酶试剂盒及生物传感器不断出现,在临床上得以应用,但由于该酶的成本高,阻碍了其推广和发展。有研究利用原核表达系统对Oxdc进行诱导表达,每升发酵液收获Oxdc活力1 640 U(约12.33 mg酶蛋白),远高于野生菌的诱导表达量^[47]。然而,由于该酶的获得受发酵条件如培养基成分、温度、pH值等的影响,存在产量低、品质差等问题。因此,在提高Oxdc酶的产量和从新物种中挖掘新的oxdc基因等方面需进一步深入研究。

3.4 Oxdc在预防治疗泌尿系统结石症方面的应用

泌尿系统结石是一种常见的异常生物矿化现象,根据地理环境,生活环境,遗传和饮食条件的不同,结石发病率在3%~14%之间。此外,治疗泌尿系结石存在的另一个重要问题是复发率高,患者在被检出患泌尿系结石并经过治疗后,短则半个月,长至6年,60%~80%的病人都会出现复发^[48]。泌尿系统结石形成的主要原因是人们摄入的饮食中含有可形成结石的相关成分(草酸)过多,如葡萄、茶叶、橘子、番茄、菠菜、草莓等都具有较高含量的草酸。研究表明,泌尿系统结石中大约有70%~80%为草酸钙结石^[6]。目前虽然这类疾病可通过物理或化学的方法治疗,并取得了一定疗效,但结石的复发率高、治疗费用昂贵,且物理化学方法对人体副作用较大。导致草酸钙结石的一个重要原因就是人体内缺乏降解草酸的代谢途径,而生物酶具有作用高效、专一和温和等特点,因此,采用Oxdc对人体内草酸进行降解已成为预防治疗草酸钙结石症的重要研究方向。国外的阿尔特斯制药公司运用交联酶晶体法(cross-linked enzyme crystals, CLECs)制成Oxdc酶制剂用于治疗草酸盐结石症,取得了一定的疗效^[49]。Sidhu等^[50]运用喷雾干燥法制成重组Oxdc颗粒用于减少胃肠吸收的草酸含量,取得良好效果,可用于预防和治疗高草酸尿症等。Mufarrij等^[51]利用体外实验设置不同pH值模拟消化道环境,研究了Oxdc制剂Oxazyme对菠菜中草酸的降解能力,与对照组相比,Oxazyme能显著降低菠菜中草酸的含量。Grujic等^[52]使用基因敲除小鼠为模型,通过口服交联Oxdc晶体(Oxdc-CLEC),有效地防止了小鼠肾钙质沉着症及尿石症的发生。Jeong等^[53]模拟高草酸尿症模型,通过给小鼠口服来源于*B. subtilis*的重组Oxdc,有效的减少了尿液中草酸的水平。Cowley等^[54]以大鼠及狗为实验动物,口服酶制剂Oxazyme(OC4)连续饲喂14 d,评价了这类用

于降解动物消化道中草酸的酶制剂的可能毒性,实验表明均无可见有害作用水平。此外,在乳酸菌NC8中异源表达的Oxdc以及在重组*L. plantarum* WCFS1中利用同源信号肽诱导异源表达的Oxdc可被作为益生菌降解肠道内饮食中的草酸,以预防高草酸尿症的发生^[55-57]。以上这些研究表明,使用Oxdc制剂降解消化道内草酸,减少消化系统对草酸盐的吸收,从而降低草酸钙结石风险的方法是可行的。

但Oxdc用于胃肠道内降解草酸时,容易受胃酸、蛋白酶消化的影响而失去活性,因此,提高该酶在应用过程中的稳定性,改善其使用性能是亟待解决的问题。为解决这一问题,对该酶进行固定化或化学修饰是一重要研究方向。林日辉等^[58-59]提供了一种硫酸铵促进Eupergit C250固定化Oxdc的方法,其制备的固定化酶具有较好的操作性、易于回收重复使用,可应用于食品或造纸等工业过程中草酸的降解。运用无载体固定化方法制备交联Oxdc聚集体,对其酶学性质研究表明交联Oxdc聚集体的耐酸性、耐热性、耐胰蛋白酶降解能力较游离酶均有提高^[60]。梁跃^[61]、韦成昱^[62]等研究了右旋糖酐对Oxdc的化学修饰,并对修饰Oxdc的热稳定性、pH值稳定性及对胰蛋白酶抗性进行研究发现,修饰后酶的性质明显优于修饰前。此外,在活体应用中,利用Oxdc降解泌尿结石时面临酶蛋白易被稀释流失的问题,对此本实验组正在研究对Oxdc进行修饰改性,使之具有对草酸钙晶体特异性或较强烈的吸附能力,有效吸附固定于草酸钙结晶物上,从而较长时间地维持草酸钙结石部位酶制剂的浓度,为Oxdc作为预防、治疗结石的酶制剂的开发应用提供重要参考。

