

克雷伯杆菌O852产 $trans$ -二氢香芹酮关键酶系提取工艺及酶学特性分析

王苗苗¹, 李志¹, 杨金初², 任婧楠¹, 范刚^{1*}, 黄林华³, 李贵节³, 程玉娇³, 王秋领², 杨永锋², 黄珍珍²,
徐永明², 李浩亮², 付瑜锋², 丁美宙², 于爱群⁴, 冯剑⁵

(1. 华中农业大学食品科技学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070) (2. 河南中烟工业有限责任公司技术中心, 河南郑州 450000) (3. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712) (4. 天津科技大学生物工程学院省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457) (5. 河南金瑞香精香料有限公司, 河南郑州 450000)

摘要: $Trans$ -二氢香芹酮广泛应用于香精香料、医药、农业等领域, 具有高经济价值。为了利用克雷伯杆菌 O852 进行柠檬烯的生物转化生产 $trans$ -二氢香芹酮, 该实验对克雷伯杆菌 O852 产 $trans$ -二氢香芹酮关键酶体系的提取工艺及酶学特性进行分析。研究通过单因素实验和响应面分析确定了细胞破碎的最佳条件, 进一步分析金属离子、有机溶剂和抑制剂对酶活的影响, 并测定酶的最适温度和 pH 值。研究发现, 最佳的提取条件: 超声时间 21 min、料液比 1:13、振幅 36%。 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 显著提升酶的活性, 而 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 则表现出强烈的抑制效果。使用 1% (V/V) 的二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) 和异丙醇时, 酶活性分别提升至 121.64% 和 142.62%, 然而, 当增至 5% (V/V) 时, 有机溶剂对酶活性的抑制作用增强, 尤其是氯仿, 其抑制效果最为显著。对于抑制剂的影响, 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) 对酶活性的抑制最显著, 其他抑制剂也表现出一定的抑制效果。此外, 研究得出酶的最适温度 20 °C, 最适 pH 值 9.0。结果为该酶体系的工业化应用提供了理论依据和技术支持。

关键词: 克雷伯杆菌; $trans$ -二氢香芹酮; 提取工艺; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2026)03-106-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1804

Extraction Process and Characterization of $Trans$ -dihydrocarvone Key Enzyme System from *Klebsiella* sp. O852

WANG Miaomiao¹, LI Zhi¹, YANG Jinchu², REN Jingnan¹, FAN Gang^{1*}, HUANG Linhua³, LI Guijie³,
CHENG Yujiao³, WANG Qiuling², YANG Yongfeng², HUANG Zhenzhen², XU Yongming², LI Haoliang²,
FU Yufeng², DING Meizhou², YU Aiqun⁴, FENG Jian⁵

(1. Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China) (2. Technology Center, China Tobacco Henan Industrial Co. Ltd., Zhengzhou 450000, China) (3. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China) (4. State Key

引文格式:

王苗苗, 李志, 杨金初, 等. 克雷伯杆菌 O852 产 $trans$ -二氢香芹酮关键酶系提取工艺及酶学特性分析[J]. 现代食品科技, 2026, 42(3): 106-115.

SWANG Miaomiao, LI Zhi, YANG Jinchu, et al. Extraction process and characterization of $trans$ -dihydrocarvone key enzyme system from *Klebsiella* sp. O852 [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 106-115.

收稿日期: 2024-12-03; 修回日期: 2025-04-10; 接受日期: 2025-04-14

基金项目: 河南中烟工业有限责任公司科技项目计划 (AW2024033); 湖北省科技创新人才计划项目 (2023DJC116; 2024DJC029); 云南省科技计划项目 (202304BT090030)

作者简介: 王苗苗 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工技术理论, E-mail: 3206531081@qq.com

通讯作者: 范刚 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

Laboratory of Food Nutrition and Safety (Co-constructed by Province and Ministry), College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)(5.Henan Jinrui Flavoring and Essence Co. Ltd., Zhengzhou 450000, China)

Abstract: *Trans*-dihydrocarvone is widely used in flavoring, pharmaceuticals, agriculture, and other fields, and possesses high economic value. To enhance production of *trans*-dihydrocarvone through limonene biotransformation using *Klebsiella* sp. O852, we analyzed its extraction process and functionally characterized the key enzymes involved in *trans*-dihydrocarvone production by *Klebsiella* sp. O852. The optimal conditions for cell fragmentation were determined by single-factor experiments and response surface analysis. Effects of metal ions, organic solvents, and inhibitors on enzyme activity were analyzed, and optimal temperature and pH values for enzyme activity were determined. Optimal extraction conditions were as follows: ultrasonication time of 21 min, material-to-liquid ratio of 1:13, and amplitude of 36%. Ferrous, manganese (II), and zinc ions significantly increased enzyme activity, while copper (II) and ferric (III) iron exerted strong inhibitory effects. One percent (*V/V*) of dimethyl sulfoxide (DMSO) and isopropyl alcohol increased enzyme activity to 121.64% and 142.62%, respectively. When organic solvent concentrations were increased to 5% (*V/V*), they exerted enhanced inhibitory effects on enzyme activity. Chloroform exhibited the most significant inhibitory effect. Among the tested inhibitors, EDTA exhibited the most significant inhibitory effect on enzyme activity. The optimum temperature for enzyme activity was 20 °C and the optimum pH was 9.0. These results provide a theoretical basis and technical support for industrial application of this enzyme system.

Key words: *Klebsiella* sp; *trans*-dihydrocarvone; extraction technology; enzymatic properties

二氢香芹酮, 其化学式为 $C_{10}H_{16}O$, 分子量为 152.23^[1], 主要存在于葛缕子和莳萝种子油中, 散发着草本和留兰香般的气味^[2]。尤其是莳萝, 除天然提取外, 还可以通过还原香芹酮和氧化柠檬烯^[3]得到二氢香芹酮。目前, 已有大量文献报道了莳萝精油中二氢香芹酮的含量及功能性质。例如, 王花俊等^[4]对莳萝籽中的挥发性物质进行了分析, 共鉴定得到 29 种香气成分, 其中二氢香芹酮相对含量约为 5.3%; Al-sheddi 等^[5]研究了二氢香芹酮对人肝癌细胞的毒性作用, 发现其可以降低人肝癌细胞的细胞活力并抑制其生长, 阻滞细胞周期并最终诱导细胞的凋亡, 是一种潜在的抗癌药物。不同的地理位置、季节性变化、遗传变异、生长条件以及提取方法上的差异等因素都影响二氢香芹酮的含量^[5]。

