



研究报告

源于解淀粉芽胞杆菌酚酸脱羧酶的克隆与表达

夏瑛^{1,4} 李良² 董孝元³ 巩园园^{1,4} 方尚玲^{1,4} 陈茂彬^{1,4} 李琴^{*1,4}

1 湖北工业大学生物工程与食品学院 湖北 武汉 430068

2 黄鹤楼酒业有限公司 湖北 武汉 430050

3 武汉雅仕博科技有限公司 湖北 武汉 430050

4 湖北省酿造工艺与装备工程技术中心 湖北 武汉 430068

摘要:【背景】酚酸脱羧酶催化分解酚酸产生的 4-乙烯基酚类物质可用于食品添加剂及香精香料行业,而酚酸脱羧酶的表达水平相对较低,因此,高水平的酚酸脱羧酶是工业规模生产 4-乙烯基酚类物质的先决条件。【目的】克隆解淀粉芽胞杆菌的酚酸脱羧酶基因,实现在大肠杆菌中的高效异源表达,分析酚酸脱羧酶的底物特异性,并对其表达条件进行优化。【方法】通过 PCR 技术获得酚酸脱羧酶的基因,构建重组基因工程菌,将测序结果与其他酚酸脱羧酶序列进行比对,利用 IPTG 诱导方法高效表达蛋白。将重组酚酸脱羧酶与 4 种不同的底物进行反应,设计响应面试验对诱导条件进行优化。【结果】酚酸脱羧酶对对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、芥子酸的比酶活比率为:100:23.33:15.39:10.51。结合与其他酚酸脱羧酶比对结果发现酚酸脱羧酶家族的 C 末端区域氨基酸序列的变异率最高,这与酚酸脱羧酶的底物特异性和催化机制有关。通过单因素和响应面试验得到酚酸脱羧酶诱导表达的最佳条件为:2×YT 培养基,诱导温度 30 °C,接种量 1.78%,诱导时机 3.8 h, IPTG 1.25 mmol/L,诱导时间 18 h,此时预测酶活和实际酶活分别为 47.61 IU/mL 和 47.55 IU/mL。

【结论】应用响应面法优化酚酸脱羧酶的诱导表达是可行的,本试验为以后生产稳定、高产的酚酸脱羧酶以及了解其催化机理提供了重要的理论基础。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌, 酚酸脱羧酶, 克隆表达, 底物特异性

Cloning and expression of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus amyloliquefaciens*

XIA Ying^{1,4} LI Liang² DONG Xiao-Yuan³ GONG Yuan-Yuan^{1,4}
FANG Shang-Ling^{1,4} CHEN Mao-Bin^{1,4} LI Qin^{*1,4}

1 School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China

2 Huanghelou Liquor Company Limited, Wuhan, Hubei 430050, China

3 Wuhan Yashibo Technology Company Limited, Wuhan, Hubei 430050, China

4 Center for Brewing Technology and Equipment Research of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430068, China

Abstract: [Background] 4-vinylphenols produced by phenolic acid decarboxylase catalytic degradation of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31901634)

***Corresponding author:** E-mail: 1788820100@163.com

Received: 18-03-2020; **Accepted:** 09-06-2020; **Published online:** 14-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31901634)

***通信作者:** E-mail: 1788820100@163.com

收稿日期: 2020-03-18; 接受日期: 2020-06-09; 网络首发日期: 2020-06-14

phenolic acid can be used in food additives, flavor and fragrance industries. The expression level of phenolic acid decarboxylase is relatively low, so high levels of phenolic acid decarboxylase are a prerequisite for the industrial scale production of 4-vinylphenols. **[Objective]** The gene of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus amyloliquefaciens* was cloned to achieve efficient heterologous expression in *E. coli*. The substrate specificity of phenolic acid decarboxylase was analyzed and its expression conditions were optimized. **[Methods]** The gene of phenolic acid decarboxylase was constructed using PCR to construct a recombinant genetically engineered bacterium. The sequencing results were compared with the phenolic acid decarboxylase family, and IPTG was used to induce protein expression. It was reacted with four different substrates, and response surface experiments were designed to optimize the inducing conditions. **[Results]** The specific enzyme activity ratios of phenolic acid decarboxylase to p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, and sinapic acid were: 100, 23.33, 15.39, 10.51. Combined with the comparison results with other phenolic acid decarboxylase, it was found that the amino acid sequence of the C-terminal region had the highest rate of variation, which was related to the substrate specificity and catalytic mechanism of the phenolic acid decarboxylase. The optimal conditions for expression of phenolic acid decarboxylase by designing response surface experiments were: 2×YT medium, inducing temperature 30 °C, inoculation amount 1.78%, inducing point 3.8 h, IPTG 1.25 mmol/L, inducing time 18 h, the predicted value and actual enzyme activity were 47.61 IU/mL and 47.55 IU/mL, respectively. **[Conclusion]** It is feasible to optimize the induced expression of phenolic acid decarboxylase by response surface methodology. This study provides an important theoretical basis for the production of stable and high-yield phenolic acid decarboxylase and understanding of its catalytic mechanism.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, Phenolic acid decarboxylase, Cloning and expression, Substrate specificity

酚酸(phenolic acids)存在于植物中,是一类含有酚环的有机酸的统称,可以抵抗病原体^[1-2]。酚酸是参与细胞壁中纤维素、半纤维素和木质素分子键之间的重要植物化合物,在哺乳动物的饮食中很重要,它们的特定结构赋予酚酸重要的生物活性,能够清除自由基,具有良好的保健功效^[3]。酚酸主要包括苯甲酸类衍生物及肉桂酸类衍生物(cinnamic acids),其中苯甲酸类衍生物主要包括没食子酸(gallic acid)、原儿茶酸(protocatechuic acid)等,肉桂酸类衍生物主要为对香豆酸(p-coumaric acid)、阿魏酸(ferulic acid)、咖啡酸(caffeic acid)、芥子酸(sinapic acid)等^[4]。肉桂酸类衍生物是自然界中大量存在的天然芳香族化合物,在农业副产品中有重要的开发价值,具有一定的食药价值^[5]。

