多聚赖氨酸对双亚基肌酸酶表面的修饰

高亚楠，辛 瑜，张 玲，杨海麟，王 武*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：利用多聚赖氨酸(poly-lysine)对同源二聚体肌酸酶进行化学修饰，研究该法对酶稳定性的影响。选用 $L_9(3^4)$正交试验方案，研究不同修饰条件对修饰酶的催化效率和热稳定性的影响，确定多聚赖氨酸修饰肌酸酶(CRE)的最佳条件为 CRE-COOH 与 poly-lysine-NH_2、EDC 的摩尔比分别为 1:100 和 1:10，pH 为 7.0。通过 SDS-PAGE 鉴定，探测多聚赖氨酸可在酶分子表面产生共价结合。修饰酶的催化动力学参数 K_m 和 k_{cat} 分别为 4.75×10^{-2} mol/L 和 2.50×10^{2} S^{-1}。与游离酶相比，修饰酶的热稳定性和 pH 稳定性均明显提高。修饰酶比游离酶的 T_m 值高了 2.07 ℃，当 pH 值为 4.0 和 10.0 时，修饰酶的酶活力仍保留在 50%以上，而游离酶活性几乎丧失。进一步优化研究表明，多聚赖氨酸表面修饰法有可能成为有效提高肌酸酶稳定性的一种方法。

关键词：肌酸酶；*Pseudomonas putida*；多聚赖氨酸；表面修饰；稳定性

中图分类号：Q 814　**文章编号**：1673-1689(2019)07-0134-07　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.019

Surface Modification on Homodimeric Creatinase by Poly-Lysine Binding

GAO Yanan，*XIN Yu*，*ZHANG Ling*，*YANG Hailin*，*WANG Wu**

（Key laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The surface modification of homodimeric creatinase by poly-lysine was carried out to study the effect of enhancing enzyme stability. The influences of different modification condition on enzyme catalytic efficiency and stability were studied by L_9 (3^4)orthogonal experiment，the optimal condition were set as molar ratios of CRE-COOH to poly-lysine-NH_2 and CRE-COOH to EDC were 1:100 and 1:10，in pH 7.0. The covalently binding of poly-lysine onto enzyme surface was tested by SDS-PAGE. The catalytic kinetic parameters （K_m and k_{cat}）of modified enzyme were determined as 4.75×10^{-5} mol/L and 2.50×10^{2} S^{-1}，respectively. Moreover，compared to the native enzyme，the thermal and pH stabilities of the modified creatinase were improved，as Tm of modified enzyme was raised by 2.07 ℃，and more than 50% of initial activity of modified enzyme was maintained at pH 4.0 and 10.0，but the control sample was almost no activity. After further exploitation，poly-lysine modification would be one of the effective methods for improving stability of homodimeric creatinase.

Keywords：creatinase，*Pseudomonas putida*，poly-lysine，surface modification，stability

收稿日期：2016-12-28

基金项目：江苏省优青项目(BK20160053)；江苏省产学研项目(BY2016022-40)。

* **通信作者**：王 武(1952—)，女，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工程和基因工程等方面的研究 。E-mail：wangwu@jiangnan.edu.cn

引用本文：高亚楠，辛瑜，张玲，等. 多聚赖氨酸对双亚基肌酸酶表面的修饰[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(07)：134-140.

肌酸酶(creatinase;EC 3.5.3.3;CRE;分类名为肌酸眯基水解酶,creatinase amidinohydrolase)属于水解酶类,催化肌酸水解产生尿素和肌氨酸,是肌酐代谢中的关键酶。目前在多种细菌中均发现肌酸酶的存在,除了极少数来源的肌酸酶以单亚基的形式存在[1-2],大多数肌酸酶都是同源二聚体,即由两个相同的亚基组成[3-6],其中对 *Pseudomonas putida* 来源的肌酸酶研究最多[3,7-12],Yoshimoto 等[3]人从 *Pseudomonas putida* 中纯化出肌酸酶,并首次获得酶结晶,该酶的特性研究表明,酶的相对分子质量为 94 000,由 2 个相同的亚基组成,亚基相对分子质量为 47 000。