在实验前期工作中, 从腐烂的甘南脐橙中筛选出了一株克雷伯杆菌 (*Klebsiella* sp.), 并被命名为克雷伯杆菌 O852。克雷伯杆菌是一种革兰氏阴性菌, 无芽孢和鞭毛, 有较厚的荚膜和明显的菌毛, 菌落呈现灰白色粘液状。该菌种不仅能够以柠檬烯为唯一碳源和能量源生长, 还能将柠檬烯转化为二氢香芹醇、 β -松油醇和柠檬烯-1,2-环氧产物。由先前研究可知此酶系为胞内酶, 可能是由柠檬烯-6-羟化酶、香芹醇脱氢酶和烯还原酶等酶的协同作用, 完成了从柠檬烯到 *trans*-二氢香芹酮的生物转化过程^[6]。这一发现为利用微生物转化法生产二氢香芹酮提供了新的可能性。克雷伯杆菌作为生产 1,3-丙二醇和 2,3-丁二醇及其衍生

物的工业菌株已被广泛报道^[7,8], 但在天然香料和香料领域的研究很少。

为了深入研究克雷伯杆菌 O852 中转化柠檬烯生成 *trans*-二氢香芹酮的关键酶系, 必须先提取该酶系。细胞破碎是提取胞内酶的关键步骤, 常见的方法包括机械破碎和非机械破碎。机械破碎方法通过剪切力 (如珠磨)、流体动力 (如高压均质) 或能量场 (如超声) 破坏细胞, 具有高效、广谱适用性, 且其标准化设备适配实验室与工业场景^[9]。在该研究中, 本文采用超声波法对克雷伯杆菌 O852 进行细胞破碎, 以提取关键酶系, 并通过响应面法优化提取工艺参数, 以期获得高活性的酶液。此外, 还对提取的酶系进行了酶学特性分析, 以了解其在不同条件下的稳定性和活性, 为后续的工业化应用提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

克雷伯杆菌 O852 (*Klebsiella* sp. O852), 为实验室保藏菌株, 保藏号为 CCTCC NO:M2020509。由先前实验的结论, 选取 8 h 作为菌株的培养时间^[6]。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母浸粉 5 g·L⁻¹, 氯化钠 10 g·L⁻¹, 固体培养基在此配方上额外添加琼脂 20 g·L⁻¹, 在 121 °C 下灭菌 20 min。

1.1.3 缓冲液的配制

磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate-Buffered Saline, PBS): 磷酸二氢钾 0.96 g, 十二水合磷酸氢二钠 14.32 g, 氯化钠 32 g, 氯化钾 0.8 g, 加蒸馏水溶解至 3.8 L, 用稀盐酸调节 pH 值至 7.0 定容至 4 L 备用。

三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-Hydroxymethyl Aminomethane-Hydrochloric Acid, Tris-HCl) 缓冲液: Tris 1.21 g, 加蒸馏水溶解至 0.9 L。用稀盐酸调节 pH 值至 7.0, 定容至 1 L 备用。

4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid, HEPES) 缓冲液: HEPES 2.38 g, 加蒸馏水溶解至 0.9 L。用稀盐酸调节 pH 值至 7.0, 定容至 1 L 备用。

1.1.4 主要试剂及仪器

试剂 (+)-柠檬烯 (规格 >95.0%) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司。试剂过硫酸铵 (Ammonium Persulfate, APS)、四亚甲二胺 (Tetramethylethylenediamine, TEMED)、色素蛋白标记物、5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 蛋白上样缓冲液购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。试剂 40% 丙烯酰胺 (Acrylamide, Acr), 4×SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液 (pH 值 6.8), 4×SDS-PAGE 分离胶缓冲液 (pH 值 8.8), 购自北京索莱宝科技有限公司。二喹啉甲酸 (Bicinchoninic Acid, BCA) 蛋白定量测定试剂盒 (500T) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; ULT Freezer-702 型超低温冰箱, Thermo Forma; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; HPX-9082MBE 电热恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; VCX750 高强度超声波细胞破碎仪, SONICS。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化及种子液的制备

实验室筛选并鉴定的菌种被密封保存在 -80 °C 的保菌管中。在无菌条件下, 从保菌管中取出菌液在 LB 平板上划线, 于 37 °C 培养 12 h 直至单菌落形成。接着, 将分离的单菌落转移到 LB 液体培养基内, 并置于 37 °C、210 r·min⁻¹ 的摇床中培养 4 h, 随后通过多次转接来活化菌株。最后, 取 50 μL 活化菌液加入 100 mL LB 培养基中, 于 37 °C、210 r·min⁻¹ 条件下培养 12 h 制成种子液, 并在 4 °C 保存备用。

1.2.2 菌体的制备

将种子液以 1% 的接种量接种到 LB 培养基中, 并在 37 °C、210 r·min⁻¹ 的条件下于摇床中培养 8 h。培养完成后, 在 10 000 r·min⁻¹、4 °C 条件下离心 30 min 以去除上清液。用 pH 值 7.0 的 10 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲液洗涤菌体, 并以相同速度和温度离心 30 min, 弃去上清液, 重复两次, 得到菌体。

1.2.3 粗酶液及转化液的制备

按照 1.2.2 节的步骤获得菌体后, 用 pH 值为 7.0、10 mmol·L⁻¹ 的 PBS 缓冲液按 1:5 比例重悬菌体。接着, 利用超声波细胞破碎仪, 在 4 °C, 振幅 30%, 超声工作时间 3 s, 间歇时间 5 s, 总工作时间 20 min 的条件下进行细胞破碎, 每次样品的体积为 5 mL。破碎完成后, 在 10 000 r·min⁻¹、4 °C 条件下离心 30 min。收集上清即为粗酶液。取粗酶液 1 mL, 加入质量浓度为 840 mg·L⁻¹ 的柠檬烯作为底物, 在 37 °C、210 r·min⁻¹ 条件下转化 12 h, 即为转化液。

1.2.4 酶活性测定方法

Trans-二氢香芹酮的含量采用气相色谱-质谱联用仪 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) 进行测定。用固相微萃取技术 (Solid-Phase Microextraction, SPME) 技术对样品进行前处理, 取 1 mL 转化液入 30 mL 钳口样品瓶中, 用聚四氟乙烯隔垫密封, 于恒温加热磁力搅拌器上在 40 °C 条件下平衡 15 min, 通过隔垫插入已活化好的 50/30 μm 二乙烯基苯 (Divinylbenzene, DVB) / 卡博森 (Carboxen, CAR) / 聚二甲基硅氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 的 SPME 萃取头 (270 °C 活化 1 h), 推出纤维头, 顶空萃取 40 min 后, 插入 GC-MS 进样口解析 5 min。