一些细菌体内有一种能够合成使酚酸脱羧的排毒系统,释放二氧化碳并产生毒性较小的称为乙烯基衍生物的化合物,此反应由酚酸脱羧酶(phenolic acid decarboxylase, PAD)进行介导^[6]。酚

酸脱羧酶是一种能够催化酚酸类物质发生非氧化脱羧反应(nonoxidative decarboxylation)的蛋白酶,可以催化分解酚酸类物质产生 4-乙烯基衍生物。已有报道指出多种菌株都能够降解酚酸类物质,并对不同菌株的酚酸脱羧酶行了报道^[7]。自从 Zago 等^[8]于短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)中克隆得到酚酸脱羧酶基因,在大肠杆菌中成功表达并证明了其对阿魏酸的脱羧作用后,已有研究从植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、肠杆菌等菌株中克隆到相应基因,并进行了一系列酶学性质的研究^[9]。阿魏酸经酚酸脱羧酶催化生成的 4-乙烯基酚类物质是生产香兰素(4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)的前体^[10]。4-乙烯基愈创木酚(4-vinylguaiacol)及 4-乙烯基苯酚(4-vinyl phenol)都是酚酸类物质的 4-乙烯基衍生物,有独特的气味,具有挥发性;其中,4-乙烯基苯酚有药物和辛香风味,可用于食品添加剂及香精香料行业^[11-12],对葡萄酒和其他发酵食品和饮料的香气形成具有重大

贡献^[13]。作为生产 4-乙烯基衍生物的关键酶之一,寻找适用于工业生产的酶资源已成为必然需求。市场上发现的大多数 4-乙烯基衍生物都是化学合成的,需要更多的前体材料。其中一些还需要更严格的试验条件,例如微波加热、高温和高压^[14],这在食品工业中具有巨大的隐患,因此,生物合成方法具有很大的应用潜力。同时,酚酸是一种存在于自然界中相对便宜且可再生的天然原料,以其为原料通过生物合成方法生产 4-乙烯基衍生物是可行的。但是,由于酶易失活及受培养条件的影响,目前通过酚酸脱羧酶催化酚酸生成 4-乙烯基衍生物的产率较低^[15]。

本文以解淀粉芽胞杆菌为研究对象,通过克隆表达得到酚酸脱羧酶的重组菌株,研究该酶对咖啡酸、对香豆酸、芥子酸、阿魏酸的比酶活,并与其他酚酸脱羧酶的氨基酸序列和结构进行比较,尝试进一步了解其催化机理。通过设计响应面试验,对影响酚酸脱羧酶活性影响较大的因素(接种量、诱导时机、IPTG 量、诱导温度、诱导时间、培养基)进行优化,从而提高酚酸脱羧酶的表达水平,以期为实现酚酸脱羧酶的实际应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

解淀粉芽胞杆菌,本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21(DE3),天根生化科技(北京)有限公司;质粒 pMD18-T 和 *Taq* 聚合酶, TaKaRa 公司;质粒 pET-28a(+), Novagen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

细菌 DNA 试剂盒和质粒提取试剂盒, Biomiga 公司;限制性内切酶 *Nco* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;对香豆酸、咖啡酸、芥子酸、阿魏酸、4-乙烯基衍生物,上海源叶生物技术有限公司。

超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物技术有限公司;MiniProGel 蛋白制胶与电泳系统,上海碧云天

生物技术有限公司;高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 克隆与表达

根据细菌 DNA 试剂盒说明书从解淀粉芽胞杆菌中提取总 DNA,根据 NCBI 上(登录号: NC_000964.3)酚酸脱羧酶的基因序列设计该基因的特异性引物,正向引物序列: 5'-CATGCCATGGC CATGGAAACTTTATCGGAAGCCATA-3',反向引物序列: 5'-CCGCTCGAGTTTAAATTTTCCCGCGC GAATA-3',有下划线的表示扩增相应的基因序列,没有下划线的表示与载体之间能够同源重组的序列。PCR 反应体系(25 μ L): 17.2 μ L 灭菌水, 10 \times Ex *Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 正、反向引物(20 mmol/L)各 1 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, Ex *Taq* (5 U/ μ L) 0.3 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。通过 PCR 扩增得到的酚酸脱羧酶基因与 pMD18-T 连接, 转染至大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆测序验证并保存。基于载体上携带的抗性基因, 每 100 mL 培养基中添加 100 μ L 的 100 mg/mL 氨苄抗生素。提取重组质粒扩增目的基因进行双酶切(*Nco* I 和 *Xho* I), 与 pET-28a(+)连接并转染至大肠杆菌 BL21(DE3), LB 培养基中培养并测序验证。构建成功的重组质粒在 250 mL 锥形瓶中扩大培养, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 下培养 3.5 h, 添加 200 μ L 的 500 mmol/L IPTG 在 21 $^{\circ}$ C、180 r/min 下诱导表达 18 h, 每 100 mL 培养基中添加 100 μ L 的 100 mg/mL 卡那抗生素。

1.4 酶的纯化和表达量测定

经诱导表达获得的菌液于 8 000 r/min 离心 5 min 取下层沉淀,加入 10 mL 浓度为 50 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0)重悬。超声波处理酶液的参考系数为: 每次处理的菌悬液为 10 mL, 输出功率 300 W, 间歇时间 5 s, 工作时间 5 s, 全部时间 15 min。8 000 r/min 离心 5 min 取上清液得到粗酶液。在 ÄKTA FPLC 纯化系统上使用镍琼脂糖凝胶柱(1 \times 10 cm)和 50 mmol/L

磷酸盐缓冲液(pH 7.8)纯化粗酶液,该缓冲液分别由 300 mmol/L 的 NaCl 和不同浓度(40、45、250 mmol/L)的咪唑组成。在 SDS-PAGE 上电泳分析空载的大肠杆菌 BL21(DE3)蛋白质样品、粗酶液蛋白质样品和纯化的酶液蛋白质样品,并通过考马斯亮蓝染色将凝胶中的蛋白质可视化,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。