血清和尿液中肌酐含量是诊断肾脏功能的重要指标,肌酸酶是酶法检测肌酐含量的关键酶[13]。但是由于肌酸酶的稳定性较差,造成酶活性损失严重,限制了其工业化生产和应用。已有通过添加稳定剂、分子改造和固定化等方法提高肌酸酶稳定性的报道,Schumann 等[10]研究了恶臭假单胞菌肌酸酶的稳定剂,发现在酶溶液中添加 DTE、BSA 或甘油能改善酶的稳定性,而进一步用随机突变的方法对酶分子结构进行改造,得到了 A109V、V355M、V182I、A109V+V355M 和 A109V+V355M+V182I 等 5 种突变体,稳定性均有所提高[11];Berberich 等[12]用聚氨酯固定化修饰放线杆菌来源的肌酸酶,提高了酶的储存稳定性。

作者尝试通过化学修饰法改善双亚基肌酸酶的稳定性。多亚基酶失活的第一步通常是亚基解离,因此保护多亚基酶的首要目标是防止多亚基酶的解聚[14]。多聚赖氨酸是含有多个游离氨基的多聚物长链,可以与酶分子表面羧基相互作用形成稳定的共价键,环绕覆盖在酶表面,起到分子捆绑的作用,使酶的空间结构更加紧密,从而提高酶的稳定性。作者选取 *Pseudomonas putida* 来源的具有两个相同亚基的肌酸酶为研究对象,考察多聚赖氨酸对酶的修饰效果,该法对双亚基肌酸酶热稳定性提高具有一定的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

3 500~4 500 的多聚赖氨酸(poly-lysine)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC):均购自 Sigma;其他试剂均为国产分析纯或色谱纯试剂。重组 *E.coli* BL21(DE3)/pET28a-CRE:由作者所在实验室构建。

1.2 肌酸酶基因的表达与酶的纯化

重组 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-CRE 在 LB 培养基中于 37 ℃培养过夜,种子液以体积分数 5%转接于新的 LB 培养基中,于 37 ℃、200 r/min 培养至 OD 达到 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,并把温度降至 16 ℃,诱导培养 16 h。8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后,用 pH 7.5、50 mmol/L 的磷酸缓冲液重悬菌体,冰水浴超声破碎菌体,破壁后 8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。采用载体上的组氨酸标签,将粗酶液用镍柱进行亲和层析,获得纯酶液。

1.3 肌酸酶分子表面氨基酸分析

从 PDB 数据库查找 *Pseudomonas putida* 来源的肌酸酶的结构(PDB ID:1CHM),然后用 Pymol 软件对肌酸酶表面的酸碱性氨基酸的数目进行分析。

1.4 肌酸酶修饰正交试验

以肌酸酶表面羧基与 poly-lysine 氨基摩尔比(*A*)、CRE-COOH 与 EDC 的摩尔比(*B*)、反应 pH(*C*)为考察因素。4 ℃缓慢转动混匀过夜,计算相对酶活力;将不同的摩尔比例获得的修饰酶超滤除去未结合的小分子修饰剂,置于 37 ℃恒温水浴中,48 h 后测定其酶活力,并计算其酶活力保留率。以相对酶活力与酶活保留率作为试验指标,利用正交表 $L_9(3^4)$设定三因素三水平正交试验,见表 1。

表 1 正交因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A(CRE-COOH:poly-lysine-NH_2)	*B*(CRE-COOH:EDC)	*C*(pH)
1	1:50	1:2	6.5
2	1:80	1:5	7.0
3	1:100	1:10	7.5

1.5 肌酸酶的活性测定

单位酶活定义:1 min 内将肌酸水解产生 1 μmol 尿素所需要的酶量[15]。

试剂配制:0. 1 mol/L 肌酸溶液(以 50 mmol/L 磷酸缓冲液,新鲜配制);对-二甲氨基苯甲醛溶液(溶 2 g 对-二甲氨基苯甲醛于 100 mL 二甲基亚砜中,然后加浓盐酸 15 mL)。

