

# 重组鱼腥藻脂肪氧合酶定点突变及突变酶酶学性质研究

刁含文,张 充,吕凤霞,别小妹,陆兆新\*

(南京农业大学食品科学与技术学院,江苏南京 210095)

**摘 要:**重组鱼腥藻脂肪氧合酶(Ana-LOX)基因来自于*Anabaena* sp. PCC 7120。利用定点突变技术将Ana-LOX的421位和40位的缬氨酸(Val)突变为丙氨酸(Ala),获得突变体V421A、V40A和V421A/V40A。野生型Ana-LOX在50℃下半衰期为3.8 min。而突变酶V421A和V40A在50℃的半衰期分别为4.4 min和7.0 min。突变酶V421A/V40A的半衰期为8.3 min,与野生型Ana-LOX相比,提高了1.18倍。相对于野生酶,突变酶V421A、V40A和V421A/V40A的比活力分别提高了4.83%、41.58%、80.07%。突变酶的最适反应温度均比野生酶(35℃)高5℃。改造后的突变酶更能适合工业生产的需要,对于实际应用具有重要价值。

**关键词:**脂肪氧合酶,定点突变,酶学性质

## Site-directed mutagenesis of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 and enzymatic properties of the mutants

DIAO Han-wen, ZHANG Chong, LV Feng-xia, BIE Xiao-mei, LU Zhao-xin\*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture university, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The thermostability and specific activity of lipoxygenase (Ana-LOX) from *Anabaena* sp. PCC 7120 were improved with replacing valine with alanine by site-directed mutagenesis. Compared to the wild-type enzyme which had a half-life ( $T_{1/2}$ ) of inactivation of 3.8 min at 50℃, the  $T_{1/2}$  of mutant enzymes with V421A and V40A substitution increased to 4.4 and 7.0 min, respectively. The double mutant V421A/V40A showed a synergistic effect with a  $T_{1/2}$  value of 8.3 min, resulting in a 1.18-fold improvement compared to the original Ana-LOX. V421A, V40A and V421A/V40A also obtained 4.83%, 41.58% and 80.07% increase in specific activity, respectively. And, the mutant enzymes obtained 5℃ increase in optimum temperature than the wild-type enzyme (35℃). This study provided useful theoretical reference for enzyme molecular modification and application *in vitro*.

**Key words:** lipoxygenase; site-directed mutagenesis; enzymatic properties

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0160-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.024

脂肪氧合酶(Lipoxygenase, EC1.13.11.12, LOX)是一类含有非血红素铁的蛋白,能够催化具有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的双加氧反应<sup>[1]</sup>,形成具有共轭双键的脂肪酸氢过氧化物。LOX在食品工业、医药工业<sup>[2]</sup>和化工领域<sup>[3-4]</sup>,具有广泛的应用。食品方面,LOX能够将面粉中的不饱和脂肪酸催化氧化成相应的氢过氧化物。这些氢过氧化物能够破坏 $\beta$ -胡萝卜素的双键结构,并且能够将面粉蛋白中的巯基(-SH)氧化成为二硫键(-S-S-),从而起到提高面粉白度,增强面筋蛋白的强度的作用<sup>[5]</sup>;化工方面,LOX早已被用于造纸业<sup>[6]</sup>和纺织工业<sup>[4]</sup>的脱色,市场需求巨大。脂肪氧合酶广泛存在于植物、

动物<sup>[6-7]</sup>中,在微生物中鲜有发现。近年来,*Anabaena* sp. PCC 7120已被证实为能够生产脂肪氧合酶的微生物<sup>[2,8-9]</sup>。但是Ana-LOX的热稳定性较差,无法直接用于工业生产中。因此,为了使Ana-LOX获得更为广泛的工业应用,提高Ana-LOX的热稳定性是非常必要的。本实验室张充等<sup>[10]</sup>已成功对*Anabaena* sp. PCC 7120 LOX (Ana-LOX)基因进行克隆表达,但是未对其性质进行改造。

定点突变常作为用于提高酶分子催化特性的策略<sup>[11-12]</sup>。Wennman等<sup>[13]</sup>通过定点突变替换Gly332, Leu336和Phe337单个氨基酸研究锰型脂肪氧合酶和铁型脂肪氧合酶的催化特性。通过序列比对和同源

收稿日期:2015-01-08

作者简介:刁含文(1990-),男,硕士研究生,研究方向:食品生物技术,E-mail:2012108038@njau.edu.cn。

\*通讯作者:陆兆新(1957-),男,教授,研究方向:食品生物技术,E-mail:fmb@njau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(31470095;31201423);国家863计划(2012AA022207);江苏省科技支撑计划(BE2011390)。

