

阿魏酸酯酶 A 的基因克隆与表达及其水解产物的纯化

曾妍¹, 龚燕燕¹, 邬敏辰², 殷欣³, 唐存多³

1 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

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. 生物工程学报, 2014, 30(3): 425-434.
Zeng Y, Gong YY, Wu MC, et al. Gene cloning, expression of a feruloyl esterase A and purification of its hydrolysis products.
Chin J Biotech, 2014, 30(3): 425-434.

摘要: 为在毕赤酵母中表达来源于米曲霉 *Aspergillus oryzae* 的 A 型阿魏酸酯酶并研究其水解功能, 探讨大孔树脂对其水解产物阿魏酸的纯化条件及纯化效果, 以米曲霉 *A. oryzae* CICC 40186 总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 技术克隆出了米曲霉阿魏酸酯酶 A (AorFaeA) 成熟肽的编码基因 *AorfaeA*, 并借助 pPIC9K 质粒实现了其在毕赤酵母 GS115 中的异源表达。SDS-PAGE 分析结果显示纯化后的重组阿魏酸酯酶 (reAorFaeA) 为单一条带, 其表观分子质量约 39.0 kDa。以阿魏酸甲酯为底物, 经高效液相色谱法测得该酶的最高酶活为 58.35 U/mg。利用 reAorFaeA 和木聚糖酶复合酶水解去淀粉麦麸制备阿魏酸, 用大孔树脂纯化小麦麸皮阿魏酸粗提液, 所测树脂中 HPD-300 型大孔树脂的吸附量和解吸率较高, 以 50% 的乙醇为洗脱液, 当流速为 1.0 mL/min 时洗脱效果较好。在该纯化条件下, 阿魏酸的回收率为 92%, 质量分数由原材料中的 0.13% 富集提高到 10.55%。这些研究为阿魏酸的酶法“绿色生产”及应用奠定了坚实的理论基础。

关键词: 米曲霉, 阿魏酸酯酶 A, 克隆表达, 阿魏酸, 纯化

Received: July 25, 2013; **Accepted:** December 17, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31101229).

Corresponding author: Minchen Wu. Tel/Fax: +86-510-85329042; E-mail: biowmc@126.com

国家自然科学基金 (No. 31101229) 资助。

网络出版时间: 2014-02-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130377.html>

Gene cloning, expression of a feruloyl esterase A and purification of its hydrolysis products

Yan Zeng¹, Yanyan Gong¹, Minchen Wu², Xin Yin³, and Cunduo Tang³

¹ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

³ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To express feruloyl esterase A from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* expression system and study its hydrolysis function, explore the conditions and effects of purification for ferulic acid extracts by macroporous resin. Using the total RNA from *A. oryzae* CICC 40186 as the template, we amplified coding sequence *AorfaeA* encoding a mature feruloyl esterase A (AorFaeA) by RT-PCR technique. Then, the coding sequence *AorfaeA* was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115 mediated by an expression plasmid pPIC9K. The purified recombinant AorFaeA (reAorFaeA) showed one single band on SDS-PAGE with an apparent molecular weight of 39.0 kDa. The maximum activity of reAorFaeA to methyl ferulate, measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), was 58.35 U/mg. Then, reAorFaeA was used to release ferulic acid from de-starched wheat bran in the presence of xylanase. The purification tests for ferulic acid from the enzymatic hydrolysate were carried out with preselected macroporous resins. The results showed that macroporous resin HPD-300 had much higher adsorption and desorption capacities. Ferulic acid could be quantitatively recovered by 50% of the eluent concentration at a flow speed of 1 mL/min. Under the purification condition, the recovery ratio of ferulic acid was 92%, and the content of ferulic acid was increased from 0.13% in the raw material to 10.55%. This work exploits the breakdown of ferulic acid by recombinant enzyme and provides a good strategy to its "green production".

