

玉米赤霉烯酮水解酶耐热性的分子改造

许中霞¹, 刘桂智¹, 刘卫东², 郭瑞庭², 李华钟^{*1}, 郑迎迎²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 内酯水解酶 ZHD101 对玉米赤霉烯酮降解效果显著, 是目前研究最广泛的玉米赤霉烯酮降解酶, 但由于热稳定性较低, 无法满足饲料生产制粒过程中的温度要求。作者利用理性设计和分子改造在其分子中引入二硫键, 以提高 ZHD101 的热稳定性。通过在分子引入七对半胱氨酸双突变 (A110C/P196C、S136C/R189C、D143C/P181C、S147C/P181C、D199C/A202C、L200C/A231C、R204C/G205C) 以形成潜在的二硫键, 研究其对热稳定性的影响。结果表明, 突变体 S136C/R189C 和 D143C/P181C 在 50 °C 加热处理 2 min 后的残余活性高于野生型, 其中突变体 D143C/P181C 的残余活性是野生型的 2 倍, 且室温下活力损失小于 10%。在此基础上设计四突变 (S136C/D143C/P181C/R189C), 热稳定性和活力并不优于双突变 D143C/P181C。本研究结果为提高 ZHD101 在饲料工业上的应用潜力打下了基础。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 内酯水解酶; 热稳定性; 二硫键

中图分类号: Q 936 文章编号: 1673-1689(2019)07-0071-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.010

Molecular Engineering of Mycoestrogen-Detoxifying Lactonase ZHD101 to Improve Enzyme Thermostability

XU Zhongxia¹, LIU Guizhi¹, LIU Weidong², GUO Ruiting², LI Huazhong^{*1}, ZHENG Yingying²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: Lactonase ZHD101 which can degrade ZEN effectively is being widely studied. However, its application in feed industry was limited by low thermostability. In this study, we attempted to improve the thermostability of ZHD101 through structure-based rational design and molecular engineering of disulfide bridges. Specifically, 7 mutants (A110C/P196C, S136C/R189C, D143C/P181C, S147C/P181C, D199C/A202C, L200C/A231C, and R204C/G205C) were constructed for disulfide bridge formation. Two mutants, S136C/R189C and D143C/P181C, showed enhanced thermostability. Notably, D143C/P181C mutant, which exhibits similar specific activity as wild type

收稿日期: 2016-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400678); 国家 863 计划项目(2012AA022209); 江苏省优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物育种和微生物制药方面的研究。

E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 许中霞, 刘桂智, 刘卫东, 等. 玉米赤霉烯酮水解酶耐热性的分子改造[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(07): 71-77.

enzyme, showed two-fold increase in thermostability after heated at 50 °C for 2 min. A quadruplet mutant (S136C/D143C/P181C/R189C) was subsequently constructed and examined, but it showed lower thermostability comparing to D143C/P181C mutant. This study provides significant benefit for the application of ZHD101 in further commercial utilizations.

Keywords: zearalenone, lactone hydrolase, thermostability, disulfide bridge

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一类由镰刀菌属真菌产生的类雌激素毒素,是目前全球污染最严重的三种霉菌毒素之一。ZEN 主要存在于玉米、小麦、大麦和黍等农作物及其制品中,能导致摄入者出现早熟、生殖周期紊乱等雌激素紊乱症,给种植业和养殖业带来巨大损失^[1-3]。ZEN 还具有强致癌性,能够引起乳腺癌、食管癌等疾病^[4-5]。为减轻霉菌毒素造成的饲料业和畜牧业的损失,人们陆续开发出多种物理、化学和生物学的方法来降解或吸附饲料中的霉菌毒素。化学法和物理法脱毒通常缺乏选择性,造成饲料中其它营养成分的破坏和流失。而生物酶法脱毒因其高选择性、脱毒彻底、操作简易,受到广泛关注。