建模,获得合适的目标位点,再对这些位点进行定点突变以提高酶分子热稳定性<sup>[14-15]</sup>。这种基于理性设计的方法相较随机突变等非理性设计方法更加方便、高效和可行<sup>[16]</sup>。目前国内外未有关于定点突变提高 *Anabaena* sp. PCC 7120的重组鱼腥藻脂肪氧合酶热稳定性和酶活的报道,本研究对来源于 *Anabaena* sp. PCC 7120的重组鱼腥藻脂肪氧合酶进行定点突变,提高了其热稳定性和酶活,拓展重组鱼腥藻脂肪氧合酶在工业方面的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

具有编码鱼腥藻 (*Anabaena* sp. PCC 7120) 脂肪氧合酶基因的表达载体 pET-32a(+)/Ana-LOX 由本实验室构建<sup>[2]</sup>; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ( $\Delta$ LacU169 ( $\Phi$ 80 LacZ $\Delta$ M15)) 克隆宿主、*E. coli* BL21 (DE3) pLysS (F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dem (DE3) pLysS Camr) 为本实验室保藏; DNA Marker、IPTG 购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素 购自 Amresco; 琼脂糖、胰蛋白胨和酵母粉 为 Oxoid 公司生产; 其他常规试剂 均为分析纯; 突变试剂盒 (Fast Mutagenesis Kit and Taq Master Mix) 购自诺唯赞 Vazyme (Nanjing, China); DNA 凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit)、质粒提取试剂盒 (Bacterial DNA Kit) 购自 OMEGA (Shanghai, China); LB 培养基 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g。加水溶解后,用 5 mol/L NaOH 将 pH 调到 7.0。加水定容到 1000 mL。配制固体培养基时,按每 100 mL 加入琼脂粉 1.5 g。

SWCJ1FD 型单人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司; 培英 HYL 全温摇瓶柜 太仓实验设备厂; UV2600 紫外可见分光光度计 日本岛津公司; 5804 R 高速冷冻离心机 Eppendorf 德国基因公司; EPs604 稳压水平电泳仪 南京科宝仪器公司; 手提式蒸汽压力灭菌器 上海医用核子仪器厂; PTC100TM PCR 仪 MJ Research 公司; JC380c 全自动数码凝胶成像分析仪 上海培清科技有限公司; JY91 II DN 超声波破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 Ana-LOX 基因多序列比对和同源建模 将 Ana-LOX 基因序列经 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) 与 GenBank 中的非冗余蛋白数据库进行同源性比对,选择相似性较高的基因序列以作为同源建模的模板。再利用 Swiss-Model 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>)<sup>[17]</sup> 进行同源建模,预测重组 Ana-LOX 的三维结构,采用 Rasmol 对其三维结构进行进一步分析以获得合适的突变位点。

1.2.2 Ana-LOX 基因的定点突变 通过以上多序列比对和同源建模分析,我们选择 421 位点和 40 位点作为定点突变靶位点。利用定点突变试剂盒 (Mut Express II Fast Mutagenesis Kit) 获得突变型脂肪氧合酶重组表达载体。根据其使用说明书,对野生型脂肪氧合酶重组表达载体 pET-32a(+)/Ana-LOX 的 DNA 进行扩增,获得线性形式的重组表达载体 DNA,再利用同源重组酶进行环化获得完整的突变型脂肪氧合酶重组

表达载体。所有突变基因都送至 Invitrogen Life Technologies (Shanghai, China) 基因序列测序验证,通过测序验证后,将正确突变的重组表达载体转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 进行蛋白表达。用于定点突变的引物如下: V421A -f: TACAACCTCAgctGCAGTATATG GATCGGATTTACTCAAACA; V421A -r: ATATACTGC agcTGAGTTGTATCGAATTGATGAAAGTACCG; V40A -f: CCCTCTCCCAgcgACTGAAATTCCTTCTAAAAGATT CC; V40A -r: GAATTTCAgTcgTGGGAGAGGGAAAT AAACGTGTTTTTC。

如上所示,我们利用两对寡核苷酸引物进行定点突变获得了两个重要的突变体 (V421A 和 V40A)。

1.2.3 重组脂肪氧合酶的诱导表达 分别挑取含有重组表达载体的野生菌和突变菌 *E. coli* BL21 (DE3) 接种于 20 mL 含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 12 h 获得种子液。分别取 100  $\mu$ L 种子液接种于 100 mL 含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养至发酵液菌体浓度达到 OD<sub>600</sub>=0.6 时,加 IPTG 至 100  $\mu$ g/mL,16  $^{\circ}$ C、180 r/min 进行低温诱导表达 16 h。4  $^{\circ}$ C、9000 r/min 离心 5 min,收集菌体。