4 结 语

目前,草酸脱羧酶(Oxdc)基于其对底物的高度特异性和酶促反应的高效性等特点,已被成功地应用于农作物抗病研究、工业生产中草酸盐沉淀的去除以及医疗等领域中,但对其研究尚存在许多不足和问题。如对Oxdc的三维空间结构、生理特性等生化性质的研究主要是建立在来源于*B. subtilis*的Oxdc基础之上,对其他物种中的Oxdc研究并不深入;另外,该酶在商业化应用中存在产量低、成本高等缺点。因此,通过分子生物学技术等从新物种中挖掘oxdc基因并建立该酶的异源表达系统,挖掘具备不同生化性质的Oxdc,以及通过生物工程技术等优化产酶条件、提高酶的产量和品质以降低成本等方面,还需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] JUST V J, STEVENSON C E M, BOWATER L, et al. A closed conformation of *Bacillus subtilis* oxalate decarboxylase OxDC provides evidence for the true identity of the active site[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(19): 19867-19874.

- [2] MUNIR E, YOON J J, TOKIMATSU T, et al. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(20): 11126-11130.
- [3] DUTTON M V, EVANS C S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(9): 881-895.
- [4] SJÖDE A, WINESTRAND S, NILVEBRANT N O, et al. Enzyme-based control of oxalic acid in the pulp and paper industry[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(2): 78-83.
- [5] CASSLAND P, SJÖDE A, WINESTRAND S, et al. Evaluation of oxalate decarboxylase and oxalate oxidase for industrial applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 161(1/8): 255-263.
- [6] COE F L, EVAN A, WORCESTER E. Kidney stone disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(10): 2598-2608.
- [7] KOTSIRA V P, CLONIS Y D. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 340(2): 239-249.
- [8] 赵树田, 张士青. 草酸代谢酶的研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(10): 1274-1277.
- [9] SHIMAZONO H. Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi[J]. Journal of Biochemistry, 1955, 42(3): 321-340.
- [10] CHAKRABORTY S, CHAKRABORTY N, JAIN D, et al. Active site geometry of oxalate decarboxylase from *Flammulina velutipes*: role of histidine-coordinated manganese in substrate recognition[J]. Protein Science, 2002, 11(9): 2138-2147.
- [11] MÄKELÄ M R, HILDÉN K, LUNDELL T K. Oxalate decarboxylase: biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 801-814.
- [12] MURTHY M S R, TALWAR H S, NATH R, et al. Oxalate decarboxylase from guinea-pig liver[J]. Ircs Medical Science-Biochemistry, 1981, 9(8): 683-684.
- [13] TANNER A, BORNEMANN S. *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate decarboxylase[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(18): 5271-5273.
- [14] 曹茂新, 洪枫, 朱利民. 草酸脱羧酶及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2005(增刊1): 170-175.
- [15] BURRELL M R, JUST V J, BOWATER L, et al. Oxalate decarboxylase and oxalate oxidase activities can be interchanged with a specificity switch of up to 282 000 by mutating an active site lid[J]. Biochemistry, 2007, 46(43): 12327-12336.
- [16] MOOMAW E W, ANGERHOFER A, MOUSSATCHE P, et al. Metal dependence of oxalate decarboxylase activity[J]. Biochemistry, 2009, 48(26): 6116-6125.
- [17] MEHTA A, DATTA A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Purification, characterization, and cDNA cloning[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(35): 23548-23553.
- [18] 舒佳宾, 官春云. 草酸脱羧酶的性质及应用[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 109-113.
- [19] KESARWANI M, AZAM M, NATARAJAN K, et al. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes* molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(10): 7230-7238.