Naoko Takahashi-Ando 等^[6]首次从粉红粘帚菌中分离出了一种可降解玉米赤霉烯酮的内酯水解酶 ZHD101。ZHD101 是目前研究最为广泛的玉米赤霉烯酮降解酶,其在大肠杆菌和酿酒酵母中的表达产物可以高效的降解 ZEN^[7],另外, zhd101 转基因水稻和转基因玉米的种子也可以有效降解 ZEN^[8-9],表明 ZHD101 具备良好的降解玉米赤霉烯酮的能力和巨大的应用前景。Takahashi-Ando 等^[10]通过对 ZHD101 的酶学性质表征,发现 ZHD101 的热稳定性较差,在 50 °C 下迅速失活。较低的热稳定性使其无法满足饲料工业中制粒工艺的温度需求,为促进 ZHD101 在饲料工业中的应用,需要通过分子改造等手段提高其热稳定性。

在结构中引入二硫键是提高酶的热稳定性的常用手段^[11-14],二硫键通过降低蛋白解折叠状态的主链熵值和降低解折叠速度来稳定蛋白结构^[15-16]。温度因子(temperature factor, B factor)是表征氨基酸残基摆动度的重要结构参数,温度因子越高,氨基酸所在部位的构象就越不稳定,相应的蛋白质热稳定性就越差。在温度因子高的蛋白质结构部位处引入二硫键,可以有效降低该部位的摆动度,从而提高蛋白质的热稳定性。

我们在前期研究中曾解析出 ZHD101 与底物 ZEN 的复合物分子结构^[17]。在此基础上,作者进行基于结构的理性设计和分子改造,在蛋白质结构中温度因子较高的部位引入二硫键以提高 ZHD101 的热稳定性。我们选择了 7 对残基进行半胱氨酸突变以形成潜在的二硫键,进而构建四突变考察对热稳定性的影响。最后,对热稳定性提高的突变体进行分析,分析二硫键形成的可能性和对稳定结构的分子基础。本研究将对 ZHD101 在饲料工业的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pET-46 EK/LIC-ZHD101: 由台湾大学生物科技研究所刘嘉睿教授课题组构建。

1.1.2 试剂 LB 培养基: 购自碧迪医疗器械(上海)有限公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶: 购自 Thermo Science 公司; Dpn I 酶: 购自 Fermentas 公司; 咪唑: 购自 Merck 公司; PCR 产物纯化试剂盒: 购自康维世纪生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 PCR 仪: 购自德国 Eppendorf 公司; AKTA purifier 纯化系统: 购自美国 GE 公司; 高效液相色谱仪: 购自安捷伦科技有限公司; Ultimate XB C18 Column: 购自月旭科技上海有限公司; BCA 试剂盒: 购自康维世纪生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 突变体构建 我们前期工作中解析了 ZHD101 的分子结构(PDB ID: 3wzm), 发现其结构中存在两处 B factor 明显较高的部位。我们在这两个区域中引入七对半胱氨酸双突变: A110C/P196C、S136C/R189C、D143C/P181C、S147C/P181C、D199C/A202C、L200C/A231C、R204C/G205C, 以形成潜在的二硫键, 研究其对热稳定性的影响。所采用的定点突变正向引物见表 1。

表1 本研究使用的引物
Table 1 Primers used in the study

引物	碱基序列(5'-3')
A110C	ggcgcttctacggttgcTGCttattactaggtatcct
S136C	aagtactggaccacttaTGCaatacagctgtactggaa
D143C	aatacagctgtactggaaTGCgaagagatctctaagatt
S147C	ctggaagacgaagagatcTGCgaagatttggcaaatgtg
P181C	agactacataaaaattacTGCgtctgggcaagaggttac
R189C	tgggcaagaggttaccctTGCactattccgccatctgct
P196C	actattccgccatctgctTGCgtaaaagacttggaaagcc
L200C	tctgctctgtaaaagacTGCgaagccttaagaggaaaa
A231C	attgtcactgcgactaaaTGCggggtgaatattggtta
D199C/ A202C	ccatctgctctgtaaaaTGCttggaaTGCttaagaggaaaaccattg
R204C/ G205C	aaagacttgaagccttaTGCTGCaaaccattggattggaca