1.2.4 重组脂肪氧合酶的分离纯化 将诱导表达收集到的菌体,用磷酸缓冲液 (50 mmol/L PBS+0.3 mol/L NaCl+0.5% Triton X-100) 重悬菌体,超声波破碎菌体 (400 W, 超声 5 s, 间歇 10 s, 共超声 15 min), 4  $^{\circ}$ C、9000 r/min 离心 10 min, 收集上清液作为粗酶液<sup>[10]</sup>。将处理得到的粗酶液按照 Ni-NTA His Tag Kit 说明书依次用含不同浓度咪唑 (50、100、150、200 mmol/L) 的洗脱液洗脱 Ni-NTA 柱,收集洗脱峰,测定相应的酶活。

1.2.5 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 电泳参照 Lorenzi 等<sup>[9]</sup>报道的方法,将纯化前后的野生型和突变型 Ana-LOX 进行 SDS-PAGE 电泳 (SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳),浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%,胶厚 1.0 mm。电泳完毕后,取出凝胶,固定、考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色后观察并拍照。

1.2.6 重组脂肪氧合酶酶活测定 脂肪氧合酶活性分析用亚油酸钠作为底物。酶反应体系中含有: pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液 2.79 mL, 酶液 10  $\mu$ L, 亚油酸钠 200  $\mu$ L, 混匀后放入 35  $^{\circ}$ C 水浴中并开始计时,反应 3 min 后测定吸光度<sup>[18]</sup>。酶活单位定义:在上述条件下以 1 min 内 3 mL 反应体系在 234 nm 的吸光度增加 0.001 作为一个酶活力单位 U<sup>[19]</sup>。

1.2.7 重组脂肪氧合酶酶学性质研究 重组脂肪氧合酶的最适反应温度:将缓冲液分别在 25、30、35、40、45、50、55、65  $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 min,加入 10  $\mu$ L 待测酶液,在不同温度下反应 3 min,在 234 nm 下测定吸光值,以不加酶的溶液作对照。以温度为横坐标,酶活力为纵坐标作图,得到该酶的最适反应温度。

重组脂肪氧合酶的半衰期:将待测酶液分别在 50  $^{\circ}$ C 的水浴中保温,每隔 5 min 取出一组样品,迅速置于冰水中,待保温结束后统一进行酶活力测定,以未处理酶液做为对照。以温度为横坐标,酶活力为纵

坐标,得到温度对酶活力的影响曲线。

重组脂肪氧合酶的最适pH:以亚油酸钠为底物,分别用浓度为50 mmol/L的柠檬酸-柠檬酸钠(pH4~6)、磷酸盐(pH6~8)、Tris-HCl(pH7.5~9)、硼酸/硼酸钠(pH8~11)的缓冲液作为Ana-LOX催化反应的条件,按酶活力测定方法中所述,进行酶活测定。

表观动力学参数( $K_m$ 和 $k_{cat}$ ):以0.15 mol/L Tri-HCl Buffer (pH9.0)为缓冲液,以浓度梯度为0.01、0.015、0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 mmol/L的亚油酸为底物,进行酶活测定。所有测定重复三次,利用获得的数据绘制双倒数曲线图对动力学参数进行评估。

## 2 结果与分析

### 2.1 定点突变和突变体表达

根据多序列比对和同源建模,选取421位点和40位点作为突变位点。通过定点突变利用丙氨酸(Ala)替换重组表达载体上野生型Ana-LOX基因中421位点和40位点的缬氨酸(Val),获得了突变体V421A和V40A。而突变体V421A/V40A是以pET-32a(+)/Ana-LOX-V421A为模板,利用V40A的引物进行定点突变获得的。将突变型Ana-LOX重组表达载体转入*E. coli* BL21大肠杆菌工程菌,对野生型和突变型脂肪氧合酶进行相同条件下的发酵表达。

### 2.2 重组Ana-LOX分离纯化

利用Ni-NTA His Tag Kit对重组Ana-LOX进行分离纯化。如图1所示,对纯化前后野生型和突变型重组Ana-LOX进行SDS-PAGE检测,SDS-PAGE分析显示所有的重组Ana-LOX(左)均能被*E. coli*表达系统分泌表达,而且分泌表达的重组Ana-LOX经纯化后(右)条带单一,结果显示纯化效果较好。