气相色谱条件: 毛细管柱为 HP-5 (30 m×320 μm×0.25 μm), 程序升温, 起始温度 40 °C, 保持 3 min, 以 3 °C·min⁻¹ 升至 160 °C, 保持 2 min, 再以 8 °C·min⁻¹ 升至 220 °C, 保持 3 min。进样口温度 250 °C, 检测器温度: 氢火焰离子化检测器 (Flame Ionization Detector, FID) 250 °C。

质谱条件: 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 离子化方式为电子轰击电离 (Electron Ionization, EI), 电子能量 70 eV, 质量范围为 45~550 AMU·sec⁻¹。

1 mL 粗酶液 1 h 内产生 1 μg 反式二氢香芹酮定义为 1 U。二氢香芹酮的含量的计算公式如下:

$$C_{dh} = \frac{A_{dh} \times C_{is}}{A_{is}} \quad (1)$$

式中:

C_{dh} ——二氢香芹酮的质量浓度, mg·L⁻¹;

A_{dh} ——二氢香芹酮的色谱峰面积;
 C_{is} ——内标物的质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;
 A_{is} ——内标物的色谱峰面积。

酶活性得率为处理单位质量的菌体所得到的酶活性含量^[10], 单位为 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。计算公式如下:

$$Y=\frac{A}{m}$$

(2)

式中:
 Y ——产 *trans*-二氢香芹酮关键酶的酶活得率, $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$;
 A ——样品中产 *trans*-二氢香芹酮关键酶的酶活, U ;
 m ——菌体质量, g 。

1.2.5 蛋白含量的测定

使用 BCA 蛋白浓度试剂盒进行样品中蛋白浓度的测定。

将粗酶液稀释适当的倍数, 并混合均匀, 吸取 10 μL 待测样品加入 96 孔板, 同样的方法测定待测样品的吸光值, 将其带入标准曲线测定样品中蛋白含量。

1.2.6 超声辅助提取条件的单因素实验

在单因素超声辅助提取实验中, 本文研究了超声时间、料液比和振幅对酶活性得率的影响。菌体按照 1:5 的料液比重悬于 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液中, 使用超声波细胞破碎仪, 在超声工作时间 3 s, 间歇时间 5 s, 总时间 20 min 的条件下进行细胞破碎。在超声时间实验中, 振幅设为 30%, 测试了不同超声时间 (5、10、15、20、25、30 min); 在振幅实验中, 超声时间为 20 min, 振幅设为 20%、25%、30%、35%、40%。对于料液比, 考察了五种比例 1:3、1:5、1:10、1:15、1:20, 振幅保持 30%, 超声时间为 20 min。实验结束后, 样品在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 30 min, 收集上清液得到粗酶液。

1.2.7 超声辅助提取条件的响应面法优化

基于单因素实验的结果, 以超声时间、料液比、振幅为自变量, 酶活性得率为响应值。根据 Box-Behnken 中心组合原理设计实验, 采用响应面分析方法确定了最佳提取工艺参数, 响应面分析因素及水平见表 1。

表 1 响应面考察因素及水平

Table 1 Factors and levels coding of response surface analysis

水平	因素		
	超声时间/min	料液比	振幅/%
-1	15	1:5	30
0	20	1:10	35
1	25	1:15	40

1.2.8 超声辅助提取对细胞微观结构的影响

使用扫描电镜来观察超声辅助提取对细胞微观结构的影响, 方法基于张震^[11]稍作调整。

1.2.9 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 按照吴宁^[12]的方法并略作改动。

1.2.10 酶反应的最适温度及酶的热稳定性

在最适温度实验中, 取 1 mL 粗酶液, 加入 840 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬烯, 于 10、20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 4 h 生物转化, 以确定产 *trans*-二氢香芹酮关键酶的最适反应温度。

在热稳定性实验中, 将 1 mL 粗酶液置于 10、20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min, 然后恢复至室温, 再加入 840 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬烯, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、210 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下转化 4 h, 以评估不同温度处理后酶活性的相对变化, 从而研究酶的热稳定性。

1.2.11 酶反应的最适 pH 值及酶的 pH 值稳定性

根据提取工艺制备粗酶液, 并与不同 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液 (pH 值在 3.0~5.0 范围内使用醋酸钠缓冲液, 在 6.0~7.0 范围内使用 PBS 缓冲液, 在 8.0~10.0 范围内使用 Tris-HCl 缓冲液) 按 1:1 比例混合, 总体积调整为 1 mL。在最适 pH 值实验中, 添加 840 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬烯作为底物, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、210 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下反应 4 h, 以确定产 *trans*-二氢香芹酮关键酶的最适 pH 值。对于 pH 值稳定性实验, 将混合液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 12 h 后恢复至室温, 再加入 840 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬烯, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、210 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下反应 4 h, 以评估不同 pH 值对酶活性的影响, 从而研究酶的 pH 值稳定性。

1.2.12 金属离子对酶活性的影响

参考 Zhang 等^[13]的实验方法并加以修改。

1.2.13 有机溶剂对酶活性的影响

根据工艺制备粗酶液后, 向其中分别加入 1% 和 5% (V/V) 的多种有机溶剂 (包括甲醇、乙醇、丙三醇、异丙醇、乙腈、氯仿和 DMSO), 对照组则加入等体积的 PBS 缓冲液。混合后, 添加 840 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬烯作为底物, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、210 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下反应 4 h, 然后测定酶活性。以对照组酶活性为 100%, 计算有机溶剂处理后的相对酶活性, 从而评估酶对不同有机溶剂的耐受性。

1.2.14 抑制剂对酶活性的影响

将抑制剂 (EDTA、8-羟基喹啉、2-2' 联吡啶、邻

二氮菲等金属离子螯合剂和细胞色素 P450 酶抑制剂 (SKF-525A)) 配成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 使用无水乙醇作为溶剂。根据工艺制备粗酶液, 并与抑制剂混合至最终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对照组则加入等量的无水乙醇。混合后, 加入 $840 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬烯作为底物, 在 37°C 、 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下反应 4 h, 然后测定酶活性。以对照组酶活性为基准 (100%), 计算不同抑制剂处理后的相对酶活性, 以评估这些抑制剂对产 *trans*-二氢香芹酮关键酶系的影响。

1.2.15 数据统计分析

所有实验重复三次, 取平均, 数据分析和绘图采用 Origin 2017 软件, 采用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件对不同组间的单向显著差异进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

以蛋白标准品质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制出标准曲线, 每个质量浓度梯度平行测定三次, 得出标准曲线回归方程为 $y=0.572x+0.1308$, 其中拟合系数 $R^2=0.9954$ 。

