

研究报告

嗜热细菌 *Clostridium thermocellum* 阿魏酸酯酶基因的克隆、 异源表达及酶学特性分析

刘奕彤 孙建中 蒋建雄*

(江苏大学环境与安全工程学院生物质能源研究所 国家能源非粮生物质原料研发中心华东分中心
江苏 镇江 212013)

摘要:【目的】阐明嗜热细菌 *Clostridium thermocellum* XynZ 蛋白的阿魏酸酯酶催化域的酶学特性, 为其在生物质能源及其它发酵工业中的应用奠定基础。【方法】分别构建了 *C. thermocellum* XynZ 的阿魏酸酯酶催化域(FAE)及该阿魏酸酯酶催化域和碳水化合物结合域(FAE-CBM6)编码基因的原核表达载体, 并在大肠杆菌菌株 BL21(DE3)中异源表达, 在此基础上分析比较了温度、pH、底物、金属离子及 CBM6 结合域对阿魏酸酯酶活性的影响。【结果】重组 FAE 酶及 FAE-CBM6 酶发挥催化活性的适宜 pH 值为 5.0–9.0, 适宜温度为 50–70 °C, 它们对不同金属离子的响应有差异。【结论】在同一反应条件下, FAE-CBM6 酶的酶活均比 FAE 高, 说明 CBM6 结合域的存在对于阿魏酸酯酶活性有促进作用。

关键词: *Clostridium thermocellum*, 嗜热阿魏酸酯酶, 碳水化合物结合域, 异源表达, 酶学特性

Cloning, heterologous expression and characterization of a ferulic acid esterase gene from thermophilic *Clostridium thermocellum*

LIU Yi-Tong SUN Jian-Zhong JIANG Jian-Xiong*

(Biofuels Institute, Environment & Safety Engineering School, East China Branch of National Energy R&D Center for Non-food Biomass, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: [Objective] To elucidate the characteristics of a ferulic acid esterase catalytic domain within a XynZ protein from thermophilic *Clostridium thermocellum* to provide a basis for its application in bioenergy and other fermentation industries. [Methods] A prokaryotic expression vector for the ferulic acid esterase catalytic domain (FAE) within XynZ protein as well as for this catalytic domain adding an extra carbohydrate binding module 6 (FAE-CBM6) was constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells, respectively. Then, the effects of temperature, pH, substrates, metal ions and the CBM6 module on the catalytic activity of ferulic acid esterase were estimated. [Results] The favorable

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31671754); Advanced Talent Research Foundation Project of Jiangsu University (No. 15JDG012)

*Corresponding author: Tel: 86-511-88796122; E-mail: jxjiang2002@163.com

Received: September 14, 2016; Accepted: February 27, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31671754); 江苏大学高级人才启动基金项目(No. 15JDG012)

*通讯作者: Tel: 86-511-88796122; E-mail: jxjiang2002@163.com

收稿日期: 2016-09-14; 接受日期: 2017-02-27

pH for optimal catalytic activity of recombinant FAE or FAE-CBM6 protein ranged from 5.0 to 9.0, and the favorable temperatures being 50–70 °C. Furthermore, different metal ion had a positive or negative effect on catalytic activity of these two recombinant proteins. **[Conclusion]** Under the same reaction condition, FAE-CBM6 usually produced a higher catalytic activity than FAE, indicating that the CBM6 module plays a key role in improving the ferulic acid esterase activity.

Keywords: *Clostridium thermocellum*, Thermophilic ferulic acid esterase, Carbohydrate binding module, Heterologous expression, Enzymatic characterization

阿魏酸(Ferulic acid, FA)即 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸,它作为木质纤维素中半纤维素分子之间以及半纤维素与木质素分子之间共价交联的“桥梁”,在植物细胞壁复杂异质的高分子网络结构形成及其木质化过程中起关键作用,是细胞壁抗降解屏障形成的重要分子基础^[1-2]。许多真菌或细菌可以产生阿魏酸酯酶(Ferulic acid esterase, EC 3.1.1.73),水解 FA 或多聚 FA 与木聚糖之间的酯键,打破半纤维素之间以及木质素与半纤维素之间的共价交联,使细胞壁骨架结构变得疏松^[3-4],因此它在促进木质纤维素降解转化中可以发挥重要作用。目前已有不少微生物来源的阿魏酸酯酶被异源表达、分离纯化及表征^[4-10],其中包括一些嗜热阿魏酸酯酶^[11-14]。