- [20] ANAND R, DORRESTEIN P C, KINSLAND C, et al. Structure of oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å resolution[J]. Biochemistry, 2002, 41(24): 7659-7669.
- [21] KARMAKAR T, PERIYASAMY G, BALASUBRAMANIAN S. CO₂ Migration pathways in oxalate decarboxylase and clues about its active site[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2013, 117(41): 12451-12460.
- [22] MUTHUSAMY M, BURRELL M R, THORNELEY R N F, et al. Real-time monitoring of the oxalate decarboxylase reaction and probing hydron exchange in the product, formate, using Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Biochemistry, 2006, 45(35): 10667-10673.
- [23] TABARES L C, GA'TJENS J, HUREAU C, et al. pH-dependent structures of the manganese binding sites in oxalate decarboxylase as revealed by high-field electron paramagnetic resonance[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113(26): 9016-9025.
- [24] SVEDRUŽIĆ D, JÓNSSON S, TOYOTA C G, et al. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 433(1): 176-192.
- [25] CAMPOMANES P, KELLETT W F, EASTHON L M, et al. Assigning the EPR Fine Structure parameters of the Mn (II) centers in *Bacillus subtilis* oxalate decarboxylase by site-directed mutagenesis and DFT/MM calculations[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(6): 2313-2323.
- [26] TANNER A, BOWATER L, FAIRHURST S A, et al. Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity overexpression and characterization of *Bacillus subtilis* YvrK and YoaN[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(47): 43627-43634.
- [27] MARIO E G, NIGEL G J. Nitric oxide reversibly inhibits *Bacillus subtilis* oxalate decarboxylase[J]. Chemical Communications, 2011, 47(11): 3111-3113.
- [28] SAYLOR B T, REINHARDT L A, LU Z, et al. A structural element that facilitates proton-coupled electron transfer in oxalate decarboxylase[J]. Biochemistry, 2012, 51(13): 2911-2920.
- [29] WALZ A, ZINGEN-SELL I, THEISEN S, et al. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(4): 317-330.
- [30] DIAS B B A, CUNHA W G, MORAIS L S, et al. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Pathology, 2006, 55(2): 187-193.
- [31] JIN Zhaoxia, WANG Changhai, CHEN Wenfu, et al. Induction of oxalate decarboxylase by oxalate in a newly isolated *Pandora* sp. OXJ-11 and its ability to protect against *Sclerotinia sclerotiorum* infection[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(12): 1316-1322.
- [32] 陈晓婷, 陈芳芳, 郑麟, 等. 枯草芽孢杆菌草酸脱羧酶转化拟南芥研究初报[J]. 中国农学通报, 2008, 24(2): 53-58.
- [33] CUNHA W G, TINOCO M L P, PANCOTI H L, et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene[J]. Plant Pathology, 2010, 59(4): 654-660.
- [34] da SILVA L F, DIAS C V, CIDADE L C, et al. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by Nep1-like protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(7): 839-848.
- [35] 舒佳宾. 草酸脱羧酶对油菜抗菌核病的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [36] CHAKRABORTY N, GHOSH R, GHOSH S, et al. Reduction of oxalate levels in tomato fruit and consequent metabolic remodeling following overexpression of a fungal oxalate decarboxylase[J]. Plant Physiology, 2013, 162(1): 364-378.