定点突变采用 QuikChange 定点突变试剂盒进行。PCR 产物转化大肠感受态 DH5 α ,挑取单克隆送至华大基因测序。测序突变正确的克隆提取质粒转大肠表达菌株 BL21(DE3)中,进行后续表达实验。

1.2.2 ZHD101 突变体的表达与纯化 挑取单菌落于 5 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的小试管中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 4 h。菌体生长至 OD 600 值达 0.6~0.8 时,转接 1%至 100 mL 的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 6 h。转接 1%至 3 L 的 LB 大瓶,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 4 h,降温至 16 $^{\circ}$ C,加诱导剂 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导 24 h 后离心收集菌体。将诱导表达的菌体用 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、pH 7.5 的缓冲液重悬,经高压破碎机破碎,离心后的上清液为蛋白粗酶液。将粗酶液分别用 Ni-NTA 亲核层析柱和 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂进行纯化。纯化产物透析在 25 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、pH 7.5 的缓冲液中,并用 Amicon Ultra-10k 浓缩至 20 mg/mL 贮存。蛋白质浓度用 BCA 试剂盒测定表征。

1.2.3 ZHD101 野生型和突变体的活性与热稳定性的表征 ZHD101 活性测定方法由底物减少量来表征。每个反应体系(210 μ L)包含 5 μ L 底物(1 mg/mL ZEN)和 5 μ L 酶(0.25 mg/mL ZHD101,野生型或突变体),反应缓冲液为 150 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5。30 $^{\circ}$ C 反应 10 min 之后,加入 50 μ L 1 mol/L HCl 和 300 μ L 甲醇终止反应,产

物过滤后取 20 μ L 用于 HPLC 分析。样品被 60 %的乙腈以 0.6 mL/min 的流速洗脱下来,吸光度检测波长为 254 nm。根据峰面积计算底物的减少量。

野生型蛋白分别在 45、55、65、75、85 $^{\circ}$ C 下加热处理 1、2、10 min。热处理后的蛋白质进行活性测定以表征其热稳定性。突变体蛋白质在 55 $^{\circ}$ C 下热处理 2 min 后,测残余活性表征热稳定性。

2 结果与讨论

2.1 ZHD101 热稳定性

将 ZHD101 蛋白质分别经过 45、55、65、75、85 $^{\circ}$ C 加热处理 1、2、10 min,测定残余酶活性,见图 1。ZHD101 在 45 $^{\circ}$ C 热处理 1、2 min 后,残余活性仍保持在 90%以上;热处理 10 min 后,残余活性至少能保留 70%。但是经过 55 $^{\circ}$ C 热处理 1 min 后活性直接下降到 30%。65、75、85 $^{\circ}$ C 热处理 1 min 后,残余活性直接降到 20%以下。说明 ZHD101 热稳定性较差,难以耐受饲料生产制粒过程中的温度要求,需要通过分子改造的方法提高其热稳定性。

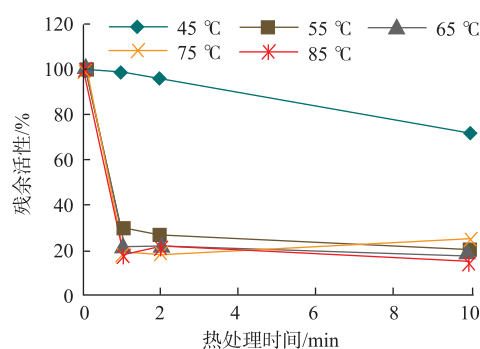


图1 ZHD101 的热稳定性

Fig. 1 Thermostability of ZHD101

2.2 突变位点的选择

通过对 ZHD101 的分子结构(PDB ID:3wzm)的分析,发现其结构中存在两处 B factor 明显较高的部位(图 2(a))。B factor 是表征氨基酸残基的热不稳定状态和自由活动程度的重要参数,B factor 高说明该残基的活动度可能较高,B factor 平均值高的区域往往具有更弹性的状态和较低的热稳定性^[18]。因此,在 B factor 较高即弹性较高的区域引入二硫键应能起到稳定局部结构的作用,从而提高酶的热稳定性^[19-21]。基于上述普适原则,人们已开发相应的程序,根据 B factor 的高低更好的推测引入二硫键的