2.2 超声辅助提取条件的单因素实验

取 1 mL 粗酶液, 加入 $840 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬烯, 在 37°C 、 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养 4 h, 以评估不同条件对酶活性得率的影响。如图 1a 所示, 超声 5 min 后, 粗酶液中的总蛋白质量浓度为 $3.34 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 随时间增加至 30 min 时达到 $6.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。酶活性先升后降, 在 20 min 时最高, 为 $11.99 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这表明适当超声时间促进蛋白释放, 但过长可能因热量积累损害酶活性^[14]。如图 1b 所示, 料液比 1:3 时, 粗酶液中的总蛋白质量浓度最高, 为 $4.96 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 增至 1:20 时降至 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。酶活性在料液比 1:10 时最高, 为 $27.45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。较小的料液比导致菌体量多, 释放更多蛋白, 但可能因局部过热损害酶活性^[15]。增大料液比促进细胞破碎, 提高酶活性, 但过大则因菌体少而降低酶活性。如图 1c 所示, 振幅 20% 时, 粗酶液中的总蛋白质量浓度为 $4.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 随振幅增加而上升, 至 35% 后稳定, 表明蛋白已完全提取。酶活性在振幅 35% 时最高, 为 $23.02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。振幅增加促进细胞破壁和蛋白释放, 但过高可能导致酶失活^[16]。邓晓宇等^[17]的研究发现超声波振幅在 90% 时纤维素酶活性达到最高, 但本文的研究在振幅 35% 时酶活性已达到最高, 这可能与使用的超声设备和酶的稳定性不同有关。

综合分析表明, 最佳提取条件为超声时间 20 min、料液比 1:10、振幅 35%, 在这些条件下酶活性无显著差异。

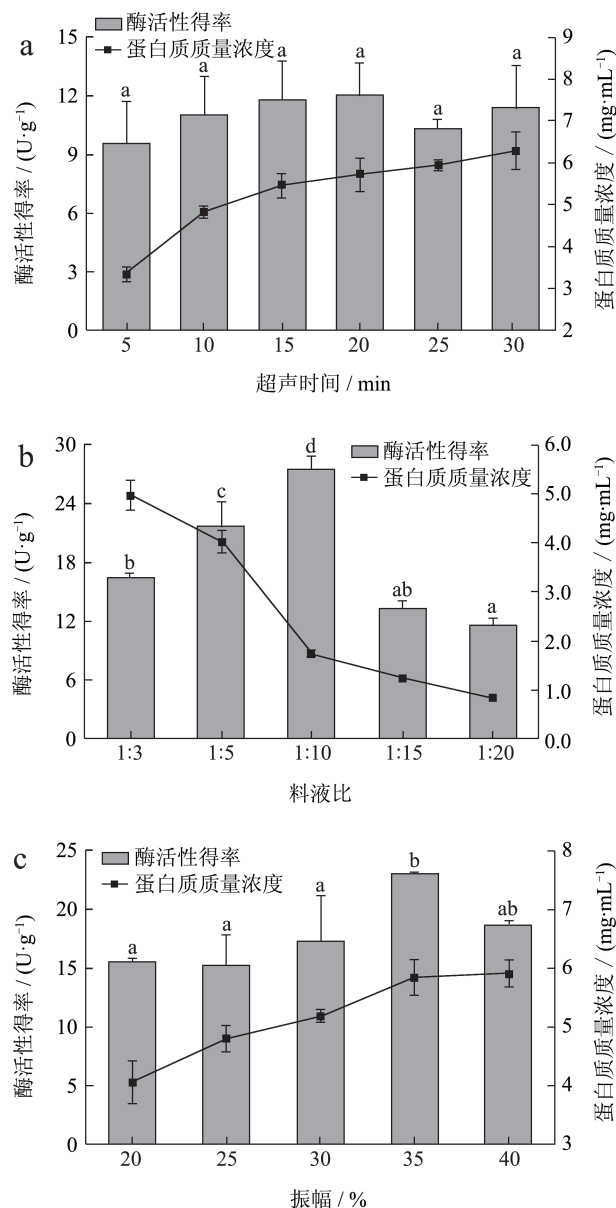


图 1 超声时间、料液比和振幅对酶活性得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasound time, material-liquid ratio and amplitude on yield of enzyme activity

注: 同一指标的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 超声辅助提取条件的响应面实验

2.3.1 模型的建立与显著性分析

响应面法通过有限实验即可解析因素对响应的线性、二次及交互效应, 显著减少实验次数与工作时间^[18]。响应面实验各组结果见表 2, 利用 Design Expert 软件对数据进行回归拟合, 构建数学模型如下:

$$Y = 38.24 + 0.71A + 2.71B + 1.58C + 2.56AB - 2.18AC + 1.47BC - 4.19A^2 - 3.09B^2 - 4.97C^2 \quad (3)$$

式中:

Y ——酶活性得率, $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$;

A ——超声时间, min;

B——料液比;
C——振幅, %。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment				
编号	超声时间/min	料液比	振幅/%	酶活性得率/(U·g ⁻¹)
1	0	0	0	35.04
2	1	0	-1	29.26
3	-1	0	1	33.27
4	0	1	1	35.24
5	0	0	0	40.38
6	-1	1	0	29.97
7	1	-1	0	26.83
8	1	0	1	28.66
9	1	1	0	38.17
10	-1	0	-1	25.15
11	0	1	-1	29.74
12	0	0	0	35.88
13	0	0	0	39.95
14	0	-1	-1	28.06
15	-1	-1	0	28.87
16	0	-1	1	27.69
17	0	0	0	39.96

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 The results of variance analysis of the regression model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
A-超声时间	4.00	1	4.00	0.83	0.392 9	
B-料液比	58.70	1	58.70	12.15	0.010 2	*
C-振幅	20.00	1	20.00	4.14	0.081 3	
AB	26.21	1	26.21	5.43	0.052 7	
AC	19.01	1	19.01	3.93	0.087 7	
BC	8.61	1	8.61	1.78	0.223 6	
A ²	73.91	1	73.91	15.30	0.005 8	**
B ²	40.26	1	40.26	8.33	0.023 4	*
C ²	103.89	1	103.89	21.50	0.002 4	**
回归模型	379.01	9	42.11	8.72	0.004 7	**
残差	33.82	7	4.83			
失拟项	7.55	3	2.52	0.38	0.771 8	不显著
纯误差	26.27	4	6.57			
总离差	412.83	16				
S=2.20 R ² =0.918 1 R ² _{adj} =0.812 8						