热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)是一种嗜热细菌,它可以通过在细胞膜外形成纤维小体这一特殊的超分子酶系复合物来实现高效快速降解木质纤维素,备受研究者的关注^[15]。*C. thermocellum* 中的 XynZ 是一个包含 837 个氨基酸残基的双功能酶,其 C-端有一个木聚糖酶催化域^[16],N-端有一个阿魏酸酯酶催化域(FAE)^[17]。此外,在这两个催化域之间还存在一个碳水化合物结合域 CBM6 (Carbohydrate binding module 6),碳水化合物结合域(CBM)的作用通常是将相邻的催化域固定到结晶纤维素底物上,提高酶的水解效率,但在 XynZ 中 CBM6 的具体功能尚未得到解析^[18]。本研究分别构建了嗜热细菌 *C. thermocellum* 的 FAE 及 FAE-CBM6 重组蛋白原核表达载体,并在大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中异源表达,在此基础上,系统地分析比较了温度、pH、酶解底物、金属离子及 CBM6 结合域对阿魏酸酯酶活性的影响,为该嗜热

阿魏酸酯酶在生物能源、食品、医疗保健、饲料等行业中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体: 原核表达载体 pET22b(+)以及 *Escherichia coli* DH5 α 和 BL21(DE3)为本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: KOD-Plus-Neo 购自 TOYOBO 公司;Nde I 和 Not I 购自 Fermentas 公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;His TrapTM HP 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司;阿魏酸甲酯和阿魏酸乙酯以及阿魏酸购自 Sigma 公司;色谱甲醇购自 TEDIA 公司;其它常规试剂为国产或进口分析纯。Prominence LC 高效液相色谱仪购自日本岛津公司;电子分析天平购自德国赛多利斯公司;PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;超净工作台购自苏州金净公司;超纯水系统购自 Merck Millipore 公司;大型离心机购自 Beckman 公司;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝公司;蛋白质电泳仪购自 Bio-Rad 公司;琼脂糖凝胶电泳仪购自北京六一仪器厂;凝胶成像系统购自大韩仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 重组嗜热阿魏酸酯酶基因的扩增: 前期本实验室已经将 *C. thermocellum* 基因组中的 XynZ 编码基因(登录号: M22624)克隆至 pUC57 载体上,基因长度为 2 722 bp。以该 DNA 序列为模板,采用生物学软件 BioXM 2.6 设计 FF1a 和 FR1b、FR2b 引物,FF1a 引物分别和后两个引物组合扩增 FAE (不带 CBM6 结合域)和 FAE-CBM6 (带 CBM6 结合域)

目标片段,引物的5'端设计有限制性内切酶 *Nde* I 或 *Not* I 酶切位点识别序列(下划线表示)。PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR buffer 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μ L, 200 μ mol/L 正反向引物各 1.5 μ L, 100 ng/ μ L 模板 DNA 1.5 μ L, 1 U/ μ L KOD-Plus-Neo 酶 1 μ L, ddH₂O 31.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 7 min。

FF1a: 5'-AGCATATGGCATCCTTGCCAACCA TGCCGCCTTCG-3' (带 *Nde* I 酶切位点);

FR1b: 5'-AAGCGGCCGCGTTAGCCGGCTTT GGACTGGGTGTCGG-3' (带 *Not* I 酶切位点);

FR2b: 5'-AAGCGGCCGCAAAAGTGAACCA GTCTATGTTTACAGG-3' (带 *Not* I 酶切位点)。

1.2.2 重组嗜热阿魏酸酯酶基因原核表达载体的构建:将 PCR 产物和原核表达载体 pET22b(+)质粒 DNA 分别用 *Nde* I 和 *Not* I 进行双酶切后,用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒分别回收纯化 PCR 目标片段及 pET22b(+)大片段,然后将两者连接构建原核表达载体, DNA 连接反应使用 TaKaRa 公司的 DNA Ligation Kit, 化学转化法导入到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,用 PCR 方法筛选阳性克隆, PCR 引物仍采用上述 FF1a/FR1b 以及 FF1a/FR2b 组合,但 DNA 聚合酶换成了 TaKaRa ExTaq 酶(1 U)。阳性克隆送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证,测序引物为通用引物 T7 promoter/terminator primer。验证为正确无误的表达载体质粒 DNA 进一步转化到原核表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。