测定方法:在试管中加入 0.9 mL 肌酸溶液,室

温平衡 5 min 后加入 0.1 mL 待测酶液，在 37 ℃反应 10 min,然后向反应体系中加入 2 mL 对-二甲氨基苯甲醛溶液终止反应,并置于 25 ℃温育 20 min,在 435 nm 处测定吸光度值[16]。

1.6 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

用最优方案对肌酸酶进行肌酸酶的 poly-lysine 修饰，用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）对游离酶与修饰酶进行分析，推测 poly-lysine 对肌酸酶的修饰程度。

1.7 差示扫描量热分析(DSC)

利用 TA 的 Nano DSC 差示扫面量热仪研究游离肌酸酶及修饰酶的热稳定性。取一定量的游离酶和修饰酶,使用磷酸缓冲液为基线,温度扫描范围为 20~90 ℃,升温速率为 1 ℃/min。

1.8 动力学参数测定

用 pH 7.5 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液配制浓度分别为 10~100 mmol/L 的肌酸溶液，于 37 ℃反应 10 min，测定游离酶和修饰酶在不同肌酸浓度时初始活力,得到反应速度 V。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,以 1/[S]为横坐标,1/V 为纵坐标作图,分别计算酶游离酶与修饰酶的 Km 与 k_{cat} 值。

1.9 稳定性分析

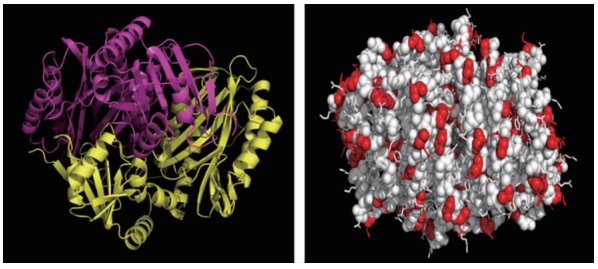
将游离酶溶液和修饰酶置于 50 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)中,在不同的温度(25、30、35、40、45 和 50 ℃)下放置 30 min,测定游离酶和修饰酶酶活力,以酶活力最高值为 100%计算相对活性,确定酶的热稳定性。

将游离酶溶液和固定化酶置于不同 pH 值的缓冲溶液(pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)中,25 ℃放置 16 h,测定游离酶和修饰酶酶活力,以酶活力最高值为 100%计算相对活性,确定酶的 pH 稳定性。

2 结果与讨论

2.1 肌酸酶分子表面酸性氨基酸分析

多聚赖氨酸的共价修饰取决于酶表面的酸性氨基酸的个数，根据肌酸酶的氨基酸序列及结构（PDB ID:1CHM）分析,*Pseudomonas putida* 来源肌酸酶含有 108 个酸性氨基酸，其中 76 个酸性氨基酸位于酶分子的表面，且侧链官能团暴露于酶表面,可以参与酶分子表面 poly-lysine 的修饰。



(a) (b)

a.肌酸酶的三维结构,两个不同颜色代表两个亚基;b.肌酸酶表面酸性氨基酸分析,红色代表酸性氨基酸,圆球状表示氨基酸主链,棒状表示氨基酸侧链。

图 1 肌酸酶结构分析

Fig. 1 Structure analysis of creatinase

多聚赖氨酸修饰肌酸酶酶分子的途径见图 2。首先采用 EDC 活化肌酸酶分子表面羧基生成 EDC-羧酸中间体，该中间体与 poly-lysine 中游离的氨基相互作用形成共价键[17]。poly-lysine 在肌酸酶表面形成共价修饰,以增强肌酸酶的稳定性。