注：*表示与对照组相比差异性显著（ $P<0.05$ ），**表示与对照组相比差异性极显著（ $P<0.01$ ）。

对模型进行方差分析,结果见表3。根据数据显示,拟合模型具有显著性 ($P=0.004\ 7<0.01$),失拟项不显著 ($P=0.771\ 8$),回归方程决定系数 $R^2=0.918\ 1$,表示91.81%的酶活性得率变化可由此模型解释,以上内容说明该模型与实际情况拟合良好。一次项中料液比显著,超声时间和振幅不显著;二次项均显著;交互项均不显著。说明各因素和响应值之间非简单的线性关系。根据F值可以得出影响酶活性得率的大小顺序为料液比>振幅>超声时间。

2.3.2 模型交互项分析

如图2所示的三维响应曲面图和等高线图。等高线图呈椭圆且密集的排列,说明两因素之间有明显的交互作用,而呈圆形且稀疏的排列则表明交互作用较弱;在响应曲面图中,平缓的坡度说明交互作用对实验结果有较大影响,陡峭的坡度则相反^[19]。从图可知,随着各因素的水平在一定范围内增大,酶活性得率先上升后下降,各因素对得率影响的响应曲面坡度较为平缓,等高线呈椭圆形排列较为稀疏,这表明两因素间的交互作用均不显著^[20],这与方差分析的结果一致。通过二次多元回归方程的拟合,预测得到的最佳超声提取工艺参数为:超声时间21.03 min,料液比1:12.86,振幅为35.99%,在此条件下,最佳得率为39.25 U·g⁻¹。

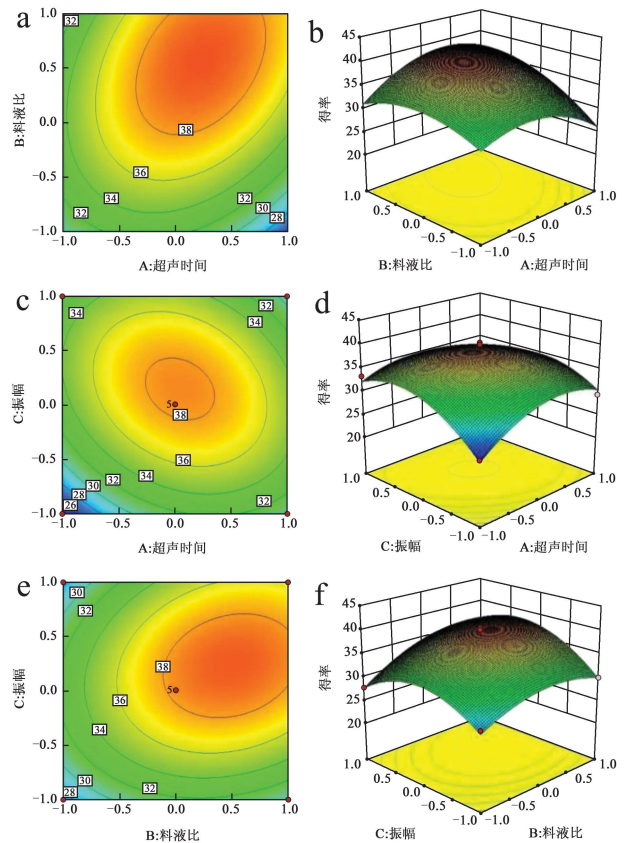


图2 因素间交互作用的影响

Fig.2 The effect of interaction of factors

2.3.3 最佳工艺条件验证

基于预测的最佳工艺参数，设定超声时间 21 min，料液比 1:13，振幅 36%，并进行了三次验证。实验得到的平均得率为 $40.97\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ，与理论预测值相吻合，表明所建立的回归模型能准确预测得率，验证结果值得信赖^[21]。

2.4 超声辅助提取对细胞微观结构的影响

如图 3 所示，未经超声处理的细胞在 3 000 倍的扫描电镜呈现聚集成团，且有明显的菌毛；在 12 000 倍和 20 000 倍下细胞形态完整，呈杆状。相较而言，超声处理后的细胞在 3 000 倍的放大倍数下排列较为松散；在 12 000 倍和 20 000 倍下细胞形态不规则，表面出现皱褶，表明出细胞已被充分破碎。此外，观察到不规则形状的颗粒存在，推测可能是释放的细胞内容物。以上结果表明超声辅助提取可以有效破碎细胞，充分释放其内容物。

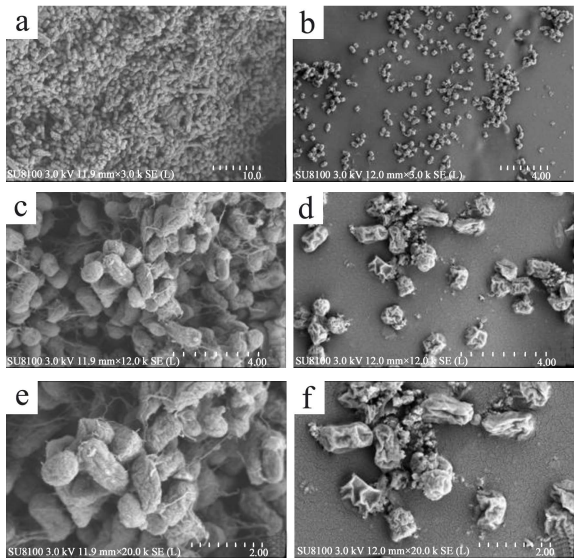


图 3 超声处理前后细胞微观结构观察

Fig.3 Observation of cell microstructure before and after ultrasound-assisted extraction

注：a、c、e 为超声前，b、d、f 为超声后。a：×3 000；b：×3 000；c：×12 000；d：×12 000；e：×20 000；f：×20 000。

2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

按照优化后的工艺进行超声辅助提取，得到的粗酶液进行 SDS-PAGE 实验，结果如图 4 所示。从图中可以看出存在多条谱带，表明粗酶液中存在多种蛋白，结合 2.4 中的扫描电镜观察结果，判断该提取工艺能够较好地破碎细胞，释放胞内蛋白。

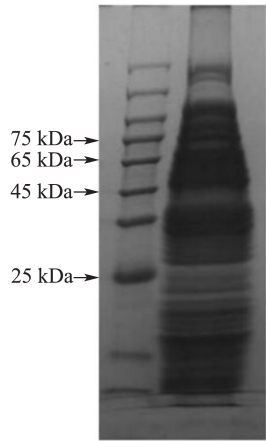


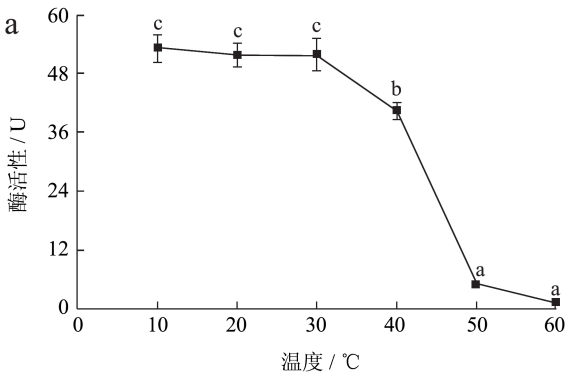
图 4 粗酶液的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE of crude enzyme solution