Keywords: *Aspergillus oryzae*, feruloyl esterase A, gene cloning and expression, ferulic acid, purification

阿魏酸酯酶 (Feruloyl esterase, E.C.3.1.1.73) 是羧酸酯水解酶的一个亚类,可以水解植物细胞壁中多糖与阿魏酸连接的酯键,并释放出游离的阿魏酸单体或二聚体。阿魏酸酯酶的来源比较广泛,目前已有许多关于微生物来源的阿魏酸酯酶的分离纯化、基因克隆和异源表达等^[1-3]的报道。Mathew 等^[4]对黄柄曲霉 *Aspergillus flavipes* 进行了液体深层发酵,获取了阿魏酸酯酶,最高酶活可达 6.82 U/mL。张帅兵等^[5]克隆了黑曲霉 *Aspergillus niger* 的 A 型阿魏酸酯酶基因,并在毕赤酵母中实现了异源表达,酶活为 16.6 U/mL。在食品和医药领域中,利用阿魏酸酯酶来降解植物细胞壁中的阿魏酸酯键,可以得到有药用价值

和保健功能的游离阿魏酸^[6-7]。阿魏酸是桂皮酸的一种衍生物,其化学名称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸,也是一种天然的抗氧化剂,对心血管疾病、糖尿病、老年痴呆症和肿瘤等疾病有治疗作用^[8-9]。目前阿魏酸的生产方法主要包括化学合成法和碱解法,但这两种方法均存在一定的缺陷^[10]。化学合成法反应步骤多、周期长;碱解法的原料谷维素在米糠中含量低,产量受限;此外,这两种方法都具有污染性,因此酶法生产阿魏酸成为近年来研究的热点^[11]。然而,酶解液是一个复杂的体系,从中分离出阿魏酸仍比较困难。寻找合适的阿魏酸纯化工工艺也是实现阿魏酸工业化生产所需要突破的一个瓶颈。

米曲霉 *Aspergillus oryzae* 安全性高、不产毒素,应用于食品工业历史悠久^[12],因此从米曲霉中提取的阿魏酸酯酶应用于药品、食品等行业安全性也很高。另外,目前国内外均未见关于米曲霉阿魏酸酯酶 A 基因克隆与表达的研究报道。本研究利用购买的具有产阿魏酸酯酶能力的 *A. oryzae* CICC 40186 菌株,结合生物信息学分析的手段,借助 RT-PCR 技术克隆了编码米曲霉阿魏酸酯酶 A (AorFaeA) 的 cDNA 片段,并实现了其在毕赤酵母 GS115 中的分泌表达。此外,研究了利用大孔树脂从小麦麸皮酶解液中分离阿魏酸的工艺条件。本研究为阿魏酸的酶法“绿色生产”及应用奠定了坚实的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和载体

米曲霉 *A. oryzae* 购自中国工业微生物菌种保藏中心,编号为 CICC40186;大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 DH5 α 、毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和表达载体 pPIC9K 为本实验室保存;克隆载体 pUCm-T 购自上海 Sangon 生物工程有限公司;GS115/*Aoxyn11A* 由本实验室构建与保存^[13]。

1.2 工具酶、引物和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Taq* 酶等工具酶购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司;PCR 引物由上海 Sangon 公司合成;PCR 产物纯

化试剂盒、DNA marker、蛋白质 marker、YNB、生物素、酵母粉、蛋白胨、geneticin G418、UNI-Q-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒和 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit 购自上海 Sangon 公司;标准反式阿魏酸与阿魏酸甲酯购自盐城朗德化学有限公司;大孔吸附树脂购自河北沧州宝恩化工有限公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 培养基

种子活化培养基:2%玉米粉,3%豆饼粉,3% KH_2PO_4 ,1% CaCl_2 ,1% MgSO_4 ;诱导培养基(用于总 RNA 的提取):0.9% NaNO_3 ,0.05% KH_2PO_4 ,0.05% MgSO_4 ,0.4%酵母提取物,20%麸皮提取液;LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基参考 Invitrogen 公司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册。