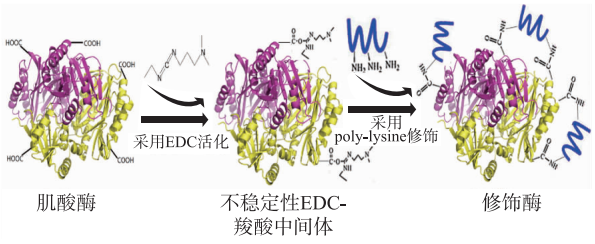


图 2 poly-lysine 表面修饰肌酸酶示意图

Fig. 2 Modification of creatinase with poly-lysine

由于交联类型不同,EDC 活化肌酸酶后可以产生不同的交联结构。poly-lysine 分别在单个亚基上形成共价修饰;poly-lysine 覆盖跨越两个亚基,使两个亚基紧密结合在一起;酶分子间交联。EDC 是一种异型双功能试剂,可能引起酶分子内或分子间的交联,也会引起 poly-lysine 分子间的交联[18]。

2.2 多聚赖氨酸修饰肌酸酶的条件优化

化学修饰反应过程中，酶与修饰剂的比例、活化反应、修饰反应的 pH 等均会影响修饰程度和修饰酶的性质。正交试验中有两个考察指标,它们是修饰酶的相对酶活力和修饰酶在 37 ℃放置 48 h 后的酶活力保留率。根据综合平衡法,先分别考察每个因素对各指标的影响,然后进行分析比较,确定出最好的水平。

修饰剂用量会影响酶的修饰率和修饰酶的性质。修饰剂用量越大,酶分子的修饰程度也越高。另

一方面,酶表面偶联的大分子修饰剂会产生空间位阻效应,使底物不易与酶活性中心相互作用而使酶活性下降[19]。从表 2 可知,对两个指标来说,修饰剂用量是较次要的因素,对相对酶活力来讲,取 A2 水平为最好,A3 水平也不差,对酶活力保留率来讲,取 A3 水平为最好,综合考虑修饰剂用量取 A3 为最好,即 CRE-COOH 与 poly-lysine-NH_2 的摩尔比为 1:100。

表 2　正交试验结果

Table 2　Orthogonal test results

试验号		试验因素				相对酶活力/%	酶活力保留率/%
		A	*B*	*C*	空列		
1		1	1	1	1	73.47	9.14
2		1	2	2	2	84.70	30.34
3		1	3	3	3	81.03	30.19
4		2	1	2	3	86.48	29.53
5		2	2	3	1	88.66	31.99
6		2	3	1	2	77.48	72.89
7		3	1	3	2	90.86	30.65
8		3	2	1	3	77.28	40.10
9		3	3	2	1	80.53	75.18
相对酶活/%	K_1	239.21	250.82	228.23	242.26	优方案:$A_2B_2C_3$	
	K_2	252.62	250.63	251.71	253.03		
	K_3	248.66	239.04	260.55	244.80		
	$\overline{K}_1$	79.74	83.61	76.08	80.89		
	$\overline{K}_2$	84.21	83.54	83.90	84.34		
	$\overline{K}_3$	82.89	79.68	86.85	81.60		
	极差 *R*	4.47	3.93	10.77	3.46		
	因素主次顺序	*C*>*A*>*B*					
酶活保留率/%	K_1	69.67	69.33	157.21	116.31	优方案:$A_3B_3C_1$	
	K_2	134.41	102.43	135.05	133.89		
	K_3	145.94	178.26	92.83	99.82		
	$\overline{K}_1$	23.22	23.11	52.40	38.77		
	$\overline{K}_2$	44.80	34.14	45.02	44.63		
	$\overline{K}_3$	48.65	59.42	30.94	33.27		
	极差 *R*	25.42	36.31	21.46	11.35		
	因素主次顺序	*B*>*A*>*C*					