1.5 酶活力测定

分别将底物阿魏酸、对香豆酸、咖啡酸和芥子酸配制成 50 mmol/L 的溶液,反应体系为 1 mL,含有 0.8 mL Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 6.0)、0.1 mL 的 50 mmol/L 底物、0.1 mL 酚酸脱羧酶液,37 °C 水浴反应 5 min 后加入 2 mL 甲醇终止反应。0.22 μm 滤膜过滤后用 HPLC 测定生成的 4-乙烯基衍生物含量。将 0.1 mL 酶液替换成 0.1 mL 缓冲液,并在相同条件下反应的样品为对照。

定义每分钟产生 1 μmol 4-乙烯基衍生物的酶量为 1 IU,酚酸脱羧酶活力单位为 IU/mL。

$$\text{酚酸脱羧酶活力(IU/mL)} = \frac{c \times x}{V \times T}$$

c : 所加酶液的量(mL); x : 根据标准曲线计算出的 4-乙烯基衍生物含量(mmol/L); V : 酶促反应体系的最终体积(mL); T : 酶促反应时间(min)。

用 UltiMate 3000 高效液相色谱(HPLC)进行测定。Hypersil GOLD C18 色谱柱(3 μm , 4.6×250 mm)。流动相 甲醇:0.1% 乙酸=40:60 (体积比),流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL ,检测波长 280 nm。

比酶活单位定义为单位重量蛋白质(mg)所具有的酶活性单位(IU/mg)。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定添加到反应系统中蛋白质的量,通过计算得到酚酸脱羧酶对不同底物的比酶活。

1.6 单因素试验

采用控制变量法,在其他条件不变的情况下只改变一个因素,研究培养基、诱导温度、接种量、IPTG 量、诱导时间(加入 IPTG 之后的培养时间)和诱导时机(加 IPTG 前的培养时间)对蛋白表达水平

的影响。

1.6.1 培养基对酚酸脱羧酶表达的影响

在接种量 1.0%、500 mmol/L IPTG 200 μL 、诱导时间 18 h、诱导温度 21 °C、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究培养基 LB、2×YT、SB、SOC、MTB^[16]对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.6.2 诱导温度对酚酸脱羧酶表达的影响

在 LB 培养基中接种量 1.0%、500 mmol/L IPTG 200 μL 、诱导时间 18 h、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究诱导温度为 21、24、27、30、33 °C 对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.6.3 诱导时机对酚酸脱羧酶表达的影响

在 LB 培养基中诱导温度 21 °C、接种量 1.0%、500 mmol/L IPTG 量为 200 μL 、诱导时间 18 h 的条件下,研究诱导时机为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 h 对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.6.4 诱导时间对酚酸脱羧酶表达的影响

在 LB 培养基中诱导温度 21 °C、接种量 1.0%、500 mmol/L IPTG 量为 200 μL 、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究诱导时间为 12、15、18、21、24 h 对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.6.5 IPTG 量对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

在 LB 培养基中诱导温度 21 °C、接种量 1.0%、诱导时间 18 h、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究 500 mmol/L IPTG 量为 100、150、200、250、300 μL 对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.6.6 接种量对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

在 LB 培养基中诱导温度 21 °C、500 mmol/L IPTG 量 200 μL 、诱导时间 18 h、诱导时机 3.5 h 的条件下,研究接种量为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%对酚酸脱羧酶诱导表达的影响。

1.7 响应面设计

在单因素试验的基础上,分析得到对酶活影响变化最大的 3 个因素,采用 Central Composite 的设计原理,以诱导温度、诱导时机和接种量为自变量,酚酸脱羧酶酶活为响应值进行响应面设计,响应面设计因素与水平见表 1。

表 1 Central Composite 试验因素与水平
Table 1 Central Composite test factors and levels

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	0
A 诱导温度 Inducing temperature (°C)	27	30	33
B 诱导时机 Inducing point (h)	3	3.5	4
C 接种量 Inoculum size (%)	1	1.5	2

2 结果与讨论

2.1 酚酸脱羧酶基因的克隆及表达

以解淀粉芽胞杆菌 DNA 为模板, PCR 扩增得到目的片段, 通过琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示, 该片段全长为 489 bp, 编码 162 个氨基酸。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析的结果如图 2 所示,

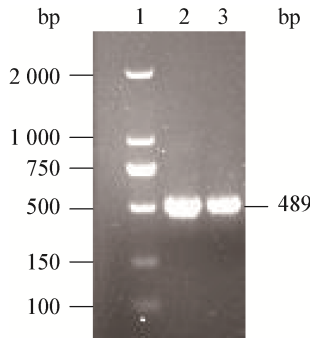


图 1 酚酸脱羧酶的琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA of BAPAD
注: 1: DL2000 DNA Marker; 2、3: 酚酸脱羧酶的 DNA 片段。
Note: 1: DL2000 DNA Marker; 2, 3: DNA of BAPAD.

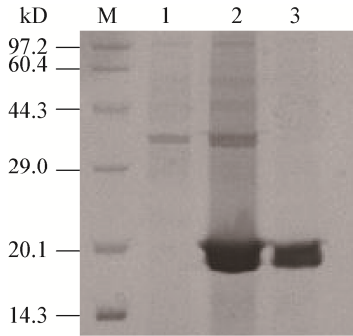


图 2 酚酸脱羧酶的 SDS-PAGE 凝胶电泳图
Figure 2 Analysis of BAPAD by SDS-PAGE
注: M: Protein Marker; 1: 空白对照[pET-28a(+)]空载体; 2: 粗酶液; 3: 纯化的酶液。
Note: M: Protein Marker; 1: Blank control with the empty vector; 2: Crude BAPAD; 3: Purified BAPAD.