注：左为参考条带，右为目的条带。

2.6 酶反应的最适温度及酶的热稳定性

酶的活性受温度影响显著，最适反应温度对发挥酶性能和应用开发至关重要^[22]。图 5a 显示，10~30 ℃ 时酶活性稳定，分别为 53.17、51.76、51.87 U，最适温度为 10 ℃；50 ℃ 以上急剧下降，酶活性为 5.01 U。酶活性依赖于其特定的三维结构，当温度升高到 30 ℃ 时，蛋白质分子的热运动加剧，可能导致氢键、疏水相互作用等次级键的破坏，使酶的三维结构稳定性被打破，从而导致酶活性下降^[23]。图 5B 表明，酶在 20 ℃ 时的热稳定性最佳，以此温度下的酶活性为基准（100%），对比了其他温度下的相对酶活性。王婉莹等^[24]研究发现烯还原酶活性随着温度的升高而降低，在 20 ℃ 时，相对酶活性达 90% 以上，40 ℃ 相对酶活性仅剩 10% 左右，50 ℃ 酶基本失活，这和本文的研究结果一致。结果表明，在 10~30 ℃ 范围内，酶活性受温度影响不大，进一步提高温度会抑制酶的活性，而当温度升至 50 ℃ 时几乎完全丧失酶活性。推断此时高温已经对酶的结构造成了破坏；酶系在 10~40 ℃ 之间具备一定的热稳定性，当温度高于 40 ℃ 时，热稳定性较差。



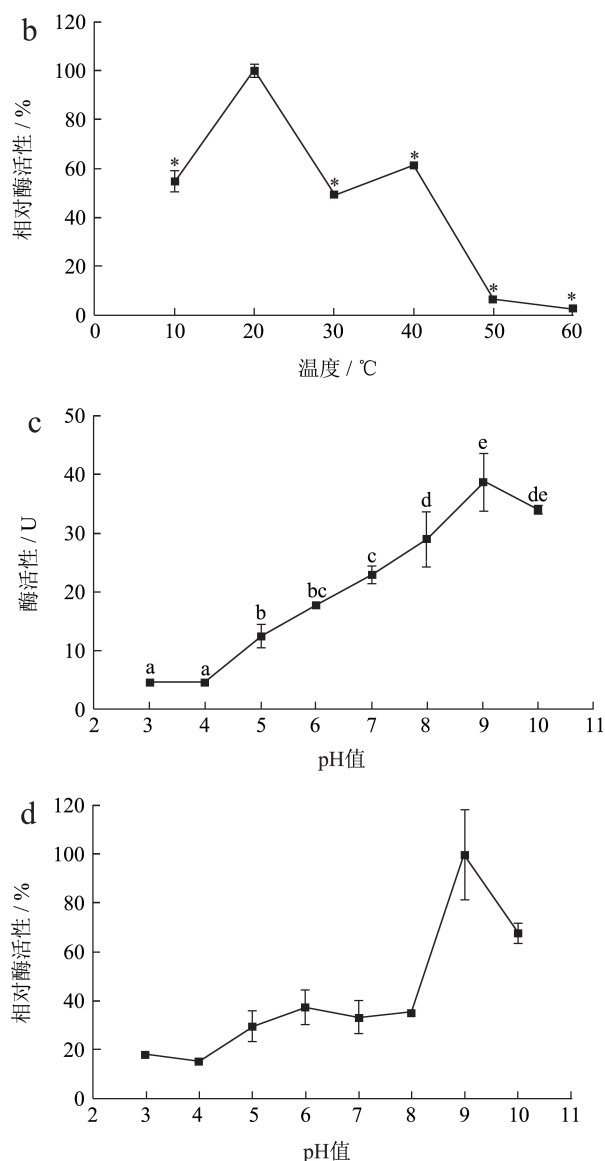


图5 不同条件下的酶活性分析

Fig.5 Analysis of enzymatic activity at different conditions

注: a酶的最适反应温度; b酶的热稳定性; c酶反应的最适pH值; d酶的pH值稳定性。同一指标的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), *表示与对照组相比差异性显著 ($P < 0.05$)。

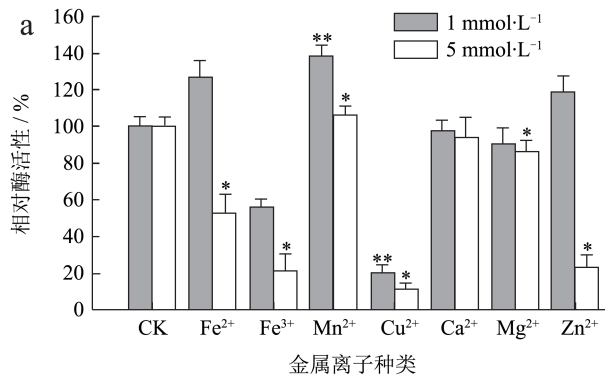
2.7 酶反应的最适pH值及酶的pH值稳定性

pH值变化影响酶活性, 反应体系过酸或者过碱都会对酶的3D构象造成影响, 导致其变性而失去活性^[23]。图5c显示, pH值3.0和4.0时酶活性极低, 随着pH值上升, 酶活性增加, 在pH值9.0时达到峰值38.63 U, 之后下降。结果表明, 不同pH值下的酶活性差异显著, 此酶系在弱碱性条件下有最高酶活性。图5d显示, 酶在pH值9.0下孵育12 h后活性最高,

以此酶系在pH值9.0条件下的酶活性为100%, 分别计算其他各pH值条件下的相对酶活性, 得出pH值5.0~8.0时相对酶活性为30%~40%, pH值3.0~4.0时降至20%以下。总的来说, 该酶系在弱碱性条件下活性最高, 过酸(pH值 < 5.0)环境下易失活。