1.2.3 重组阿魏酸酯酶的原核表达与纯化:在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下将菌液培养到 OD₆₀₀ 值至 1.0 左右,再加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h^[19]。菌液 8 000 \times g 离心 5 min,收集的菌体用生理盐水洗涤 5 min,再用 20 mL 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)重悬,超声波破碎后 12 000 \times g 离心 20 min,取上清液过 0.45 μ m 滤膜。采用 His TrapTM HP 亲和层析柱进行蛋白纯化。纯

化后的蛋白在 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)中透析 4 h 左右。重组蛋白浓度采用考马斯亮蓝法^[20]测定,分子量采用 SDS-PAGE 电泳测定。

1.2.4 嗜热阿魏酸酯酶酶活测定:酶解底物为去蛋白质和淀粉后的麦麸(DSWB)^[21],将 DSWB 粉碎后 65 $^{\circ}$ C 烘干至恒重,过 60 目筛。取 0.02 g 的 DSWB,加入 250 μ L Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液,然后添加 25 μ L 重组阿魏酸酯酶液,在一定温度下反应 15 min,用 500 μ L 10%冰乙酸(体积比)终止反应,空白对照添加煮沸失活的酶液^[22-23]。

阿魏酸酯酶酶活力定义:每分钟生成 1 μ mol 阿魏酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。阿魏酸含量测定采用 HPLC 法。样品液 12 000 \times g 离心 5 min 后取上清液 500 μ L。色谱条件:Prominence LC 高效液相色谱仪, InertSustain C₁₈ WR5-3630 色谱柱,紫外检测波长 320 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相为甲醇:水:冰乙酸=25:75:0.75 (体积比),流速 1 mL/min,进样量为 20 μ L^[24]。采用顺式阿魏酸制作标准曲线。

1.2.5 最适反应 pH 及 pH 稳定性测定:(1) 最适反应 pH 的测定:将含有 0.02 g DSWB 的 25 μ L 酶液分别与 250 μ L 0.2 mol/L 反应缓冲液(pH 3.0-10.0)混合,60 $^{\circ}$ C 反应 15 min,测定残留酶活。(2) pH 稳定性测定:将等量酶液置于 0.2 mol/L 的反应缓冲液(pH 3.0-10.0)中,50 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,在 pH 6.0、60 $^{\circ}$ C (FAE 酶)或 pH 7.0、70 $^{\circ}$ C (FAE-CBM6 酶)反应条件下测定残留酶活,以各 pH 值下的初始酶活为 100%,计算相对酶活。pH 3.0-7.0 的反应缓冲液采用 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液, pH 8.0-10.0 的缓冲液采用 Gly-NaOH 缓冲液。

1.2.6 最适反应温度及温度稳定性的测定:(1) 最适反应温度的确定:将添加有 0.02 g DSWB 的 25 μ L 酶液与 250 μ L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 6.0 或 pH 7.0)混合,分别在 30-90 $^{\circ}$ C 反应 15 min 后,测定残留酶活。(2) 温度稳定性的测定:将酶液置于 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 6.0 或 pH 7.0)中,分别在 70、75、80 $^{\circ}$ C 保温 120 min,每隔 20 min 取样,在 pH 6.0、60 $^{\circ}$ C (FAE)或 pH 7.0、70 $^{\circ}$ C

(FAE-CBM6 酶)反应条件下测定残留酶活,以不同温度下的初始酶活为 100%,计算相对酶活。

1.2.7 底物特异性的测定:以阿魏酸甲酯、阿魏酸乙酯及 DSWB 为不同酶解底物,在 pH 6.0、60 °C (FAE 酶)或 pH 7.0、70 °C (FAE-CBM6 酶)反应条件下测定重组阿魏酸酯酶的最大比酶活。

1.2.8 不同金属离子对酶活性的影响:以 DSWB 为底物,在测定酶活反应体系中分别添加终浓度为 1 mmol/L 的 MgSO₄、CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄、MnSO₄、NiSO₄,混合溶液先在 50 °C 温育 1 h,使金属离子与酶充分反应,然后在 pH 6.0、60 °C (FAE 酶)或 pH 7.0、70 °C (FAE-CBM6 酶)反应条件下测定酶活^[6]。