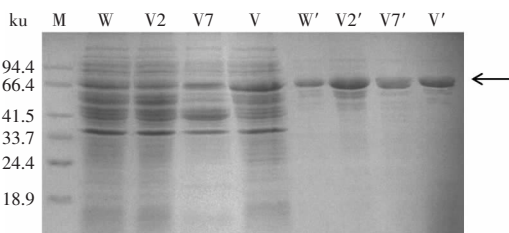


图1 SDS-PAGE电泳分析纯化前后野生型和突变型Ana-LOX

Fig.1 SDS-PAGE analysis for unpurified and purified wild-type Ana-LOX and mutants

注:M:蛋白Marker;W:野生型Ana-LOX;V2:V421A;V7:V40A;V:V421A/V40A;图2~图5、表1同。

### 2.3 野生型和突变型Ana-LOX活力测定

经过对野生型和突变型Ana-LOX发酵表达和活力测定,突变体V40A, V421A以及它们的组合体V421A/V40A均表现出比野生型Ana-LOX更高的比活力。值得注意的是,突变体V40A和V421A的比活力相对于野生型Ana-LOX分别提高了4.83%和41.58%。而其组合体V421A/V40A的比活力提高80.07%(图2,表1),分析可知组合体V421A/V40A是对突变体V40A和V421A的优势组合,产生了协同作用。以上结果显示用丙氨酸(Ala)替换重组Ana-LOX基因中421位点和40位点的缬氨酸(Val)能够提高重组Ana-

LOX的比活力。

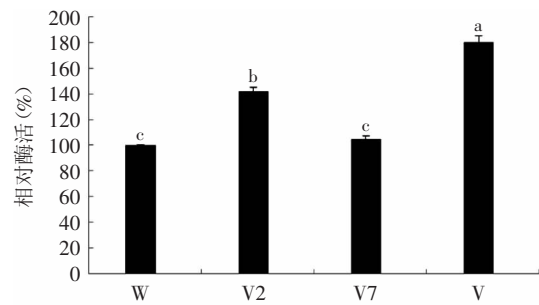


图2 野生型和突变型Ana-LOX相对酶活

Fig.2 Comparative activity of the wild-type Ana-LOX and the mutant enzymes

注:不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

### 2.4 重组Ana-LOX的性质研究

2.4.1 重组脂肪氧合酶的最适反应温度 将纯化后的重组酶在不同的温度条件下,以相同的酶蛋白浓度和底物浓度的作为反应体系进行反应,测定各条件下的活力。结果表明野生型重组脂肪氧合酶的最适反应温度为35℃(图3)。而突变酶V421A、V40A和V421A/V40A的最适反应温度均较野生酶提高了5℃,达到40℃。观察图3,还可以发现20~55℃温度区间里,突变酶V421A、V40A和V421A/V40A的相对酶活均高于野生酶。

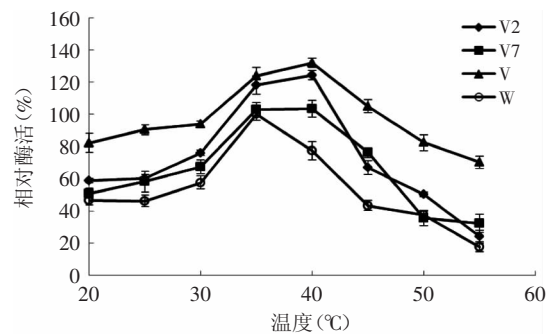


图3 野生型和突变型Ana-LOX最适反应温度

Fig.3 Optimal reaction temperatures of the wild-type Ana-LOX and the V2, V7 and V mutants

2.4.2 重组脂肪氧合酶的热稳定性 对重组Ana-LOX的热稳定性进行了研究。如图4和表1所示,野生酶在50℃下的半衰期( $T_{1/2}$ )为3.8 min。而突变酶V421A和V40A的 $T_{1/2}$ 分别为4.4 min和7.0 min。他们的优势组合体V421A/V40A的 $T_{1/2}$ 则达到了8.3 min,显示出组合体V421A/V40A除了在活力方面具有协同作用外,在热稳定性方面也存在着优势累加的协同作用。以上结果表明用Ala替换重组Ana-LOX基因中421位点和40位点的缬氨酸Val能够提高重组Ana-LOX的热稳定性。

2.4.3 重组脂肪氧合酶的最适pH 将纯化的重组酶在不同的pH条件下,以相同的酶蛋白浓度和底物浓度的作为反应体系进行反应,测定各条件下的活力。不同pH对重组脂肪氧合酶活力的影响。如图5所示,