EDC 可以与肌酸酶分子表面的羧基反应生成具有氨基反应活性的中间体,该中间体可以迅速与多聚赖氨酸中的游离氨基反应形成稳定的交联产物,但该中间体在水溶液中是不稳定的,若不能及时与氨基反应,则会分解为原来的羧基[20]。对于酶表面羧基与 EDC 摩尔比,从相对酶活力来看,其影响力最小,取 B1 水平为最好,推测是由于高浓度的 EDC 会造成其在肌酸酶分子内部堆积,抑制酶活性位点与底物的结合,造成酶活力下降。从酶活力保留率来看,其极差最大,表明其对修饰酶的性质影响最大,取 B3 水平为最好。综合 EDC 用量取 B3 水平为最好,即 CRE-COOH 与 EDC 的摩尔比为 1:10。

pH 决定了酶蛋白中反应基团的解离状态,设置不同的 pH 值,可以控制基团的解离程度,从而有利于修饰的专一性。pH 值过低会造成酶活性损失,若 pH 值过高,在酶分子修饰过程中,不利于 EDC 活化肌酸酶表面的羧基,并且形成的中间体易发生水解反应[21]。对两个指标综合考虑,pH 值取 C2 为最

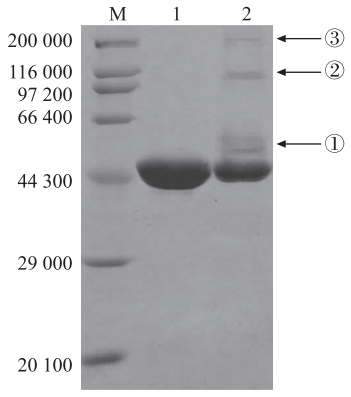
好,即最适反应 pH 为 7.0。

综合分析优化条件,CRE-COOH:poly-lysine-NH_2 取 1:100,CRE-COOH:EDC 取 1:10,pH 为 7.0。

2.3 修饰酶的 SDS-PAGE 鉴定

用十二烷基硫酸钠(SDS)将蛋白质变性,在变性条件下,生物分子以变性的单体或亚基多肽-SDS 复合体存在,单体或亚基多肽的分子质量差异造成了不同的迁移率。

如图 3,游离肌酸酶在 SDS-PAGE 中表现出单一条带,单亚基相对分子质量为 47 000,而修饰酶泳道出现多条带,相对分子质量最小的条带似乎略高于游离酶单亚基的位置,而高位条带的相对分子质量甚至出现倍乘的现象。说明肌酸酶表面的羧基不同程度的与 poly-lysine 共价结合,形成稳定的交联产物。



M:蛋白质 Marker;1:游离酶;2:修饰酶。①呈弥散状,推测为多个 poly-lysine 分别在单个亚基上不同程度的形成共价修饰;②推测为 poly-lysine 覆盖跨越两个亚基,使两个亚基紧密结合在一起,也可能是 EDC 引起的肌酸酶亚基间交联;③推测为肌酸酶分子间的交联

图 3 肌酸酶修饰的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of creatinase modified

2.4 修饰酶与游离酶酶学性质的比较

经修饰后酶的比酶活、K_m、k_{cat} 与 k_{cat}/K_m 均减小。K_m 值的减小可能是由于底物肌氨酸与两性离子型聚合物(poly-lysine)之间的相互作用,在底物结合区域维持较高的局部底物浓度,使得修饰酶与底物肌酸之间的亲和力得到加强;但也可能会造成酶分子柔性的降低及底物扩散阻力增加,使得修饰酶 k_{cat} 减小。修饰后的 k_{cat}/K_m 值减小,说明修饰后催化效率有所下降,导致比酶活降低,见表 3。

表 3 修饰酶与游离酶的动力学参数比较

Table 3 Kinetic parameters parameters of the free and modified creatinase

分类	比酶活/(U/mg)	K_m/(mol/L)	k_{cat}/S^{-1}	k_{cat}/K_m (mol/(L·S))
游离酶	15.92	6.25×10^{-2}	4.35×10^{2}	6.96×10^{3}
修饰酶	11.34	4.75×10^{-2}	2.50×10^{2}	5.26×10^{3}