2.8 金属离子对酶活性的影响

金属离子能改变酶结构, 影响其活力, 很多蛋白质需金属离子辅助才能发挥催化作用^[25]。在酶反应体系中加入不同浓度和不同种类金属离子, 对照组添加等量的蒸馏水, 将对照组的酶活性设为100%, 测定并计算各组的相对酶活性。如图6a所示, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 能增加酶活性, 测得的相对酶活性分别为126.99%、138.53%和118.72%。 Fe^{2+} 能够提高酶活性, 可能与细胞色素P450酶(该酶催化柠檬烯生成香芹醇)中通常含有血红素^[26]有关。 Zn^{2+} 能够显著提高酶活性, 这可能是锌依赖性短链脱氢酶/还原酶超家族, 这类酶催化香芹醇生成香芹酮^[27]。 Mn^{2+} 的促进机理尚不明确。而 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 则降低酶活性, 测得的相对酶活性分别为56.00%和20.50%。在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 大多数金属离子抑制酶活性, 尤其是 Cu^{2+} , 能够使酶活性下降至11.40%, 原因可能是因此酶系中存在巯基, 并能够与 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 结合, 导致酶活性受到抑制^[28], 而 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活性影响不大。Priyanka等^[29]研究表明 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对纤维素酶的酶活性均有促进作用, 其中 Ca^{2+} 的促进作用最强, 这与该实验结果不同, 可能是由于不同菌株间存在的差异所导致。结果表明, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 仅 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活性影响极显著, 其他无显著差异。而 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 除 Ca^{2+} 外, 其他金属离子对酶活性影响显著。 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时促进酶活性, 而在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时强烈抑制, 使用时需注意浓度。



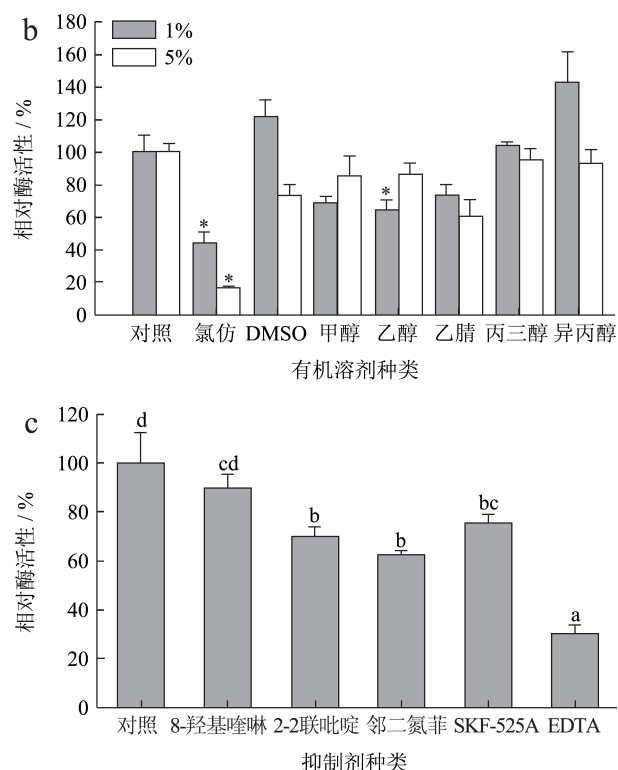


图6 金属离子、有机溶剂和抑制剂对酶活性的影响

Fig.6 Effect of metal ions, organic solvents and inhibitors on enzyme activity

注: CK 表示对照组。* 表示与对照组相比差异性显著 ($P < 0.05$), ** 表示与对照组相比差异性极显著 ($P < 0.01$), 同一指标的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.9 有机溶剂对酶活性的影响

在酶反应体系中分别加入不同种类的有机溶剂, 浓度分别为 1% (V/V) 和 5% (V/V), 对照组添加等量的 PBS 缓冲液。结果显示, 1% 的氯仿、甲醇、乙醇、乙腈抑制酶活性, 氯仿抑制最强, 测得的相对酶活性为 43.94%。而 1% 的 DMSO 和异丙醇促进酶活性, 相对酶活性分别为 121.64% 和 142.62%。5% 时, 氯仿进一步抑制酶活性, 残余酶活性仅为 16.35%, 其他溶剂影响较小, 丙三醇对酶活性无影响, 表明酶对丙三醇有耐受性。结果表明, 1% 时氯仿和乙醇显著抑制酶活性, 其余各组均无显著性差异; 5% 时仅氯仿显著。总体上, 该酶系对有机溶剂的耐受性较好。

2.10 抑制剂对酶活性的影响

EDTA 是一种金属离子螯合剂, 其对金属蛋白酶有明显的抑制作用^[30]。8-羟基喹啉是一种优良的螯合剂, 能与金属离子形成难溶配合物, 并抑制羟化酶^[31]。2-2' 联吡啶是一种重要的双齿螯合配体, 对 Fe^{2+} 有极强的螯合作用^[32]。邻二氮菲能与多种金属离子形成稳定配合物。在酶反应体系中加入不同金属离子螯合

剂 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 结果如图 6c 所示, EDTA 对酶活性抑制最明显, 残余酶活性为 30.47%; 邻二氮菲和 2-2' 联吡啶的残余酶活性分别为残余酶活性较高, 分别为 62.26% 和 69.77%; 而 8-羟基喹啉影响较小, 残余酶活性为 89.48%。造成以上现象的原因可能是因为 EDTA、邻二氮菲、2-2' 联吡啶与酶活性中心的金属离子之间发生了螯合, 这三者的共同特点都是对 Fe^{2+} 有较弱的螯合作用^[33-35]。

结合 2.8 的实验结果中 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fe^{2+} 对酶活性有着较强的促进作用, 推断 Fe^{2+} 在此酶系中起着关键的作用。SKF-525A 作为一种细胞色素 P450 的非特异性抑制剂^[36], Song 等^[37]研究发现其对 9 种细胞色素 P450 表现出选择性抑制, 对其中 5 种细胞色素 P450 的抑制效果较好, IC_{50} 值 (半抑制率) 在 $0.9 \sim 33.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 而对其他四种抑制效果并不明显。实验中 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SKF-525A 抑制了部分酶活性, 剩余 75.29%, 暗示酶系包含 P450 酶, 与柠檬烯转香芹醇的 P450 酶研究相符。

3 结论

该研究通过单因素实验和响应面分析确定了最佳提取条件, 为超声时间 21 min、料液比 1:13、振幅 36%。进一步分析金属离子、有机溶剂和抑制剂对酶活性的影响。研究发现, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 促进酶活性, 而 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 起抑制作用。 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大部分金属离子表现为抑制作用, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活性影响不大; 1% (V/V) 的 DMSO 和异丙醇促进酶活性, 5% (V/V) 时多数有机溶剂对酶都有不同程度的抑制作用, 氯仿最强, 丙三醇影响小; 抑制剂均会抑制酶活性, 其中 EDTA 最强。此外, 测定酶的最适温度和 pH 值, 结果表明酶的最适温度 20°C , 最适 pH 值 9.0。结果为该酶体系的工业化应用提供了理论依据和技术支持。