2 结果与分析

2.1 嗜热阿魏酸酯酶基因重组表达载体构建

在 KOD-Plus-Neo 酶的催化下,两对特异引物组合均扩增出了单一的 DNA 条带,其中 FF1a/FR1b 的 PCR 产物(FAE)长度为 0.8 kb 左右,FF1a/FR2b 的 PCR 产物(FAE-CBM6)长度约 1.2 kb,均符合预期的产物片段大小(图 1)。将经 *Nde* I+*Not* I 双酶切后的 PCR 产物分别连接入 pET22b(+)的多克隆位点,构建重组基因表达载体,分别命名为 pET22b-FAE 和 pET22b-FAE-CBM6,随后的测序结果表明插入的目标基因及其 CDS 序列信息准确无误,可用于下一步的原核表达分析。

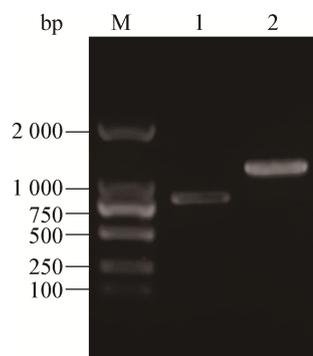


图 1 *FAE* 及 *FAE-CBM6* 基因序列的 PCR 扩增
Figure 1 The PCR amplification of the *FAE* and *FAE-CBM6* sequences

Note: M: DNA marker; 1: *FAE* gene; 2: *FAE-CBM6* gene.

2.2 重组嗜热阿魏酸酯酶的原核表达

将构建好的 pET22b-FAE 和 pET22b-FAE-CBM6 重组质粒 DNA 转化入宿主 *E. coli* BL21(DE3)细胞中并诱导表达,SDS-PAGE 电泳检测结果表明这两个重组蛋白均能正确表达。经过 His TrapTM HP 亲和层析纯化,两个重组酶均为单一条带,其中 FAE 重组蛋白分子量约为 29.0 kD,FAE-CBM6 重组蛋白分子量约为 45.0 kD (图 2),它们的分子量大小与理论计算值基本上相符。

2.3 重组嗜热阿魏酸酯酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

在 pH 3.0–6.0 范围内,FAE 酶的比酶活随着 pH 值的升高而增加,在 pH 6.0 处达到最大值,为 39.0 U/mg;而 FAE-CBM6 酶的比酶活则在 pH 7.0 时达到最大值,为 63.72 U/mg (图 3)。当 pH 值继续增加到 10.0 时,与其最大值相比较,FAE 酶和 FAE-CBM6 酶的比酶活下降幅度并不大。与此同时,在同一 pH 值下,FAE-CBM6 酶的比酶活要明显高于 FAE。

如图 4 所示,FAE 酶在 pH 5.0–9.0 范围内比较稳定,而 FAE-CBM6 酶在 pH 4.0–9.0 范围内比较稳定,在 50 °C 孵育 2 h 后仍能维持 80% 以上的酶活力。

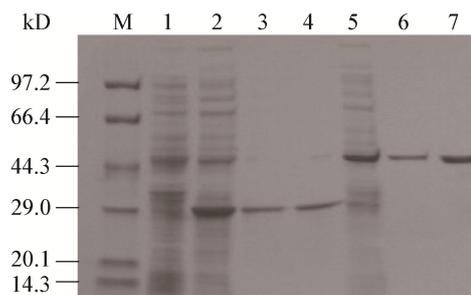


图 2 重组嗜热阿魏酸酯酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 The SDS-PAGE analysis of the recombinant thermophilic ferulic acid esterases

注: M: 蛋白标准 Marker; 1: pET22b(+)空载体; 2: FAE 粗酶; 3: 纯化后的 FAE 酶; 4: 脱盐后的 FAE 酶; 5: FAE-CBM6 粗酶; 6: 纯化后的 FAE-CBM6 酶; 7: 脱盐后的 FAE-CBM6 酶。

Note: M: Protein standard marker; 1: pET22b(+) vector; 2: The crude FAE protein; 3: The purified FAE protein; 4: The desalted FAE protein; 5: The crude FAE-CBM6 protein; 6: The purified FAE-CBM6 protein; 7: The desalted FAE-CBM6 protein.