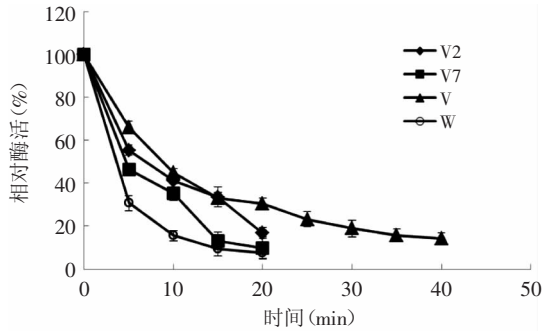


图4 野生型和突变型Ana-LOX 50 °C下半衰期

Fig.4 The half-life ( $T_{1/2}$ ) of the wild-type Ana-LOX and the V2, V7 and V mutants at 50 °C

野生型和突变型重组脂肪氧合酶的最适反应pH均为9。

2.4.4 重组脂肪氧合酶的动力学分析 野生型和突变型脂肪氧合酶的催化特性,通过测定不同底物浓度下的反应速率获得。如表1所知,突变酶V421A/V40A的 $K_m$ 相对野生酶显著降低,而突变酶V421A和V40A没有显著的变化。酶分子的 $K_m$ 越低,其与底物的亲和力越高,因此突变酶V421A/V40A相对野生酶与底物更具有亲和力。 $k_{cat}$ 与 $K_m$ 的比值( $k_{cat}/K_m$ )表示酶分子的催化效率,如表1所示,重组Ana-LOX的催化效率与其比活力有着相同的变化趋势。突变酶的催化速率( $k_{cat}$ )均高于野生酶,并且突变体V421A具有最高的催化速率,达到了野生型的1.65倍。

### 2.5 突变位点结构分析

通过多序列对比对Ana-LOX基因序列进行同源性分析。利用Swiss-Model,来自*Pseudomonas aeruginosa*的脂肪氧合酶三维结构(PDB: 4g33)<sup>[20]</sup>为模板,进行同源建模。通过观察分析Ana-LOX预测的三维结构发现,421位的缬氨酸位于某段 $\alpha$ 螺旋中(图6),而40位的缬氨酸位于酶分子表面的氮末端的Loop环中。本研究以Ana-LOX基因序列中421位点和40位点作为突变靶位点。利用定点突变将421位点和40位点的Val替换为Ala,获得突变体V421A、V40A和V421A/V40A。再次利用Swiss-Model对突变体进行同源建模,获得突变体的模拟三维结构。

实验发现,氨基酸替换后的突变体在热稳定性和酶活方面均有所提高。一方面,通过稳定 $\alpha$ 螺旋来实现的。研究证实,具有较大 $\beta$ 侧链的氨基酸(如Val, Ile, Thr)不利于 $\alpha$ 螺旋的稳定<sup>[21]</sup>。而与缬氨酸相比,丙氨酸具有较小的 $\beta$ 侧链,并且丙氨酸比缬氨酸更具有形成 $\alpha$ 螺旋的倾向<sup>[22]</sup>。图5(A)的Ana-LOX三维结构所