重组酚酸脱羧酶(BAPAD)的分子量约为 19.2 kD。

2.2 酚酸脱羧酶的底物特异性及序列比对

分别以对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、芥子酸为底物与酚酸脱羧酶液反应, 再利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得酚酸脱羧酶的蛋白浓度, 计算得到其对不同底物的比酶活, 结果如表 2 所示。将对香豆酸的比酶活定义为 100%, 对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、芥子酸的比酶活比率为 100:23.33:15.39:10.51, 可知酚酸脱羧酶对对香豆酸的脱羧能力最强, 而对阿魏酸、咖啡酸和芥子酸的脱羧能力依次降低, 这与绝大多数的酚酸脱羧酶相同, 如 CgPAD (100:89:8)^[17]和 BLPAD (100:75:34)^[11]。值得注意的是, 本实验室的酚酸脱羧酶对芥子酸也有一定的脱羧能力, 芥子酸在 5 位上带有一个甲氧基, 其脱羧产物是菜籽多酚(canolol, 4-vinylsyringol)^[11]。菜籽多酚具有抗氧化、抗癌、抗病变等生理功能^[18], 有很高的营养和医学价值。具有这种特性的酚酸脱羧酶可以发展成生产菜籽多酚的潜在生物催化剂, 具有一定的应用价值^[19]。

目前对酚酸脱羧酶家族代表成员植物乳杆菌 PDBID1 (登录号: ZP_07078975.1)的晶体结构进行了报道, 并对其活性位点和催化机理已有一定的见解^[20], 其二级结构如图 3A 所示、拓扑结构如图 3B 所示。酚酸脱羧酶亚基由两个相互扭曲且正交排列的 β 折叠片(由四条反向平行的 β 折叠链构成)以及一个由十几个氨基酸残基组成的其他 β 链(β_9)组成的 β 桶状构成, 最后的 β_9 链以氢键结合到两个折

表 2 酚酸脱羧酶的底物特异性
Table 2 Substrate specificity of BAPAD

底物 Substrate	底物特异性 Specific activity (IU/mg)
对香豆酸 p-coumaric acid	13.22±0.17
阿魏酸 Ferulic acid	3.09±0.09
咖啡酸 Caffeic acid	2.02±0.02
芥子酸 Sinapic acid	1.39±0.03

为进一步探究酚酸脱羧酶的催化机理,将酚酸脱羧酶与植物乳杆菌 PDBID1、阿魏酸脱羧酶 PDBID3 (登录号: 311772160)^[21]以及其他相似的酚酸脱羧酶氨基酸序列进行比对,结果如图 4 所示。在以前的研究中,对来自植物乳杆菌^[20,22]、戊糖小球菌^[23]、枯草芽胞杆菌^[24]和短小芽胞杆菌^[8]的酚酸

培养基中碳源和氮源的合理添加能有效增加重组蛋白的产量^[27]，因此本试验选择了6种培养基进行优化。研究发现当酵母提取物添加到培养基中时，重组蛋白的产量和细胞生长水平更高，而其他选定的氮源对蛋白质的生产没有显著影响^[27]。如图5A所示，当选择2×YT（包括0.5%酵母提取物和1.6%蛋白胨）培养基时，酚酸脱羧酶的表达量高达41.93 IU/mL，略高于SOC培养基（包括0.5%酵母提取物、2%蛋白胨和0.36%葡萄糖）。



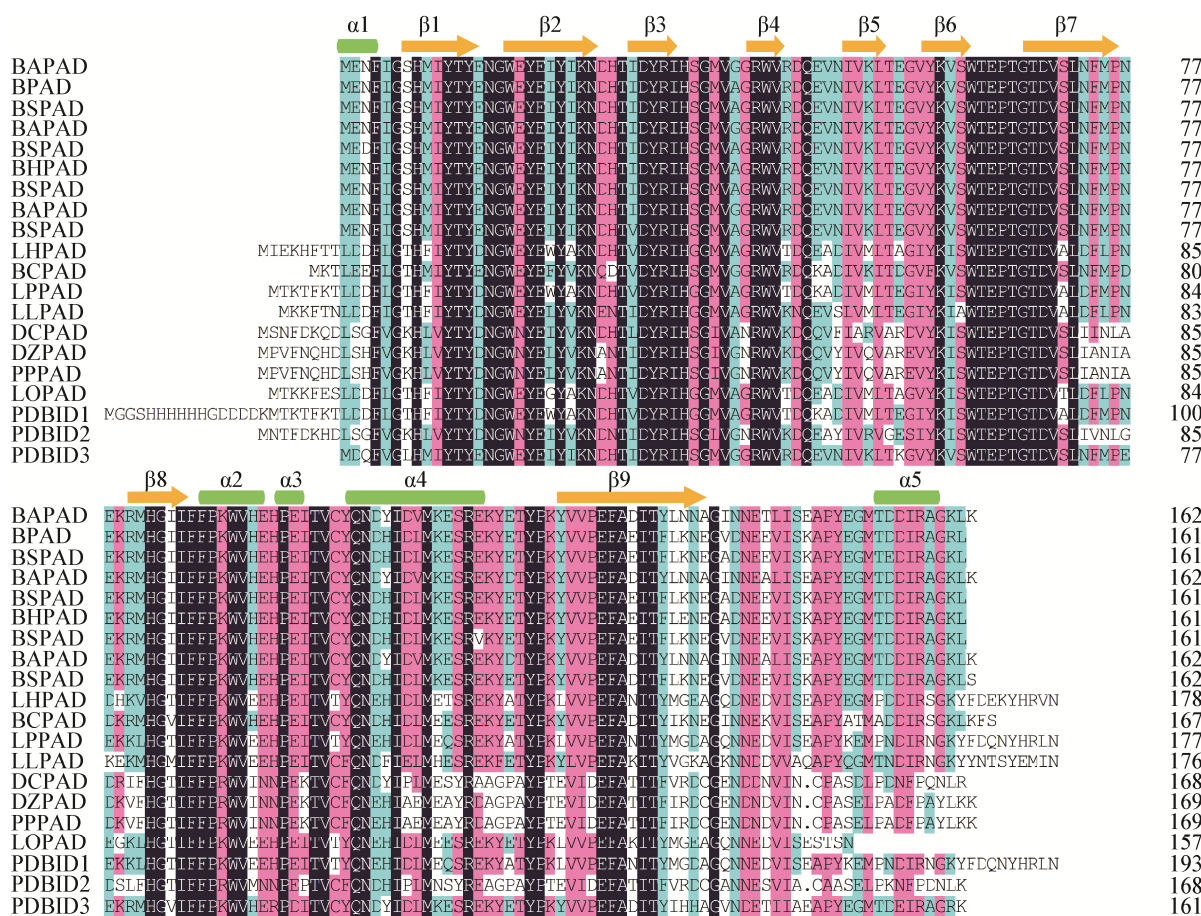


图4 酚酸脱羧酶和其他脱羧酶的氨基酸序列比对

Figure 4 Amino acid sequence alignment of phenolic acid decarboxylase and other decarboxylase