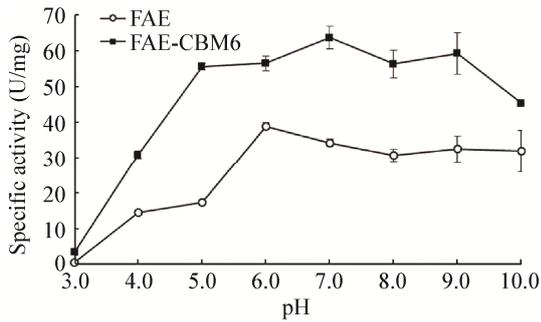


图3 pH对嗜热阿魏酸酯酶活力的影响

Figure 3 The effect of pH on catalytic activity of the thermophilic ferulic acid esterases

2.4 重组嗜热阿魏酸酯酶的最适反应温度及温度稳定性

在 30–60 °C 范围内, 随着温度的升高, FAE 酶的比酶活逐步增加, 60 °C 时达到最高, 为 39.0 U/mg; 温度继续升高, 则比酶活开始逐步下降。FAE-CBM6 酶在 30–70 °C 范围内的比酶活是随着温度的升高而逐步增加, 70 °C 时达到最高, 为 70.8 U/mg, 随后比酶活开始迅速降低(图 5)。此外, 在同一反应温度下, FAE-CBM6 酶的比酶活均明显高于 FAE。

将酶液先在 70、75、80 °C 进行温育, 每隔 20 min 取样一次, 在最适条件下进行酶活测定, 以未作处理的样品酶活作为 100%。FAE 酶分别在 70 °C 和 75 °C 温育 120 min 之后, 其相对酶活仍能维持在初始酶活的 62% 和 80%, 但若在 80 °C

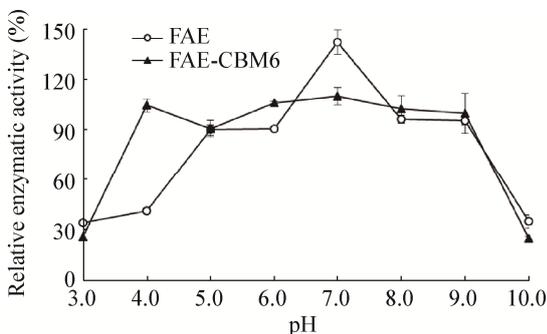


图4 pH对嗜热阿魏酸酯酶稳定性的影响

Figure 4 The effect of pH on activity stability of the thermophilic ferulic acid esterases

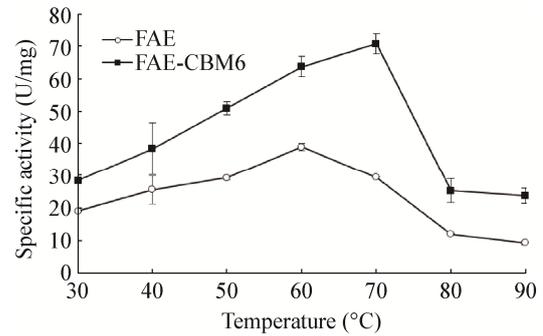


图5 温度对嗜热阿魏酸酯酶活力的影响

Figure 5 The effect of temperatures on catalytic activity of the thermophilic ferulic acid esterases

温育 20 min 后, 其相对酶活即下降至 31%。FAE-CBM6 酶在 70 °C 温育 120 min 后, 相对酶活仍能维持 85%, 而在 75 °C 温育 60 min 后则其相对酶活就降至 33%, 在 80 °C 温育 20 min 后其相对酶活即降至 22% (图 6)。

2.5 嗜热阿魏酸酯酶的底物特异性

阿魏酸酯酶对阿魏酸甲酯的特异性最高, FAE 酶和 FAE-CBM6 酶的最大比酶活分别达到了 $4\,931.89 \pm 5.55$ U/mg 和 $5\,188.60 \pm 317.34$ U/mg; 对阿魏酸乙酯的特异性次之, 分别为 $1\,572.79 \pm 170.92$ U/mg 和 $2\,745.95 \pm 192.86$ U/mg, 且 FAE 和 FAE-CBM6 之间差异达到极显著水平; 对 DSWB 的特异性最低, 分别只有 30.9 ± 1.1 U/mg 和 70.8 ± 0.2 U/mg (图 7)。