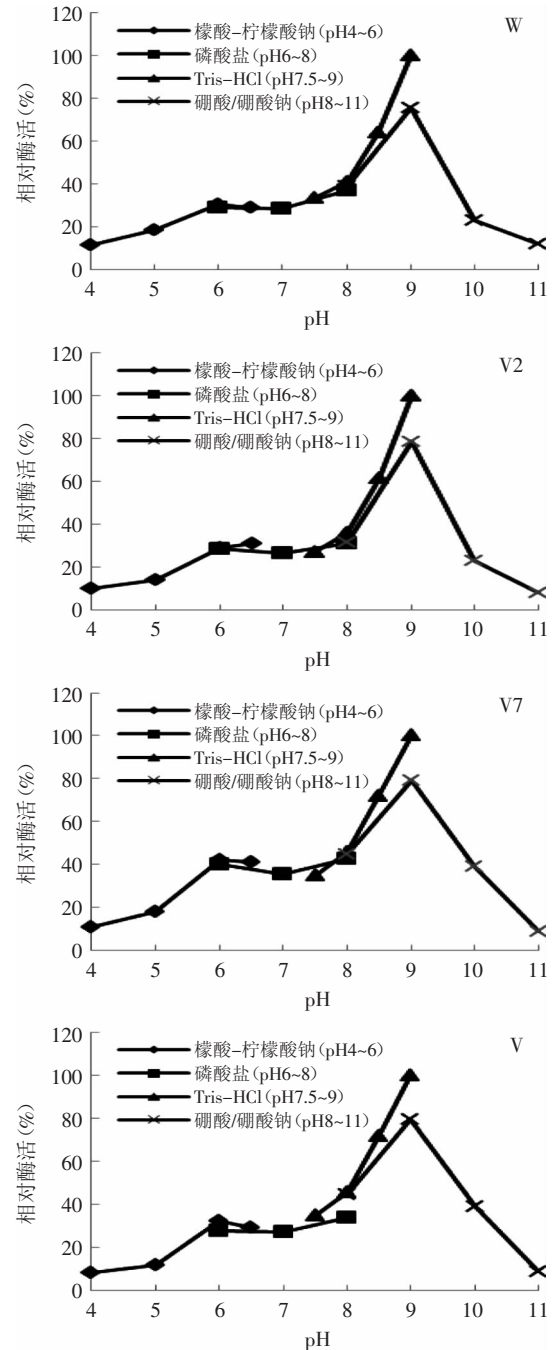


图5 野生型和突变型Ana-LOX最适pH

Fig.5 Optimal reaction pH of the wild-type Ana-LOX and the mutant enzymes

示,421位的缬氨酸破坏了V421所处的整个 $\alpha$ 螺旋的完整性。因此利用Ala替换掉 $\alpha$ 螺旋中 $\beta$ 侧链较大的缬

表1 野生型和突变型Ana-LOX的酶学性质

Table 1 Enzymatic properties of the wild-type LOX and the mutants

	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s))	比活力 (U/mg)	最适温度 (°C)	$T_{1/2}$ (50 °C) (min)
W	0.120±0.001 <sup>a</sup>	20.3±0.3 <sup>d</sup>	169.2 <sup>c</sup>	8.08±0.02 <sup>e</sup>	35	3.8±0.11 <sup>d</sup>
V2	0.125±0.001 <sup>a</sup>	28.6±0.13 <sup>a</sup>	228.8 <sup>b</sup>	11.44±0.015 <sup>b</sup>	40	7.0±0.13 <sup>b</sup>
V7	0.128±0.003 <sup>a</sup>	22.1±0.05 <sup>c</sup>	172.7 <sup>c</sup>	8.47±0.003 <sup>c</sup>	35	4.4±0.05 <sup>c</sup>
V	0.083±0.001 <sup>b</sup>	23.2±0.1 <sup>b</sup>	279.5 <sup>a</sup>	14.55±0.006 <sup>a</sup>	40	8.3±0.26 <sup>a</sup>

注:不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

氨酸提高了Ana-LOX酶分子的稳定性。另外值得注意的是,在突变体V421A的三维结构中,在55位到70位形成了一段新的 $\alpha$ 螺旋(图6B)。由于具有较大 $\beta$ 侧链的缬氨酸在421位处所占的空间位置较大,迫使420位的丝氨酸向外扩展,因此妨碍了55位到70位 $\alpha$ 螺旋的形成。因此突变体V421A为421位相邻的侧链形成 $\alpha$ 螺旋提供了一定的空间,同时也为Ana-LOX酶分子生成了一个新的稳定的二级结构。因为比那些松散无序的结构更能够稳定蛋白质。作为结果,突变体V421A在热稳定性和比活力方面均有所提高。

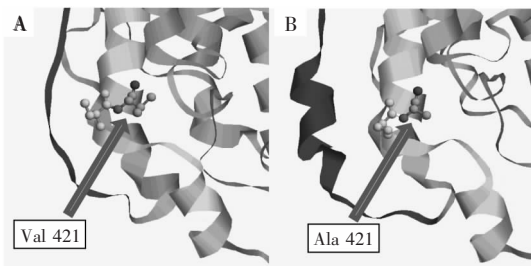


图6 Ana-LOX 421位氨基酸突变前后三维结构模拟图

Fig.6 Three-dimensional homology model of Ana-LOX before (A) and after (B) substitution

注:421位氨基酸分子以球棒模式显示。

另一方面,有研究报道降低蛋白表面与溶剂接触的氨基酸的疏水性,是稳定蛋白质的一个有效策略<sup>[23-24]</sup>。缬氨酸和丙氨酸都是非极性氨基酸,但是,丙氨酸是所有非极性氨基酸中疏水性最小的。因此利用定点突变将40位的缬氨酸替换为丙氨酸,降低了Ana-LOX表面氨基酸的疏水性,最终提高了Ana-LOX的热稳定性。

### 3 结论

分别通过以上两种策略将位点421和40上的缬氨酸突变为丙氨酸提高了Ana-LOX的热稳定性和活力。而优势组合突变体V421A/V40A将这两种策略同时结合,达到协同提高的作用。本研究通过定点突变对重组鱼腥藻脂肪氧合酶进行改造,提高了重组脂肪氧合酶的热稳定性和酶活。为脂肪氧合酶广泛的工业应用,提供更多可行性。尤其是在食品工业,同时有关Ana-LOX食品级应用是我们进一步研究的重点方向。

### 参考文献

[1] Casey R, Hughes R K. Recombinant lipoxygenases and oxylipin metabolism in relation to food quality[J]. Food Biotechnol, 2004, 18(2): 135-170.  
 [2] Zhang C, Tao T T, Ying Q, et al. Extracellular production of lipoxygenase from *Anabaena* sp PCC 7120 in *Bacillus subtilis* and its effect on wheat protein[J]. Appl Microbiol Biot, 2012, 94(4): 949-958.  
 [3] Onysko K A. BIOLOGICAL BLEACHING OF CHEMICAL PULPS—A REVIEW[J]. Biotechnology Advances, 1993, 11(2): 179-198.