1.4 方法

1.4.1 引物设计及合成

根据 *A. oryzae* RIB40 菌株基因组中阿魏酸酯酶 A 的基因序列(GenBank Accession No. XM_001818700)和表达质粒 pPIC9K 上的多克隆位点,设计出一对扩增编码 AorFaeA 成熟肽 cDNA 的特异性上下游引物,向上游引物 FaeA-F 中引入 *EcoR* I 酶切位点,向下游引物 FaeA-R 中引入 *Not* I 酶切位点,引物由上海 Sangon 公司合成(表 1)。

表 1 扩增目的基因 *AorfaeA* 的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for amplification of target gene *AorfaeA*

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
FaeA-F (Forward)	<u>GAATTC</u> GCAATCACTCAGGGGATCT	25
FaeA-R (Reverse)	GCGGCCGCCTACCATGTACAGGCTCCG	27

The base sequences underlined are the restriction sites.

1.4.2 AorFaeA 成熟肽编码基因的克隆

将斜面保藏的 *A. oryzae* 菌种接种于种子活化培养基,于 30 °C、220 r/min 条件下培养 24 h,以 2%的接种量转至诱导培养基中,于同样条件下培养 24 h 后收集菌体,用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取 *A. oryzae* 的总 RNA。以总 RNA 为模板,参照 RT-PCR 试剂盒说明书,以 oligo (dT) 为引物逆转录合成 cDNA 的第一条链。然后以 cDNA 的第一链为模板,以 FaeA-F 为上游引物,依次以 oligo (dT)-M13 Primer M4 和 FaeA-R 为下游引物,进行两轮 PCR,扩增出编码 AorFaeA 成熟肽的 cDNA。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的条带。将回收的产物与 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* JM109,送上海 Sangon 测序,测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-AorfaeA。

1.4.3 AorFaeA 成熟肽编码基因在毕赤酵母中的表达

测序正确的重组质粒 pUCm-T-AorfaeA 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,将目的基因连接至表达质粒 pPIC9K,转化 *E. coli* DH5 α ,经测序鉴定,重组表达质粒命名为 pPIC9K-AorfaeA。pPIC9K-AorfaeA 用 *Sal* I 线性化,电转化毕赤酵母 GS115,涂布于 MD 平板上筛选重组子,取 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板上,筛选抗 4.0 mg/mL G418 的毕赤酵母重组子,命名为 GS115/AorfaeA。分别提取 GS115/AorfaeA 及 GS115/9K 基因组 DNA,利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 鉴定。重组酵母 GS115/AorfaeA 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析参见文献[14]和[15]。

1.4.4 重组阿魏酸酯酶 (reAorFaeA) 的分离纯化与活性测定

将诱导表达的发酵液加入固体 (NH₄)₂SO₄

粉末至 80%饱和度,10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀复溶于一定体积的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0),经超滤浓缩后过凝胶柱 Sephadex-75,收集洗脱峰用于酶活测定,并利用 Bradford 法测定蛋白含量^[16]。

reAorFaeA 酶活测定参照 Zhang 等^[17]的方法略做改动。取 900 μ L 用 0.1 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)配制的 1 mmol/L 的阿魏酸甲酯于 EP 管中,45 °C 预热 10 min,加入 100 μ L 稀释适当倍数的酶液,准确反应 10 min 后加入 400 μ L 冰乙酸终止反应,立即混匀进行高效液相色谱 (HPLC) 分析,在 320 nm 下测定经 reAorFaeA 水解后产物中阿魏酸的释放量。以预先在酶溶液中加入 400 μ L 冰乙酸,再加底物溶液的反应物为对照。在上述反应条件下,每分钟产生 1 μ mol 阿魏酸所需的酶量定义为一个酶活性单位 (U)。