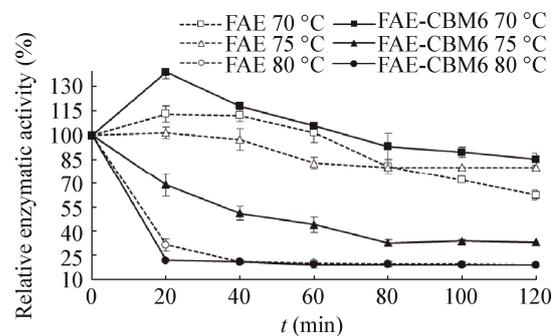


图6 温度对嗜热阿魏酸酯酶稳定性的影响

Figure 6 The effect of temperatures on activity stability of the thermophilic ferulic acid esterases

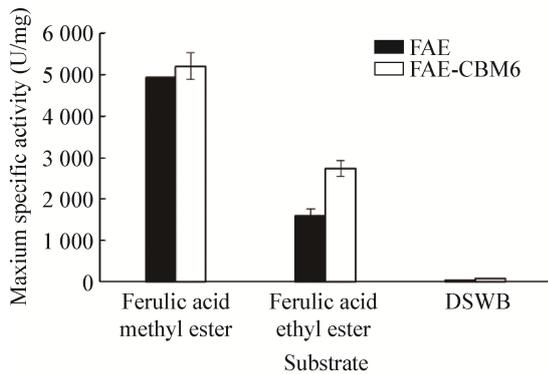


图7 嗜热阿魏酸酯酶对不同底物的特异性

Figure 7 The substrate specificity of the thermophilic ferulic acid esterases

2.6 金属离子对重组嗜热阿魏酸酯酶活性的影响

测定了6种二价金属离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 对重组嗜热阿魏酸酯酶活性表现的影响。结果表明, Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对于 FAE 酶的酶活有促进作用, Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 有抑制作用($P < 0.05$), Fe^{2+} 无明显影响; Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 对 FAE-CBM6 酶的酶活无明显影响, 其它几种金属离子特别是 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对其有明显抑制作用(图8)。

3 讨论

在发酵工艺中通常需要在高温等极端条件下进行酶催化反应, 或者是生产原料需要先在高温条件下进行预处理, 然后再采取降温措施后才能向反

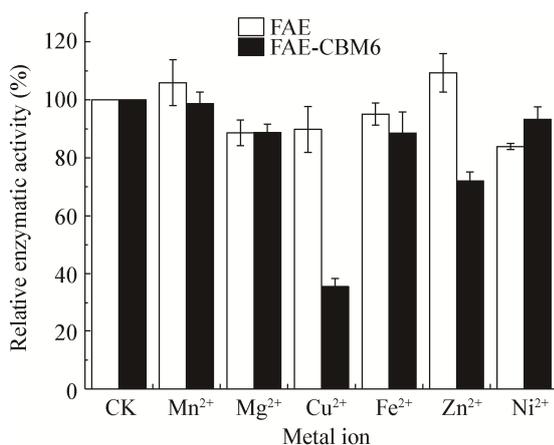


图8 金属离子对嗜热阿魏酸酯酶活性的影响

Figure 8 The effect of different mental ion on catalytic activity of the thermophilic ferulic acid esterases

应系统中添加工业酶, 大大增加了生产工艺难度和能源成本, 而嗜热酶的应用不仅降低了反应系统的冷却能耗, 还可减少杂菌的滋生污染, 也有利于反应产物的回收, 因此嗜热酶的开发已成为研究热点^[25-27]。本文的研究结果表明, XynZ 的重组 FAE 酶及 FAE-CBM6 酶发挥催化活性的适宜 pH 值为 5.0–9.0, 适宜温度为 50–70 °C, 适宜的 pH 和温度范围比较宽, 因此, 进一步对这些重组嗜热 FAE 酶进行优化改造, 提高它们对阿魏酸酯化物的降解效率, 将在生物能源、食品、医疗保健、饲料等行业中具有广阔的应用前景。Blum 等^[17]认为 XynZ 的重组 FAE 酶催化反应的适宜 pH 值为 4.0–7.0, 适宜温度为 50–60 °C, 与本研究的结论存在一定的差异, 这可能是由于测定阿魏酸酯酶活性时采用了不同的底物和缓冲液类型所致^[28-29]。