- [37] NILVEBRANT N O, REIMANN A, de SOUSA F, et al. Enzymatic degradation of oxalic acid for prevention of scaling[J]. Progress in Biotechnology, 2002, 21: 231-238.
- [38] WINESTRAND S, GANDLA M L, HONG F, et al. Oxalate decarboxylase of *Trametes versicolor*: biochemical characterization and performance in bleaching filtrates from the pulp and paper industry[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2012, 87(11): 1600-1606.
- [39] HIATT W R, OWADES J L. Oxalic acid removal in beer production: US, 4652452 A[P/OL]. 1987-03-24[2014-01-08]. <http://www.google.co.uk/patents/US4652452>.
- [40] HAAS G J, FLEISCHMAN A I. Oxalate in beer, the rapid enzymatic determination of oxalate in wort and beer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1961, 9(6): 451-452.
- [41] VADGAMA P, SHELDON W, GUY J M, et al. Simplified urinary oxalate determination using an enzyme electrode[J]. Clinica Chimica Acta, 1984, 142(2): 193-201.
- [42] BISHOP M, FREUDIGER H, LARGIADER U, et al. Conductivometric determination of urinary oxalate with oxalate decarboxylase[J]. Urological Research, 1982, 10(4): 191-194.
- [43] PARKINSON I S, KEALEY T, LAKER M F. The determination of plasma oxalate concentrations using an enzyme/bioluminescent assay[J]. Clinica Chimica Acta, 1985, 152(3): 335-345.
- [44] COSTELLO J, HATCH M, BOURKE E. An enzymic method for the spectrophotometric determination of oxalic acid[J]. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1976, 87(5): 903-908.
- [45] HATCH M, BOURKE E, COSTELLO J. New enzymic method for serum oxalate determination[J]. Clinical Chemistry, 1977, 23(1): 76-78.
- [46] LANGMAN L J, ALLEN L C. An enzymatic method for oxalate automated using the Hitachi 911 analyzer[J]. Clinical Biochemistry, 1998, 31(5): 429-432.
- [47] 林日辉, 许丽莉, 农勉, 等. 重组草酸脱羧酶的表达及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 57-61.
- [48] 代海涛, 陈志强, 叶章群. 草酸, 草酸钙晶体-上皮细胞相互作用与肾结石[J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(2): 254-257.
- [49] SHENOY B C, CACHERO T G, SHIN J, et al. Crystallized oxalate decarboxylase and methods of use[P/OL]. 2012-09-04 [2014-01-15]. <http://www.google.co.uk/patents/CN103272225A?cl=en&hl=zh-CN>.
- [50] SIDHU H, COWLEY A B, GOLANDER C, et al. Purification and isolation of recombinant oxalate degrading enzymes and spray-dried particles containing oxalate degrading enzymes[P/OL]. 2013-08-22 [2014-01-17]. <http://www.faqs.org/patents/app/20130216515>.
- [51] MUFARRIJ P W, LANGE J N, KNIGHT J, et al. Second place: the effects of oxazyme on oxalate degradation: results and implications of *in vitro* experiments[J]. Journal of Endourology, 2013, 27(3): 284-287.
- [52] GRUJIC D, SALIDO E C, SHENOY B C, et al. Hyperoxaluria is reduced and nephrocalcinosis prevented with an oxalate-degrading enzyme in mice with hyperoxaluria[J]. American Journal of Nephrology, 2008, 29(2): 86-93.
- [53] JEONG B C, HAN D H, SEO S I, et al. *Yrk* gene recombinant *E. coli* reduce the concentration of urine oxalate in transient Hyperoxaluria rat model[J]. The Journal of Urology, 2009, 181(4): 660.
- [54] COWLEY A B, POAGE D W, DEAN R R, et al. 14-day repeat-dose oral toxicity evaluation of oxazyme in rats and dogs[J]. International Journal of Toxicology, 2010, 29(1): 20-31.
- [55] KOLANDASWAMY A, GEORGE L, SADASIVAM S. Heterologous expression of oxalate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* NC8[J]. Current Microbiology, 2009, 58(2): 117-121.
- [56] ANBAZHAGAN K, SASIKUMAR P, GOMATHI S, et al. *in vitro* degradation of oxalate by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing heterologous oxalate decarboxylase[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(3): 880-887.
- [57] SASIKUMAR P, GOMATHI S, ANBAZHAGAN K, et al. Secretion of biologically active heterologous oxalate decarboxylase (OxdC) in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 using homologous signal peptides[J]. BioMed Research International, 2013: 280432. doi: 10.1155/2013/280432.
- [58] 林日辉. 一种硫酸铵促进Eupergit C 250固定化草酸脱羧酶的方法: 中国, 102174502A[P]. 2011-09-07.
- [59] LIN Rihui, WU Ruchun, HUANG Xinlin, et al. Immobilization of oxalate decarboxylase to eupergit and properties of the immobilized enzyme[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2011, 41(2): 154-165.
- [60] 梁跃, 林日辉, 黄文勤, 等. 交联草酸脱羧酶聚集体的制备及其性质[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 215-219.
- [61] 梁跃. 草酸脱羧酶的无载体固定化及化学修饰的研究[D]. 南宁: 广西民族大学, 2012.
- [62] 韦成昱, 林日辉, 龙寒, 等. 右旋糖酐对草酸脱羧酶的修饰研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 195-199.