位置以有效提高蛋白质的热稳定性^[22]。在本研究中,我们将 ZHD101 分子结构在 Pymol 软件中根据 B factor 的大小直观的显示,在其中 B factor 较高的区域中引入七对二硫键(图 2(b)),研究其对热稳定性的影响。

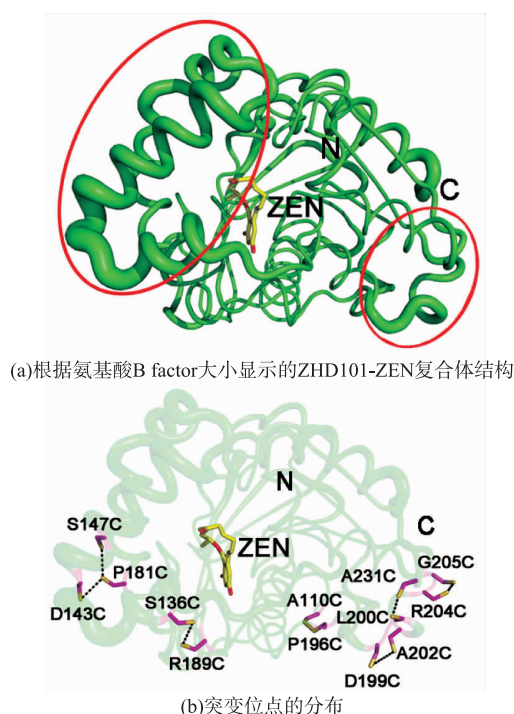
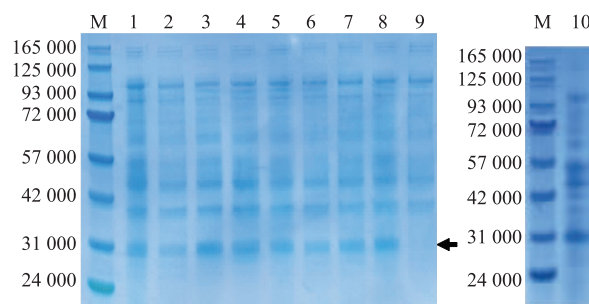


图 2 ZHD101-ZEN 复合体的结构和突变位点的选择
Fig. 2 Complex structure of ZHD101 with the substrate ZEN and the mutation sites distribution

2.3 ZHD101 突变体的表达与纯化

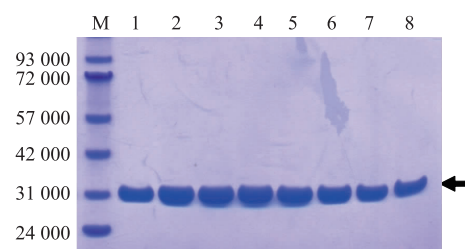
含突变质粒 pET46-zhd101-mutants 的菌液经 IPTG 诱导后,离心收集上清液,高压破碎后离心制备总蛋白质,采用 SDS-PAGE 分析,结果见图 3。IPTG 诱导 24 h 后,在相对分子质量 28 700 附近有明显的诱导条带,大小与目的片段相符,表明突变体蛋白获得成功表达。

突变重组酶经过 Ni 亲和层析和 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂进行两步纯化并透析除盐后,对纯化样品进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 4。纯化的蛋白质在 28 700 附近处显示为单一条带,与目的蛋白质相对分子质量大小相符,经活性测试验证为目的蛋白质,可用于后续酶学性质分析。