Khan 等^[18]曾将 *C. thermocellum* XynZ 中的 CBM6 结合域与其 C-端木聚糖酶催化域按不同方式进行重组并表达, 结果发现这些带有 CBM6 结合域的木聚糖酶重组蛋白的酶催化活性反而大幅度降低。Blum 等^[17]利用蛋白质截短检测试验证明, 该 CBM6 结合域也并非 XynZ 蛋白中 FAE 酶催化域发挥阿魏酸酯酶活性所必需的结构。然而本研究结果显示, 尽管不带 CBM6 结合域的重组 FAE 酶仍能发挥较高的阿魏酸酯酶活性, 但相较而言, 在不同温度或 pH 下, 重组 FAE-CBM6 酶的酶活性显著高于重组 FAE 酶, 说明 CBM6 对重组 FAE 酶的酶活性有促进作用; 另一方面, CBM6 的存在也导致重组 FAE 酶的稳定性出现一定程度的下降, 包括对 pH、温度以及部分二价金属离子的耐受性。因此我们可以断定, 在 XynZ 这个双功能酶的结构中, CBM6 结合域的功能主要是协同阿魏酸酯酶催化域的活性, 从而参与对木质纤维素的降解转化, 但其具体的作用机制还有待进一步阐明。

目前已经有几个不同嗜热微生物来源的阿魏酸酯酶的酶学特性被表征, 由于这些酶所用的底物和反应条件不完全相同, 因此难以比较它们之间的酶催化活性高低。来源于 *Russula virescens* 的嗜热

阿魏酸酯酶需要在偏酸性(pH 4.0–6.0)条件下才能较好地发挥其水解活性,与此相反,其它来源于 *Clostridium stercorarium*^[12]、*Thermoanaerobacter tengcongensis*^[11,13]、*Thermobacillus xylanilyticus*^[14] 等的酶则是在偏碱性条件下才表现出较高的酶活性,而本研究中源自 *C. thermocellum* 的重组 FAE 酶及 FAE-CBM6 酶则拥有较宽的 pH 适用范围,在偏酸性或偏碱性(pH 5.0–9.0)环境中具有较高的酶活性。此外,目前已表征的嗜热阿魏酸酯酶的适宜温度一般在 50–75 °C 范围内,其中来源于 *T. xylanilyticus* 的阿魏酸酯酶对高温的耐受能力强,在 50 °C 下温育 24 h 其酶活性仅丧失了 16%,但在 65 °C 下酶的半衰期只有约 30 min^[14],本研究中尽管只检测了 *C. thermocellum* 重组嗜热 FAE 酶和 FAE-CBM6 酶在 2 h 内的热稳定性,但它们在 70 °C 和 75 °C 处理 2 h 后仍然保持着较高的酶活性。本研究中的重组嗜热 FAE 酶及 FAE-CBM6 酶所具备的 pH 适用范围广和高温稳定性强等特性将使它们在促进木质纤维素的生物降解转化中具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Zhang XM. Lignification and feruloylation in the cell wall of grass family[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2011, 30(6): 7-13 (in Chinese)
张晓民. 禾本科植物细胞壁的木质化和阿魏酰化[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 7-13
- [2] de Oliveira DM, Finger-Teixeira A, Mota TR, et al. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(9): 1224-1232
- [3] Várnai A, Costa THF, Faulds CB, et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, *p*-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 153
- [4] Zhang SB, Zhai HC, Wang L, et al. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 92(1): 36-40
- [5] Zeng Y, Gong YY, Wu MC, et al. Gene cloning, expression of a feruloyl esterase A and purification of its hydrolysis products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 425-434 (in Chinese)
曾妍, 龚燕燕, 邬敏辰, 等. 阿魏酸酯酶 A 的基因克隆与表达及其水解产物的纯化[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 425-434
- [6] Li XL, Fan YM, Fang BS. Purification and characterization of ferulic acid esterase from *Penicillium citrinum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 1058-1064 (in Chinese)
李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1058-1064
- [7] Zhou YY, Liu XL, Chen J, et al. Cloning of feruloyl esterase gene from *Aspergillus niger* h408 and high-efficient expression in *Pichia pastoris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(8): 876-881 (in Chinese)
周燕燕, 刘新利, 陈静, 等. 黑曲霉 h408 阿魏酸酯酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2014, 54(8): 876-881
- [8] Faulds CB, Williamson G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose[J]. Microbiology, 1994, 140(4): 779-787
- [9] Hunt CJ, Tanksale A, Haritos VS. Biochemical characterization of a halotolerant feruloyl esterase from *Actinomyces* spp.: refolding and activity following thermal deactivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(4): 1777-1787
- [10] Li JB, Cai SC, Luo YM, et al. Three feruloyl esterases in *Cellulosilyticum ruminicola* H1 act synergistically to hydrolyze esterified polysaccharides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(17): 6141-6147
- [11] Wang L, Zhang R, Ma ZQ, et al. A feruloyl esterase (FAE) characterized by relatively high thermostability from the edible mushroom *Russula virescens*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(2): 993-1003
- [12] Donaghy JA, Bronnenmeier K, Soto-Kelly PF, et al. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(3): 458-466
- [13] Abokitse K, Wu MQ, Bergeron H, et al. Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(1): 195-203
- [14] Rakotoarivonina H, Hermant B, Chabbert B, et al. A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 541-552
- [15] Lu YP, Zhang YP, Lynd LR. Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(44): 16165-16169
- [16] Grépinet O, Chebrou MC, Béguin P. Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*xynZ*) of *Clostridium thermocellum*[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(10): 4582-4588
- [17] Blum DL, Kataeva IA, Li XL, et al. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(5): 1346-1351
- [18] Khan MIM, Sajjad M, Sadaf S, et al. The nature of the carbohydrate binding module determines the catalytic efficiency of xylanase Z of *Clostridium thermocellum*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 403-408
- [19] Niu S. Research on the enzymatic properties and hydrolysis function of recombinant ferulic acid esterase[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2012 (in Chinese)
牛双. 重组阿魏酸酯酶的酶学性质及水解功能研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2012
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [21] Ou SY, Li Y, Gao KR. A study on OH scavenging activity of dietary fibre from wheat bran[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 1999, 21(2): 75-79 (in Chinese)
欧仕益, 李炎, 高孔荣. 麦麸膳食纤维清除自由基的研究[J].