Note: The conventional secondary structure elements are represented by green boxes (α helix) and orange arrows (β chain), respectively. BAPAD is phenolic acid decarboxylase in this experiment, BPAD is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus*] [WP_003243190.1], BSPAS is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus subtilis*] (WP_19995789), BSPAS is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus subtilis*] (WP_087993521.1), BHPAD is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus halotolerans*] (WP_059292497.1), BSPAS is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus subtilis*] (WP_044429457.1), BAPAD is phenolic acid decarboxylase [*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7] (CB144424.1), BSPAD is a phenolic acid decarboxylase [*Bacillus subtilis*] (WP_019715805.1), LHPAD is a phenolic acid decarboxylase [*Lactobacillus northsea* JCM 18461] (BAP84656.1), BCPAD is a phenolic acid decarboxylase [*Bacillus coagulans* 36D1] (AEP00765.1), LPPAD is phenolic acid decarboxylase [*Lactobacillus plantarum*] (BBA81990.1), LLPAD is phenolic acid decarboxylase [*Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*] (BBC75390.1), DCPAD is phenolic acid decarboxylase [*Dickeya chrysanthemi* Ech1591] (ACT06933.1), DZPAD is phenolic acid decarboxylase [*Dickeya zeae* Ech586] (ACZ76892.1), PPPAD is phenolic acid decarboxylase [*Pectobacterium*] (ACX90155.1), LOPAD is phenolic acid decarboxylase [*Lactobacillus oryzae* JCM 18671] (GAK47549.1), PDBID1 is phenolic acid decarboxylase [*Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* ATCC 14917] (ZP_07078975.1), PDBID2 is a fruit acid decarboxylase [*Enterobacter* spp. Px6-4] (323462935), PDBID3 is a ferulate decarboxylase [*Bacillus pumilus*] (311772160).

2.3.2 诱导温度对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

诱导温度(加入 IPTG 后的培养温度)对于提高蛋白质产量具有重要意义^[27]。如图 5B 所示, 酚酸脱羧酶在诱导温度为 30 °C 时表达量达到最大值。宿主细菌的生长和外源蛋白质的合成受温度影响, 诱导温度升高能够加快宿主细菌的生长, 使异源蛋白质快速合成^[28]。但当温度过高时非活性包涵体蛋

白增加, 导致细菌死亡以及活性酶减少, Díaz-Rincón 等^[29]报道了这种在低温下培养并延长培养时间来促进蛋白质表达的策略。

2.3.3 诱导时机对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

重组酶的产生主要取决于培养过程中细胞密度和特异性^[30]。如图 5C 所示, 酚酸脱羧酶酶活性在诱导时机为 3.5 h 时最大, 达到 38.86 IU/mL。当

细胞密度过低时诱导培养导致细菌的代谢能力不够强, 细胞在后期阶段产生一定的代谢和生理负担, 从而影响蛋白质表达^[31]。当细胞密度太大时进行诱导, 培养基中的营养物质大量用于细菌的生长和繁殖而不是蛋白的表达^[30]。因此, 选择适当的诱导时机非常有必要。

2.3.4 诱导时间对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

如图 5D 所示, 酚酸脱羧酶酶活随着诱导时间的增加呈现先增加后减少的趋势, 当诱导时间为 18 h 时酶活达到最大。可能是因为前期细菌数量太少无法最大限度地利用营养物质合成酶, 随着诱导时间的继续增加, 培养基中有害代谢产物增加和营养物质消耗, 导致细胞衰老和蛋白自溶^[30]。

2.3.5 IPTG 量对酚酸脱羧酶诱导表达的影响

IPTG 是 β -半乳糖苷酶的活性诱导物质, 通常用于在乳糖操纵子下产生重组蛋白^[28]。如图 5E 所示, 当加入 IPTG 的量为 250 μ L, 此时培养基中 IPTG

的终浓度为 1.25 mmol/L, 酚酸脱羧酶活性达到 40.50 IU/mL。酶活性随 IPTG 量的继续增加而降低, 因为 IPTG 是一种高效的乳糖启动子诱导剂, 其潜在的毒性对细胞生长具有一定的抑制作用, 并且高浓度的 IPTG 会降低核糖体 RNA 的合成速率, 所以只能以相对较低浓度的 IPTG 诱导菌体的蛋白表达^[32-33]。

2.3.6 接种量对酚酸脱羧酶表达的影响

酶的生物合成受到菌株年龄和接种量的影响^[34]。如图 5F 所示, 当接种量为 1.5% 时, 酶活性达到最高值 38.86 IU/mL。酶活性随着接种量的继续增加而降低, 可能是由于菌生长速度加快以及所需营养物质短缺, 通过平衡可利用的养分能实现酶产量的最大化^[34]。