2.5 修饰酶与游离酶的稳定性比较

差式扫描量热法(DSC)一种热分析方法,可以测定蛋白质分子的半解折叠温度(T_m),分析其结构稳定性,以推测肌酸酶修饰后稳定性是否增加。结果表明,游离酶和修饰酶的热变性温度 T_m 分别为 48.84 ℃和 50.91 ℃,相同的升温速率,修饰酶比游离酶的 T_m 值高了 2.07 ℃。

肌酸酶经 poly-lysine 修饰前后热稳定性的变化见图 4(a)。游离酶在 35~45 ℃的环境下酶活随着温度的升高而迅速降低,在 40 ℃时酶活已下降为 30%以下,而修饰酶在 40 ℃处理 30 min,酶活保留率仍在 50%以上。肌酸酶经修饰后热稳定性明显提高。修饰后 pH 稳定性也有了明显的提高,见图 4(b)。在 pH 值为 4.0 和 10.0 时,修饰酶酶活力仍保留在 50%以上,而游离酶几乎没有活性。

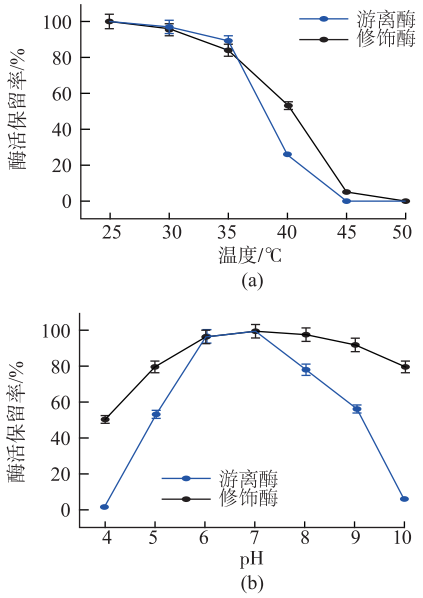


图 4 游离酶与修饰酶的热稳定性与 pH 稳定性分析

Fig. 4 Thermal and pH stabilities of free and modified enzyme

推测 poly-lysine 修饰后,在肌酸酶酶表面形成“分子捆绑”作用,在一定程度上增强亚基间相互作

用,多聚赖氨酸在单亚基表面形成覆盖层,也可使得单亚基构象次级链得到保护,从而抵御不良环境对酶的破坏,提高酶的稳定性。

3 结 语

Pseudomonas putida 肌酸酶为含两个相同亚基的同源二聚体,采用相对分子质量 4 000 左右的 poly-lysine 对肌酸酶进行表面修饰,发现修饰酶的热稳定性、pH 稳定性均有不同程度的提高。SDS-PAGE 电泳检测发现,poly-lysine 分子捆绑后还出现了具倍乘关系的高相对分子质量肌酸酶聚合物的出现,可在进一步的研究中对其他修饰条件进行优化,例如调整 poly-lysine 的长度,肌酸酶的浓度等。本研究提供了一种新的提高肌酸酶稳定性的方法,并且也为其他多亚基酶的稳定性改造提供了一条可行的途径。

参考文献:

[1] HONG M C,CHANG J C,WU M L,et al. Expression and export of *Pseudomonas putida* NTU-8 creatinase by *Escherichia coli* using the chitinase signal sequence of *Aeromonas hydrophila*[J]. **Biochemical Genetics**, 1998, 36(11-12):407-415.

[2] WANG Y Y,MA X H,ZHAO W F,et al. Study on the creatinase from *Paracoccus* sp strain WB1[J]. **Process Biochemistry**,2006, 41(9):2072-2077.

[3] YOSHIMOTO T,OKA I,TSURU D. Creatine amidinohydrolase of *Pseudomonas putida*:crystallization and some properties[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,1976,177(2):508-515.

[4] SUZUKI K,SAGAI H,SUGIYAMA M,et al. Molecular cloning and high expression of the *Bacillus creatinase* gene in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**,1993,76(2):77-81.