[4] Ramsay J A, Goode C. Decoloration of a carpet dye effluent using *Trametes versicolor*[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(3): 197-201.  
 [5] 张守文, 李丹. 应用混合酶制剂进行面粉品质改良的基础研究[J]. 中国粮油学报, 2002(1): 16-21.  
 [6] Lorenzi V, Maury J, Casanova J, et al. Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.)[J]. Plant Physiol Biochem, 2006, 44(7-9): 450-454.  
 [7] Kuo J M, Hwang A, Yeh D B, et al. Lipoxygenase from banana leaf: Purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 3151-3156.  
 [8] Kaneko T, Nakamura Y, Wolk C P, et al. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium *anabaena* sp strain PCC 7120[J]. DNA Res, 2001, 8(5): 205-213.  
 [9] Wang X M, Lu F X, Zhang C, et al. Peroxidation Radical Formation and Regiospecificity of Recombinated *Anabaena* sp Lipoxygenase and Its Effect on Modifying Wheat Proteins[J]. J Agr Food Chem, 2014, 62(7): 1713-1719.  
 [10] 张充, 周孝伟, 吕凤霞, 等. 重组鱼腥藻脂肪氧合酶基因的克隆表达、分离纯化及活性分析[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 440-456.  
 [11] Zhang S, Wu G, Feng S, et al. Improved thermostability of esterase from *Aspergillus fumigatus* by site-directed mutagenesis[J]. Enzyme Microb Tech, 2014, 64-65: 11-16.  
 [12] Ghollasi M, Ghanbari-Safari M, Khajeh K. Improvement of thermal stability of a mutagenised alpha-amylase by manipulation of the calcium-binding site[J]. Enzyme Microb Tech, 2013, 53(6-7): 406-413.  
 [13] Wennman A, Jermerén F, Hamberg M, et al. Catalytic convergence of manganese and iron lipoxygenases by replacement of a single amino acid[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(38): 31757-31765.  
 [14] Ben Mabrouk S, Aghajari N, Ben Ali M, et al. Enhancement of the thermostability of the maltogenic amylase MAUS149 by Gly312Ala and Lys436Arg substitutions[J]. Bioresource Technol, 2011, 102(2): 1740-1746.  
 [15] Mollania N, Khajeh K, Ranjbar B, et al. Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop[J]. Enzyme Microb Tech, 2011, 49(5): 446-452.  
 [16] Parikh M R, Matsumura I. Site-saturation mutagenesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of beta-fucosidase from beta-galactosidase[J]. J Mol Biol, 2005, 352(3): 621-628.  
 [17] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.  
 [18] 侯美玲, 苗华荣, 陈静, 等. 花生种子脂肪氧化酶的活性测定研究[J]. 安徽农业科学, 2008(32): 14033-14035.  
 [19] Szymanowska U, Jakubczyk A, Baraniak B, et al.

(下转第169页)

由图6可知,当固定酶的复配比例时,桑葚出汁率在pH5.0之前随pH的增大而增大,当pH超过5.0时,持续增大pH,出汁率出现下降趋势,这是由于酶解环境酸碱度的变化,会影响酶分子活性部位上有关基团的解离,从而影响酶与底物的结合或催化,使酶活性降低,造成桑葚出汁率下降<sup>[21]</sup>;当固定酶解pH,出汁率随酶的复配比例增大而增大,果胶酶、纤维素酶复配加入比例逐渐达到饱和时,出汁率趋于平缓。

由图7可知,当固定酶的复配比例时,随着酶解温度的升高,出汁率升高,当温度达到49.54℃时,继续升高温度,出汁率下降。这是由于升高温度虽能够增强酶解效果,但当温度超过最适酶解温度时,酶活力会受到抑制,从而导致了出汁率下降。当固定酶解温度不变时,随着双酶复配比例增加,出汁率出现先增加后下降趋势,当果胶酶、纤维素酶复配比例达到1.0:1.36时,出汁率达到最大值。