2.4 响应面试验

2.4.1 Central Composite 试验设计与结果

依据单因素试验结果, 运用 Design-Expert 8.0.6

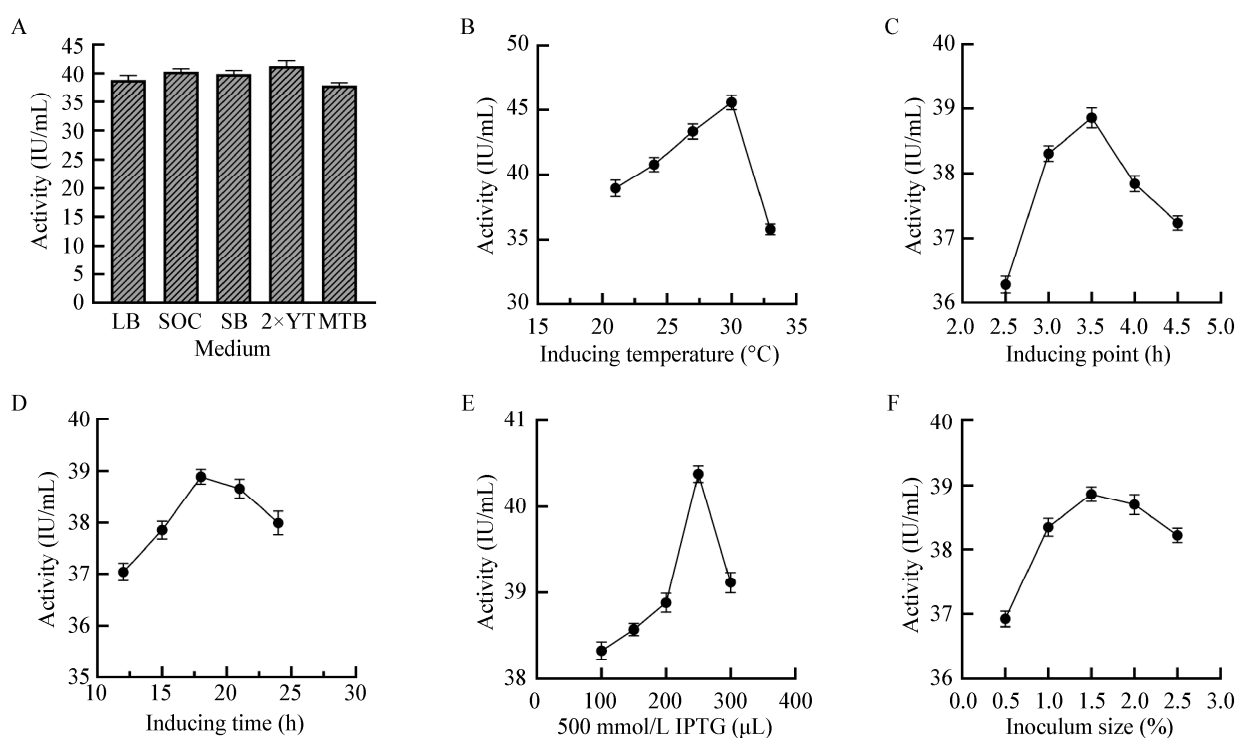


图 5 酚酸脱羧酶表达条件的优化

Figure 5 Optimization of expression conditions for BAPAD

注: A: 培养基; B: 诱导温度; C: 诱导时机; D: 诱导时间; E: 500 mmol/L IPTG 的量; F: 接种量。

Note: A: Medium; B: Inducing temperature; C: Inducing point; D: Inducing time; E: 500 mmol/L IPTG; F: Inoculum size.

中 Central Composite 试验方法，采用响应面分析法对酚酸脱羧酶诱导表达条件中的诱导温度、诱导时机、接种量进行优化，确定最佳的诱导表达条件。

试验设计及结果见表 3。
如表 4 所示，根据 F 值各个因素对试验结果影响次序为 $B>A>C$ ，即诱导时机>诱导温度>接种量。

表 3 Central Composite 试验方案与结果
Table 3 Central Composite test plan and results

序列 Sequence	A 诱导温度 Inducing temperature (°C)	B 诱导时机 Inducing point (h)	C 接种量 Inoculum size (%)	Y 酶活 Enzyme activity (IU/mL)
1	0.00	0.00	0.00	46.99
2	0.00	0.00	0.00	47.09
3	-1.00	1.00	1.00	43.06
4	0.00	0.00	0.00	47.03
5	-1.00	1.00	-1.00	40.28
6	1.00	-1.00	-1.00	39.55
7	1.00	-1.00	1.00	42.64
8	-1.00	-1.00	-1.00	36.01
9	0.00	0.00	0.00	47.20
10	0.00	0.00	1.68	43.87
11	0.00	0.00	-1.68	38.95
12	0.00	0.00	0.00	46.86
13	-1.00	-1.00	1.00	38.69
14	0.00	-1.68	0.00	39.39
15	1.00	1.00	-1.00	42.80
16	1.68	0.00	0.00	43.33
17	-1.68	0.00	0.00	37.89
18	0.00	0.00	0.00	46.93
19	0.00	1.68	0.00	45.57
20	1.00	1.00	1.00	44.98

表 4 回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance for regression models

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值(Prob>F) P value (Prob>F)
模型 Model	250.28	9	27.81	698.04	<0.000 1**
A 诱导温度 Inducing temperature	32.53	1	32.53	816.65	<0.000 1**
B 诱导时机 Inducing point	44.40	1	44.40	1 114.39	<0.000 1**
C 接种量 Inoculum size	26.45	1	26.45	663.81	<0.000 1**
AB	1.16	1	1.16	29.19	0.000 3**
AC	4.153E-0.003	1	4.153E-0.003	0.11	0.743 4
BC	0.082	1	0.082	2.06	0.181 9
A ²	76.22	1	76.22	1 913.13	<0.000 1**
B ²	38.69	1	38.69	971.25	<0.000 1**
C ²	58.62	1	58.62	1 471.48	<0.000 1**
残差 Residual	0.40	10	0.040		0.061 2
失拟 Lack of fit	0.33	5	0.065	4.54	
纯误差 Pure error	0.072	5	0.014		
总离差 Cor total	250.68	19			
$R^2=0.998\ 4\quad R^2_{adj}=0.997\ 0$					

注：**：对结果差异极显著($P<0.01$)；*：对结果差异显著($P<0.05$)。
Note: **: Very significant difference in results ($P<0.01$); *: Significant difference in results ($P<0.05$).