参考文献

- [1] 李忠煜. 松油烯—4 醇类似物的衍生合成及杀虫活性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2009.
- [2] FAN X Y, YU Y, YAO Y, et al. Applications of ene-reductases in the synthesis of flavors and fragrances [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(33): 18305-18320.
- [3] CORMA A, IBORRA S, VELTY A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals [J]. Chemical Reviews, 2007, 107(6): 2411-2502.
- [4] 王花俊, 王军, 楚首道, 等. 蒎烯中挥发性香味成分的分析研究 [J]. 中国调味品, 2019, 44(11): 141-142, 156.
- [5] AL-SHEDDI E S, AL-ZAID N A, AL-OQAIL M M, et al. Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induced

- by *Anethum graveolens* L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2019, 27(7): 1053-1060
- [6] 李志,张莹莹,张璐璐,等.克雷伯杆菌O852产反式二氢香芹酮关键酶转化条件及超声提取工艺优化[J].食品工业科技,2020, 41(22):86-92.
- [7] VERAS S T S, ROJAS P, FLORENCIO L, et al. Production of 1, 3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support [J]. Bioresource Technology, 2019, 279: 140-148.
- [8] WANG W, WANG W W, GE H X, et al. Biocatalytic allylic hydroxylation of unsaturated triterpenes and steroids by *Bacillus megaterium* CGMCC 1.1741 [J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 99: 103826.
- [9] STIRK W A, BÁLINT P, VAMBE M M, et al. Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass [J]. Journal of Biotechnology, 2020, 307: 35-43.
- [10] 刘莹,袁岩,雷霄宇,等.响应面法优化超声波辅助提取香菇中半胱氨酸亚砷裂解酶的工艺[J].食品科学,2013,34(10):31-34.
- [11] 张震.大肠杆菌多铜氧化酶介导的Mn(II)氧化作用的分子机制与应用[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [12] 吴宁.香菇中半胱氨酸亚砷裂解酶的分离纯化及其酶学性质研究[D].杭州:浙江工商大学,2013.
- [13] ZHANG Y J, CHEN C S, LIU H T, et al. Purification, identification and characterization of an esterase with high enantioselectivity to (S)-ethyl indoline-2- carboxylate [J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(10): 1223-1232.
- [14] 杨玉红,杨建,张光宇,等.超声波破碎法提取羊肚菌发酵菌丝体生物活性肽条件的优化[J].食品科技,2014,39(7):252-257.
- [15] 周金虎,毛志海,陈茂彬,等.超声波破碎法提取香草酸脱羧酶条件的优化[J].食品工业,2019,40(7):155-159.
- [16] 张荆.假单胞菌属No.2120产D-甘露糖异构酶的研究[D].无锡:江南大学,2009.
- [17] 邓晓宇,陈华,徐倩倩,等.超声波辅助提取香菇菌棒纤维素酶工艺优选研究[J].农产品加工,2017,7:36-38.
- [18] HEFIED F, AHMED Z B, YOUSFI M. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidant activities from *Pistacia atlantica* Desf. galls using response surface methodology [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2023, 32: 100449.
- [19] KARAZHIYAN H, RAZAVI S M A, PHILLIPS G O. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 915-920.
- [20] 雷月,宫彦龙,邓茹月,等.超声波辅助喷雾加湿法富集发芽黑糙米生物活性物质工艺的响应面优化[J].食品工业科技,2020, 41(4):105-113.
- [21] SHEN L, PANG S, ZHONG M, et al. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106646.
- [22] THOMSON B, HEPBURN C D, LAMARE M, et al. Temperature and UV light affect the activity of marine cell-free enzymes [J]. Biogeosciences, 2017, 14(17): 3971-3977.
- [23] 徐培.类芽孢杆菌甲壳素酶的酶学性质、热稳定性改造及应用研究[D].广州:华南理工大学,2019.
- [24] 王婉莹,李志建,李泽浩,等.克雷伯杆菌烯还原酶基因的异源表达和性质研究[J].食品与发酵工业,2025,51(14):65-73.
- [25] 岳晓平.酸性蛋白酶在毕赤酵母中的表达及其酶学性质[D].天津:天津科技大学,2019.
- [26] ZHANG X, GUO J, CHENG F, et al. Cytochrome P450 enzymes in fungal natural product biosynthesis [J]. Natural Product Reports, 2021, 38(6): 1072-1099.
- [27] VAN DER WERF M J, VAN DER VEN C, BARBIRATO F, et al. Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14: a novel nicotinoprotein belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(37): 26296-26304.
- [28] 夏晶晶.产羧基还原酶工程菌的发酵及重组羧基还原酶的酶学性质研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [29] PACHAURI P, V A, MORE S, et al. Purification and characterization of cellulase from a novel isolate of *Trichoderma longibrachiatum* [J]. Biofuels, 2020, 11(1): 85-91.
- [30] VERMA M, LEE I, HONG Y, et al. Multifunctional β -Cyclodextrin-EDTA-Chitosan polymer adsorbent synthesis for simultaneous removal of heavy metals and organic dyes from wastewater [J]. Environmental Pollution, 2022, 292: 118447.
- [31] 于胜男.一种检测8-羟基喹啉的高效液相色谱法[J].辽宁化工, 2019,48(11):1143-1145.
- [32] ZHU Q Y, DAI J. Main group metal chalcogenidometalates with transition metal complexes of 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2017, 330: 95-109.
- [33] BERRY F J, HAYES M H B, JONES S L. The intercalation of 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline and their complexes with iron within the interlayer regions of montmorillonite clay [J]. Inorganica Chimica Acta, 1990, 178(2): 203-208.
- [34] WANG J, YANG M, LIU R, et al. Anaerobically-digested sludge conditioning by activated peroxydisulfate: significance of EDTA chelated-Fe²⁺ [J]. Water Research, 2019, 160: 454-465.
- [35] WANG Y, GU J, LU X, et al. 2, 3-Dihydroxyisovalerate production by *Klebsiella pneumonia* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104: 6601-6613.
- [36] EMOTO C, MURASE S, SAWADA Y, et al. *In vitro* inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole [J]. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2003, 18(5): 287-295.
- [37] SONG M, DO H H, KWON O K, et al. A comparison of the *in vitro* inhibitory effects of theophoric acid and SKF-525A on human cytochrome P450 activity [J]. Biomolecules & Therapeutics, 2014, 22(2): 155.