#### 2.4 验证实验

通过对桑葚汁出汁率的二次项数学模型解逆矩阵,得出在酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、温度49.54℃、时间2.63 h的工艺条件下,桑葚汁出汁率预测值为86.55%。为方便实验将参数修改为:酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、温度49.5℃、时间2.6 h。按上述最优条件进行酶解实验,3次实验测得的桑葚汁平均出汁率为86.13%,理论值和实验值的相对误差为0.42%,基本与预测值保持一致,因此采用响应曲面优化得到的提取条件准确可靠,具有使用价值。

### 3 结论

通过对5种酶单酶酶解桑葚出汁效果的筛选,得到果胶酶、纤维素酶单酶酶解效果明显,出汁率分别可达75.21%、74.55%,从而选取两者作为复合目标酶,将两种酶复配后,根据单因素和响应曲面分析,得出复合酶酶解最优工艺参数为果胶酶、纤维素酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、酶解温度49.5℃、酶解时间2.6 h,此时酶解桑葚出汁率可达86.13%,较果胶酶单酶酶解出汁率提高了10.92%。

#### 参考文献

[1] Bae S H, Suh H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(6):955-962.

[2] 李颖,李庆典. 桑葚多糖抗氧化作用的研究[J]. 中国酿造, 2010(4):59-61.

[3] 霍究起. 1-MCP对桑葚采后生理效应的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(2):310-313.

[4] 马慧. 桑椹叶果复合汁饮料的工艺研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2012.

[5] 梁贵秋,吴婧婧,陆春霞,等. 浅谈桑椹酒的酿制工艺与营养成分[J]. 中国蚕业, 2011, 32(4):70-73.

[6] 李良,邱庆峰,任运宏,等. 桑葚葡萄复合果汁饮料的研制[J]. 食品工业, 2012(2):84-85.

[7] 张瑶,蒲彪,刘云,等. 枇杷果浆酶解工艺的响应面法优化[J]. 食品科学, 2010(14):106-110.

[8] 刘兴艳,蒲彪,鞠从荣,等. 响应面法优化草莓浆酶解工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(16):63-67.

[9] 杜喜玲. 果胶酶对樱桃出汁率的影响[J]. 北京农业, 2014(12).

[10] 李静燕,杨玉玲,李春阳,等. 酶法提高草莓出汁率的工艺优化[J]. 江西农业学报, 2011(9):155-158.

[11] 霍究起. 1-MCP对桑葚采后生理效应的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(2):310-313.

[12] 张志强,杨清香,孙来华. 桑葚的开发及利用现状[J]. 中国食品添加剂, 2009(4):65-68.

[13] 李冬香,陈清西. 桑葚功能成分及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(24):293-297.

[14] 李跃,石彦国,李春阳. 油菜籽酶法破壁出油工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(11):45-49.

[15] 汪志慧,孙智达,谢笔钧. 响应曲面法优化双酶法提取莲房原花青素[J]. 食品科学, 2011, 32(4):64-68.

[16] 田野,马永强,李春阳. 响应面法优化草莓清汁加工工艺[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19):225-229.

[17] 康纪婷,吴翔,甘炳成,等. 纤维素酶活力测定方法[J]. 河北农业科学, 2010, 14(4):151-153.

[18] Warshel A, Sharma P K, Kato M, et al. Electrostatic basis for enzyme catalysis[J]. Chemical reviews, 2006, 106(8):3210-3235.

[19] 张建安,闫科. 木素对纤维素酶解的影响及纤维素酶解[J]. 化学工程, 2000, 28(1):38-39.

[20] 石亚中,方娇龙,钱时权,等. 响应曲面法优化纤维素酶酶解提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(4):75-79.

[21] 杨会涛,陈代文,余冰. pH对木聚糖酶活性的影响[J]. 饲料博览, 2006(7):42-44.

(上接第164页)

Characterisation of lipoxygenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. Telephone L.)[J]. Food Chem, 2009, 116(4):906-910.

[20] Garreta A, Val-Moraes S P, Garcia-Fernandez Q, et al. Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Faseb J, 2013, 27(12):4811-4821.

[21] Piela L, Nemethy G, Scheraga H A. Proline-Induced Constraints in Alpha-Helices[J]. Biopolymers, 1987, 26(9):1587-1600.

[22] Daopin S, Baase W A, Matthews B W. A Mutant T4 Lysozyme

(Val 131-Ala) Designed to Increase Thermostability by the Reduction of Strain within an Alpha-Helix[J]. Proteins, 1990, 7(2):198-204.

[23] Schwehm J M, Kristyanne E S, Biggers C C, et al. Stability effects of increasing the hydrophobicity of solvent-exposed side chains in staphylococcal nuclease[J]. Biochemistry, 1998, 37(19):6939-6948.

[24] Strub C, Alies C, Lougarre A, et al. Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability[J]. BMC Biochemistry, 2004(5):9.