模型的 P 值 $<0.000\ 1$, 差异显著, 失拟项 $=0.061\ 2>0.05$, 表示纯误差不显著, 说明模型是有效的。其中一次项 A 、 B 、 C , 交互项 AB 及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 差异性显著, 说明相关因素对酚酸脱羧酶酶活影响较大。模型决定系数 $R^2=0.998\ 4$, 校正决定相关系数 $R^2_{\text{adj}}=0.997\ 0$, 说明可进行真实值的分析, 回归方程拟合度好, 能预测试验结果。综上所述, 该试验模型可用于优化对酚酸脱羧酶的诱导表达。

2.4.2 响应面分析与优化

根据回归方程绘制响应面分析图, 以确定诱导时机、诱导温度、接种量对酚酸脱羧酶的活力影响, AB 、 AC 、 BC 交互影响如图 6 所示, 其中 A 、 B 、 C 分别为自变量中的诱导温度、诱导时机、接种量。

响应面交互图和等高线图可以反映出各因素之间的相互作用。响应曲面的走势及坡度可体现因素对响应值的影响。由图 6 可知, 诱导温度与诱导时机交互作用、诱导温度与接种量交互作用、诱导时机与接种量交互作用的显著性情况与表 4 交互项 P 值的分析结果一致。响应面的坡度较为陡峭, 表明酚酸脱羧酶酶活对诱导温度与诱导时机、诱导温度与接种量、诱导时机与接种量的变化较为敏感^[35]。在诱导温度不变的情况下, 随着诱导时间的增加, 酚酸脱羧酶酶活呈现先增后减的变化趋势, 其他交互作用一致。等高线图呈圆形说明两因素的交互作用不明显, 呈椭圆形说明两因素之间的交互作用显著^[36]。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件分析, 酚酸脱羧酶的最佳诱导表达条件为: 诱导温度 $30\ ^\circ\text{C}$ 、诱导时机 $3.8\ \text{h}$ 、接种量 1.78% , 此条件下酚酸脱羧酶酶活的理论值为 $47.61\ \text{IU/mL}$ 。在响应面优化得到的最佳条件下进行 3 次平行试验, 平均酚酸脱羧酶酶活为 $47.55\ \text{IU/mL}$ 。实际测得的最终酶活与预测值非常接近, 说明应用响应面法优化酚酸脱羧酶的诱导表达是可行的^[37]。

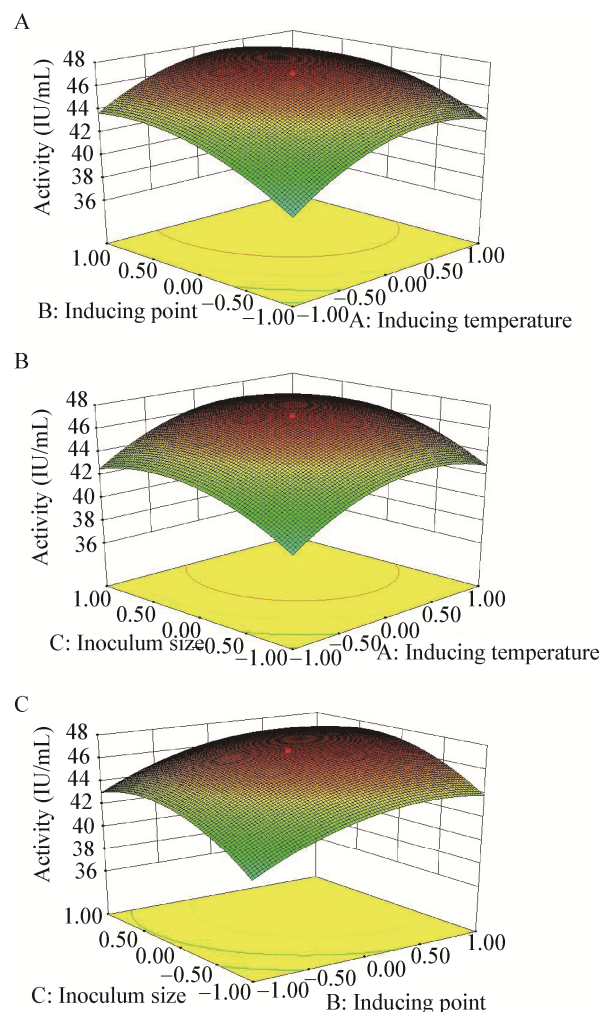


图 6 三维曲面图

Figure 6 3D-surface plot

注: A: 诱导时机与诱导温度之间交互作用的三维曲面图; B: 接种量与诱导温度之间交互作用的三维曲面图; C: 接种量与诱导时机之间交互作用的三维曲面图。

Note: A: 3D-surface plot showing interactions between inducing point and inducing temperature; B: 3D-surface plot showing interactions between inoculum size and inducing temperature; C: 3D-surface plot showing interactions between inoculum size and inducing point.

3 结论

本论文从解淀粉芽胞杆菌中克隆得到了酚酸脱羧酶的基因全长, 并在大肠杆菌 DH5 α 中予以克隆保存, 然后在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了异源表达, 研究酚酸脱羧酶对阿魏酸、对香豆酸、芥子酸和咖啡酸的比酶活力, 结合其与来源于其他菌株

的酚酸脱羧酶家族序列比对结果,发现 β 链的序列高度保守,而C端氨基酸序列高度变异,这与酚酸脱羧酶的催化机制高度相关,下一步我们将针对其序列片段进行研究,尝试了解其催化机理。本实验室的酚酸脱羧酶对对香豆酸的催化脱羧能力最强,对阿魏酸、咖啡酸、芥子酸的催化脱羧能力依次降低。该酶能够催化芥子酸生成具有高营养和医学价值的菜籽多酚 Canolol,可以进一步开发作为生产菜籽多酚的潜在生物催化剂。使用响应面设计和分析获得酚酸脱羧酶的最佳发酵条件,相比最初的表达量增加了23%左右,可为以后生产高产的酚酸脱羧酶提供重要的理论基础。