M:蛋白质相对分子质量标准;1-8:ZHD101 突变体的诱导表达 (分别为 A110C/P196C、S136C/R189C、D143C/P181C、S147C/P181C、D199C/A202C、L200C/A231C、R204C/G205C、S136C/D143C/P181C/R189C);9:pET-46 空载体的诱导表达;10:ZHD101 野生型诱导表达

图 3 ZHD101 突变体表达的电泳图
Fig. 3 Expression of ZHD101 mutants



M:蛋白质相对分子质量标准;1-8:ZHD101 突变体纯化的蛋白 (分别为 A110C/P196C、S136C/R189C、D143C/P181C、S147C/P181C、D199C/A202C、L200C/A231C、R204C/G205C、S136C/D143C/P181C/R189C)

图 4 ZHD101-mutants 纯化电泳图

Fig. 4 Purification and the SDS-PAGE analysis of ZHD101-mutants

2.4 突变体的活性和耐热性表征

突变体蛋白纯化后稀释至 0.25 mg/mL,进行活性和耐热性的测定,结果见图 5(a)。D143C/P181C、S147C/P181C、L200C/A231C 三个突变体的活性均为 WT 的 90% 以上;另外三个突变体 A110C/P196C、D199C/A202C、R204C/G205C 的活性仅为 WT 的 70% 以上;而突变体 S136C/R189C 的活力只有 WT 的 50% 左右。50 °C 加处理 2 min 后,突变体 R204C/G205C 和 L200C/A231C 的残余活性和野生型一致;突变体 D199C/A202C、S147C/P181C 和 A110C/P196C 的残余活性低于野生型,其中突变体 A110C/P196C 的残余活性最低。而突变体 S136C/R189C 和 D143C/P181C 的残余活性高于野生型,其中突变 D143C/P181C 的残余活性是野生型的两倍

左右。在此基础上,我们设计了四突变 S136C/D143C/P181C/R189C,活性测试结果见图 5(b)。该突变体的活力为野生型的 75%,而 50 °C 加热处理 2 min 后的残余活性大约为野生型活性的两倍,即相对于双突变 D143C/P181C,活性降低,热稳定性没有明显的改善。

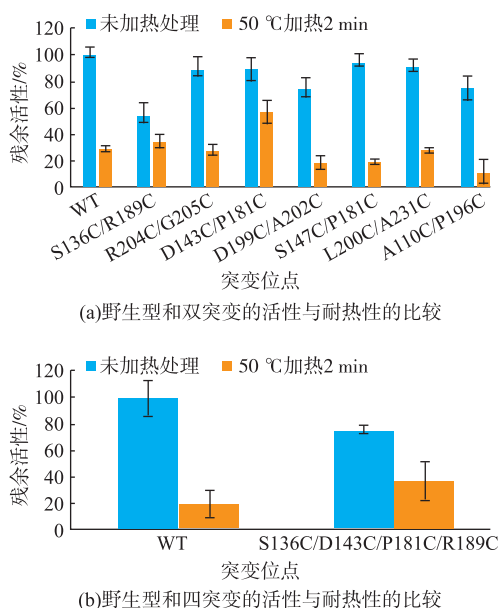


图 5 突变体和野生型的活性和耐热性比较

Fig. 5 Thermostability and activity comparison of the wide type and mutants

2.5 热稳定性提高的突变体形成二硫键的潜力分析

已知二硫键的 χ_3 扭转角呈双相分布,集中在 -80° 和 $+100^\circ$ 两个区域,而形成二硫键的能量一般在 $0\sim 4.5$ kcal/mol 范围内,均值为 1.07 kcal/mol。经过 Disulfide by Design 软件分析,突变体 D143C/P181C 的两个半胱氨酸位点形成潜在二硫键的 χ_3 扭转角和能量均符合要求,见表 2,说明突变体在该位置有较大可能形成二硫键。而 S136C/R189C 两个半胱氨酸形成二硫键的 χ_3 扭转角和能量不在上述范围内,表明形成二硫键的稳定性可能较低。