- 营养学报, 1999, 21(2): 75-79
- [22] Fang Y, Ou SY, Zhang N. Preparation and enzymatic properties of ferulic acid esterase[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2012, 33(5): 481-485 (in Chinese)
方园, 欧仕益, 张宁. 阿魏酸酯酶的制备及其酶学性质[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2012, 33(5): 481-485
- [23] Gong YY, Yin X, Wu MC, et al. Cloning, expression and enzymatic characterization of feruloyl esterase A from *Aspergillus usami*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(7): 706-712 (in Chinese)
龚燕燕, 殷欣, 邬敏辰, 等. 宇佐美曲霉阿魏酸酯酶 A 基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 706-712
- [24] Zhang ZQ, Wang X, Yao YY, et al. Determination of ferulic acid in wheat bran: ultrasonic assisted alkaline-alcohol extraction and HPLC detection[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(4): 89-92 (in Chinese)
张志清, 王潇, 姚艳艳, 等. 超声波辅助碱醇提取 HPLC 测定麦麸中阿魏酸含量[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(4): 89-92
- [25] Bhalla A, Bansal N, Kumar S, et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes[J]. Bioresource Technology, 2013, 128: 751-759
- [26] Guerriero G, Hausman J, Strauss J, et al. Destructuring plant biomass: Focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases[J]. Plant Science, 2015, 234: 180-193
- [27] Khare SK, Pandey A, Larroche C. Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 102: 38-44
- [28] Zhuge B, Yao HY, Zhuge J. Studies on amino acid residues in the active site of raw-starch enzyme and regulation of the enzyme synthesis of *Rhizopus* OR-1 UVN[J]. Industrial Microbiology, 2002, 32(3): 24-27 (in Chinese)
诸葛斌, 姚惠源, 诸葛健. 生淀粉糖化酶催化位点氨基酸及酶合成调控的初步研究[J]. 工业微生物, 2002, 32(3): 24-27
- [29] Li Q, Zhao DX, Liu SP, et al. Study on enzymatic characteristics of different sources of laccases[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2014, 38(3): 93-97 (in Chinese)
李琦, 赵东霞, 刘世萍, 等. 不同来源重组漆酶的酶学特性[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(3): 93-97

征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白质组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012、2013、2014、2015 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续 4 年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014 年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助; 2015 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2017 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413