REFERENCES

- [1] Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(5): 1589-1615
- [2] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview[J]. The Scientific World Journal, 2013: 162750
- [3] Pei SP, Gao HY, Fang XJ, et al. Analysis of phenolic acids and antioxidant activity in red and white pitaya[J/OL]. Science and Technology of Food Industry. (2020-04-07). <https://www.cnki.net/KCMS/detail/11.1759.TS.20200407.1644.013.html> (in Chinese)
裴少培, 郜海燕, 房祥军, 等. 红肉与白肉火龙果酚酸组成及其抗氧化活性[J/OL]. 食品工业科技. (2020-04-07). <https://www.cnki.net/KCMS/detail/11.1759.TS.20200407.1644.013.html>
- [4] Gury J, Serraut H, Tran NP, et al. Inactivation of PadR, the repressor of the phenolic acid stress response, by molecular interaction with Usp1, a universal stress protein from *Lactobacillus plantarum*, in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5273-5283
- [5] Cross KJ, Huq NL, Palamara JE, et al. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(15): 15362-15369
- [6] Natella F, Nardini M, di Felice M, et al. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(4): 1453-1459
- [7] Parada-Fabián JC, Hernández-Sánchez H, Méndez-Tenorio A. Substrate specificity of the phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and related bacteria analyzed by molecular dynamics and docking[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2019, 28(1): 91-104
- [8] Zago A, Degraffi G, Bruschi CV. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4484-4486
- [9] Qi WW, Vannelli T, Breinig S, et al. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to *p*-hydroxystyrene[J]. Metabolic Engineering, 2007, 9(3): 268-276
- [10] Gu W, Li XM, Huang JW, et al. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter* sp. Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(6): 1797-1805
- [11] Hu HF, Li LL, Ding SJ. An organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus licheniformis* for the efficient bioconversion of hydroxycinnamic acids to vinyl phenol derivatives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5071-5081
- [12] Cui YQ, Cao XH, Wang CL, et al. Research progress of 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol in fermentation industry[J]. China Brewing, 2009(4): 14-17 (in Chinese)
崔云前, 曹小红, 王春玲, 等. 发酵行业 4-乙烯基愈创木酚和 4-乙基愈创木酚研究进展[J]. 中国酿造, 2009(4): 14-17
- [13] Ben-Bassat A, Breinig S, Crum GA, et al. Preparation of 4-vinylphenol using pHCA decarboxylase in a two-solvent medium[J]. Organic Process Research & Development, 2007, 11(2): 278-285
- [14] Mathew S, Abraham TEE, Sudheesh S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 44(2): 48-52
- [15] Pesci L, Baydar M, Glueck S, et al. Development and scaling-up of the fragrance compound 4-ethylguaiacol synthesis via a two-step chemo-enzymatic reaction sequence[J]. Organic Process Research & Development, 2007, 21(1): 85-93
- [16] Hu HF. An organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase BLPAD and its application in the bioproduction of 4-vinyl phenol derivatives[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2015 (in Chinese)
胡宏飞. 有机溶剂耐受性酚酸脱羧酶及其在生产 4-乙烯基酚类物质上的应用[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2015
- [17] Huang HK, Tokashiki M, Maeno S, et al. Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(1): 55-62
- [18] Nandasiri R, Eskin NAM, Thiyam-Höllander U. Antioxidative polyphenols of canola meal extracted by high pressure: impact of temperature and solvents[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(11): 3117-3128
- [19] Wakamatsu D, Morimura S, Sawa T, et al. Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil, canolol[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(8): 1568-1574
- [20] Rodríguez H, Angulo I, de las Rivas B, et al. *P*-coumaric

- acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism[J]. *Proteins*, 2010, 78(7): 1662-1676
- [21] Gu W, Yang JK, Lou ZY, et al. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16262
- [22] Cavin JF, Barthelmebs L, Diviès C. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(5): 1939-1944
- [23] Barthelmebs L, Lecomte B, Diviès C, et al. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(23): 6724-6731
- [24] Cavin JF, Dartois V, Diviès C. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1466-1471
- [25] Barthelmebs L, Diviès C, Cavin JF. Expression in *Escherichia coli* of native and chimeric phenolic acid decarboxylases with modified enzymatic activities and method for screening recombinant *E. coli* strains expressing these enzymes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(3): 1063-1069
- [26] Landete JM, Rodríguez H, Curiel JA, et al. Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(6): 617-624
- [27] Khalid A, Tayyab M, Hashmi AS, et al. Optimization of conditions for maximal production of recombinant thermostable cellulase from *Thermotoga naphthophila* using *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) as expression host[J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2019, 51(4): 1371-1377
- [28] Chai HJ, Zhao HQ, Zhang LJ, et al. Optimization of expression conditions for immunodominant membrane protein gene of phytoplasmas in *E. coli*[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(3): 520-524,557
- [29] Díaz-Rincón DJ, Duque I, Osorio E, et al. Production of recombinant *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in a new expression system based on *Wickerhamomyces anomalus*[J]. *Enzyme Research*, 2017, 2017: 6980565
- [30] Tong CN, Li SH, Sun X, et al. Optimization of expression of lactobiose phosphorylase[J]. *The Food Industry*, 2018, 39(11): 172-175 (in Chinese)
- 佟超男, 李苏红, 孙晓, 等. 乳二糖磷酸化酶的表达优化[J]. *食品工业*, 2018, 39(11): 172-175
- [31] Chen Y, Li L, Long L, et al. High cell-density cultivation of phenolic acid decarboxylase-expressing *Escherichia coli* and 4-vinylguaiacol bioproduction from ferulic acid by whole-cell catalysis[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2018, 93: 2415-2421
- [32] Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2689-2694
- [33] Rizkia PR, Silaban S, Hasan K, et al. Effect of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside concentration on prethrombin-2 recombinant gene expression in *Escherichia coli* ER2566[J]. *Procedia Chemistry*, 2015, 17: 118-124
- [34] Yang R, Fan GS, Li JL, et al. Screening of high-yield xylanase produced by recombinant *Pichia pastoris* and of its fermentation condition optimizing[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(12): 95-104 (in Chinese)
- 杨然, 范光森, 郇金龙, 等. 重组毕赤酵母高产木聚糖酶菌株筛选及发酵条件优化[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(12): 95-104
- [35] Zhou JH, Mao ZH, Chen MB, et al. Optimization of conditions for extraction of vanillic acid decarboxylase by ultrasonic crushing[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(7): 155-159 (in Chinese)
- 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
- [36] Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(5): 494-499
- [37] Guo YX, Pan DD. Optimization of ultrasonic extraction conditions of aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*[J]. *Food Science*, 2008, 29(8): 140-144 (in Chinese)
- 郭宇星, 潘道东. 超声波破碎法提取瑞士乳杆菌氨肽酶条件的优化[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 140-144