表 2 突变体形成潜在的二硫键的扭转角和能量

Table 2 Estimated χ_3 torsion angle and an energy value of the mutation

二硫键	$\chi_3/^\circ$	能量/(kcal/mol)
D143C/P181C (A 链)	+128.95	3.28
D143C/P181C (B 链)	+96.41	0.36
已知二硫键平均值 *	$-80/+100$	1.07

* 数据来自 Disulfide by Design 软件用户手册。

2.6 突变体热稳定性提高的结构基础

通过对突变体 D143C/P181C 的结构分析,发现 D143C 存在于 α_1 和 α_2 之间的 loop 环上,P181C 存在于 α_3 的中间位置,二者形成的二硫键稳定了分子结构中 B factor 最高的这三个 α 螺旋,见图 6。且 α_3 螺旋中存在对酶活性起关键作用的重要氨基酸 W183,W183 通过与底物 ZEN 形成的氢键和堆叠作用稳定底物,该氨基酸的突变将使 ZHD101 完全失活^[6]。因此,在此处引入二硫键,对稳定这三个 α 螺旋的位置、减少摆动、同时固定关键氨基酸 W183 的位置,均起重要的作用。因此,此处引入的二硫键能有效提高酶的热稳定性。同时,D143C/P181C 二硫键的位置远离底物结合中心和催化三联体,对活性的影响很小。

另外,R189C/S136C 双突变也增加了 ZHD101 的热稳定性。由图 6 可知,该处的二硫键同样可能是由于稳定了 α_1 螺旋而增加结构的热稳定性。由于该处的二硫键仅稳定了一个 α_1 螺旋,因此相对于 D143C/P181C 来说,热稳定性提高的程度略低。而四突变将上述两个二突变组合起来,R189C/S136C 对 α_1 螺旋的稳定作用被 D143C/P181C 对 $\alpha_1\sim\alpha_3$ 三个螺旋的稳定作用所覆盖,因此四突变对热稳定性的贡献并不优于 D143C/P181C 双突变。

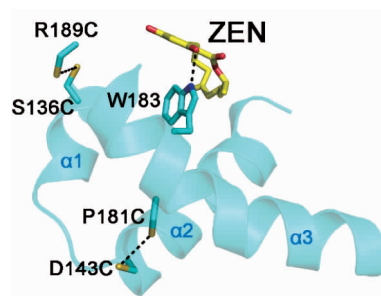


图 6 两个热稳定性提高的双突变在分子结构中的位置

Fig. 6 Location of D143C/P181C and R189C/S136C double-mutations in ZHD101 structure

3 结语

通过对蛋白质分子结构的分析,利用定点突变在结构中摆动度较大的位置引入半胱氨酸以形成潜在的二硫键,成功提高了内酯水解酶 ZHD101 的热稳定性。经过 Disulfide by Design 软件分析,证明其中引入的一对半胱氨酸符合形成二硫键的条件。进一步分析了两处二硫键提高 ZHD101 热稳定性的

分子基础。本研究为酶的热稳定性改造提供了新的思路,同时为促进霉菌毒素降解酶 ZHD101 在饲料工业的应用打下了基础。

参考文献:

- [1] KORDIC B, PRIBICEVIC S, MUNTANOLA C M, et al. Experimental study of the effects of known quantities of zearalenone on swine reproduction[J]. **Environ Pathol Toxicol Oncol**, 1992, 11(2): 53-55.
- [2] KIM I H, SON H Y, CHO S W, et al. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats[J]. **Toxicol Lett**, 2003, 138(3): 185-192.
- [3] CHEN J C, WILEY A A, KAUFFOLD J, et al. Perinatal zearalenone exposure affects RXFP1, RXFP2, and morphoregulatory gene expression in the neonatal porcine uterus[J]. **Ann Ny Acad Sci**, 2009, 1160: 188-189.
- [4] HILAKIVI C L, ONOJAFE I, RAYGADA M, et al. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis[J]. **Brit J Cancer**, 1999, 80(11): 1682-1688.
- [5] AHAMED S, FOSTER J S, BUKOVSKY A, et al. Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells[J]. **Mol Carcinogen**, 2001, 30(2): 88-98.
- [6] TAKAHASHI A N, KIMURA M, KAKEYA H, et al. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning[J]. **Biochem J**, 2002, 365: 1-6.
- [7] TAKAHASHI A N, TOKAI T, HAMAMOTO H, et al. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005(67): 838-844.
- [8] HIGA N A, TAKAHASHI A N, SHIMIZU T, et al. A model transgenic cereal plant with detoxification activity for the estrogenic mycotoxin zearalenone[J]. **Transgenic Research**, 2005(14): 713-717.
- [9] IGAWA T, TAKAHASHI A N, OCHIAI N, et al. Reduced contamination by the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007(73): 1622-1629.
- [10] TAKAHASHI A N, OHSATO S, SHIBATA T, et al. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004(70): 3239-3245.
- [11] VOUTILAINEN S P, BOER H, ALAPURANEN M, et al. Improving the thermostability and activity of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B[J]. **Appl Microbiol Biot**, 2009, 83(2): 261-272.
- [12] QUANG A T L, JOO J C, YOO Y J, et al. Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012, 109(4): 867-876.
- [13] JEONG M Y, KIM S, YUN C W, et al. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236[J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 127(2): 300-309.
- [14] LIU Zhongmei, DU Kun, ZHOU Zhemin. Enhancement of the thermostability of transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* by engineering a disulfide bond[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(10): 1057-1061. (in Chinese)
- [15] MANSFELD J, VRIEND G, DIJKSTRA B W, et al. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond[J]. **J Biol Chem**, 1997, 272(17): 11152-11156.
- [16] CLARKE J, FERSHT A R. Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase - increasing the stability of proteins against the rate of denaturation[J]. **Biochemistry**, 1993, 32(16): 4322-4329.
- [17] PENG W, KO T P, YANG Y Y, et al. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*[J]. **Rsc Advances**, 2014, 4(107): 62321-62325.
- [18] CHEN C C, LUO H Y, HAN X, et al. Structural perspectives of an engineered beta-1,4-xylanase with enhanced enhanced thermostability[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014(189): 175-182.
- [19] LE Q A T, JOO J C, YOO Y J, et al. Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012, 109(4): 867-76.

- [20] YU X W, TAN N J, XIAO R, et al. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase; increased thermostability and altered acyl chain length specificity[J]. **Plos One**, 2012, 7(10).
- [21] CRAIG D B, DOMBKOWSKI A A. Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins [J]. **Bmc Bioinformatics**, 2013(14).
- [22] MELNIK B S, POVARNISYNA T V, GLUKHOV A S, et al. SS-stabilizing proteins rationally: intrinsic disorder-based design of stabilizing disulphide bridges in GFP[J]. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2012, 29(4): 815-824.

科技信息

欧盟批准 8-巯基马来酮和 1-对孟烯-8-硫醇作为饲料添加剂

据欧盟官方公报消息,2019 年 6 月 3 日,欧盟委员会发布法规(EU)2019/900 号条例,根据欧洲议会和理事会法规(EC) No 1831/2003,批准 8-巯基马来酮(8-mercapto-p-menthan-3-one)和 1-对孟烯-8-硫醇(p-Menth-1-ene-8-thiol)作为动物饲料添加剂用于所有动物物种。

根据附件中规定的条件,这两种添加剂被授权作为动物营养添加剂。添加剂所属添加剂类别为“感官添加剂”,功能组别为“调味化合物”,授权结束日期为 2029 年 6 月 23 日。本条例自发布之日起第二十天生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准 8-巯基马来酮和 1-对孟烯-8-硫醇作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2019-7-7). <http://news.foodmate.net/2019/06/521414.html>