[5] PADMANABHAN B,PAEHLER A,HORIKOSHI M. Structure of creatine amidinohydrolase from *Actinobacillus*[J]. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**,2002,58:1322-1328.

[6] ZHI Q,KONG P Y,ZANG J T,et al. Biochemical and molecular characterization of a novel high activity creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* strain 02181[J]. **Process Biochemistry**,2009,44(4):460-465.

[7] YOSHIMOTO T,IMAO O,TSURU D. Purification,crystallization,and some properties of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonus putida*[J]. **Journal of Biochemistry**,1976,79(6):1381-1383.

[8] HOEFFKEN H W,KNOF S H,BARTLETT P A,et al. Crystal structure determination,refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*[J]. **Journal of Molecular Biology**,1988,204(2):417-433.

[9] COLL M,KNOF S H,OHGA Y,et al. Enzymatic mechanism of creatine amidinohydrolase as deduced from crystal structures[J]. **Journal of Molecular Biology**,1990,214(2):597-610.

[10] SCHUMANN J,MOLLERING H,JAENICKE R. Intrinsic stability and extrinsic stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida*[J]. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**,1993,374(7):427-434.

[11] SCHUMANN J,BOHM G,SCHUMACHER G,et al. Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis[J]. **Protein Science**,1993,2(10):1612-1620.

[12] BERBERICH J A,YANG L W,BAHAR I,et al. A stable three enzyme creatinine biosensor. 2. Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase[J]. **Acta Biomaterialia**,2005,1(2):183-191.

[13] LAD U,KHOKHAR S,KALE G M. Electrochemical creatinine biosensors[J]. **Analytical Chemistry**,2008,80(21):7910-7917.

[14] FERNANDEZ-LAFUENTE R. Stabilization of multimeric enzymes:Strategies to prevent subunit dissociation[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2009,45(6-7):405-418.

[15] DAI Jun,KANG Zhen,ZHANG Linpei,et al. Expression and application analysis of creatinase from *Arthrobacter nicotianae*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016(5):465-470.(in Chinese)

[16] DAI J,ZHANG L,KANG Z,et al. High-level production of creatine amidinohydrolase from *Arthrobacter nicotianae* 23710 in *Escherichia coli*[J]. **Applied Biochemisty Biotechnology**,2015,175(5):2564-2573.

[17] TONG Y,XIN Y,YANG H,et al. Efficient improvement on stability of sarcosine oxidase via poly-lysine modification on enzyme surface[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2014,67:140-146.

[18] LOPEZ-ALONSO J P,DIEZ-GARCIIA F,FONT J,et al. Carbodiimide EDC induces cross-links that stabilize RNase A C-dimer

against dissociation:EDC adducts can affect protein net charge,conformation,and activity[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2009,20(8):1459-1473.

[19] SWARNALATHA V,ALURI ESTHER R,DHAMODHARAN R. Immobilization of α-amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles,an easily recoverable and reusable support[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2013,96:6-13.

[20] 仝艳军. 肌氨酸氧化酶高效表达、亲和纯化及酶稳定性研究[D]. 无锡:江南大学,2015.

[21] KANG K,KAN C,YEUNG A,et al. The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) latex particles[J]. **Materials Science and Engineering:C**,2006,26(4):664-669.

科　技　信　息

澳新拟批准使用酶转化法生产甜菊醇糖苷

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,2019 年 8 月 27 日,澳新食品标准局发布 92-19 号通告,其中 A1176 号申请通过酶转化法方法生产甜菊醇糖苷(Steviol glycosides)。

据了解,本次申请由 PureCircle Limited 提出,该方法所使用的酶是由一种转基因大肠杆菌(Escherichia coli)菌株产生的。预计该申请将于 2019 年 9 月完成评估,公众评论期为 2019 年 9 月至 10 月底。2020 年 2 月初,此申请会得到全面批准,若无其他评审要求,预计 2020 年 4 月初份刊登在澳新公报上。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟评估硒酸钠作为饲料添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2019-8-29). http://news.foodmate.net/2019/08/532005.html