色谱条件:戴安 UltiMate-3000 高效液相色谱仪,C18 5 μ m ODS 反相色谱柱(260 mm \times 4.6 mm),柱温 30 °C,进样量 20 μ L。流动相组成为 A:100%甲醇,B:1%乙酸(V/V),一步梯度洗脱,0 min,50% B、10 min,20% B,UV 检测波长为 320 nm,洗脱流速为 1 mL/min。

1.4.5 阿魏酸粗提液的制备

按 1.4.3 诱导表达重组酵母 GS115/AorfaeA^[18]和 GS115/Aoxyn11A,分别获得 reAorFaeA 和重组木聚糖酶 (reAorXyn11A),reAorXyn11A 的酶活按文献[13]的方法测定。准确称取 0.5 g 去淀粉麸皮于 100 mL 锥形瓶中,加入 8 mL reAorFaeA 酶液(约 16.88 U)和 0.5 mL reAorXyn11A 酶液(约 72.5 515 U),用 0.1 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 5.0)定容至 30 mL,于 40 °C 酶解 10 h,煮沸 5 min

灭酶活,离心收集上清液即为阿魏酸粗提液。

1.4.6 大孔树脂的预处理

将大孔树脂置于容器中,用95%乙醇浸泡24 h使其充分溶胀,以乙醇湿法转移柱内(层析柱:2 cm×30 cm)继续用乙醇流动清洗,至1份乙醇加3份水不产生白色浑浊,再用清水冲洗至无醇味,备用。

1.4.7 静态吸附解吸

选择D-101、HPD-100、HPD-300、HP-20和AB-8五种型号树脂(表2),以阿魏酸吸附量和解吸率为标准,筛选最适树脂。称取处理好的树脂各1 g,分别加入所制备的阿魏酸粗提液50 mL,于25℃、120 r/min恒温振荡摇床上吸附24 h,测定上清液中阿魏酸的含量。用去离子水洗涤树脂后,加入95%乙醇50 mL,于25℃、120 r/min恒温振荡摇床上解吸附24 h,测定解吸液中阿魏酸的含量,计算各树脂的吸附量和解吸率。

1.4.8 大孔树脂纯化工艺

室温下,树脂装填量为50 mL,高度为15 cm。将阿魏酸粗提液浓缩至浓度为0.1 mg/mL,取10 mL上柱静置吸附2 h,水洗柱子每1个柱体积(BV)收集一份水洗液,检测水洗液中还原糖和阿魏酸的含量,还原糖和阿魏酸的测定分别采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法和HPLC法。至流出液中无还原糖时,用洗脱液洗脱,定量收集、测定洗脱液中阿魏酸的质量浓度,并计算回收率。洗脱液进行减压浓缩、干燥,测定总固体重量,同时计算阿魏酸粗提液总固体物中阿魏酸的质量分数和洗脱液总固体物中阿魏酸的质量分数(即纯度)。阿魏酸的回收率(%)=(洗脱液中阿魏酸的质量浓度×洗脱液体积)/(粗提液中阿魏酸的质量浓度×粗提液体积)×100%;

阿魏酸的纯度(%)=(洗脱液中阿魏酸的质量浓度×洗脱液体积)/洗脱液总固体质量×100%。

2 结果与分析

2.1 AorFaeA 成熟肽编码基因的克隆及表达质粒的构建

以 *A. oryzae* 的总 RNA 为模板, FaeA-F 分别和 oligo (dT) -M13 Primer M4、FaeA-R 为引物按照 1.4.2 中的方法进行两轮 RT-PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 第一轮 PCR 在约 1 000 bp 处出现一条特异性条带(图 1, 泳道 1), 第二轮 PCR 在约 800 bp 位置处出现一条特异性条带(图 1, 泳道 2), 其大小与预期的相符。将目的产物割胶回收后与质粒 pUCm-T 连接, 转化 *E. coli* JM109 获得重组质粒, 将重组质粒送上海 Sangon 公司测序。测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-AorfaeA。结果表明, 目的基因长度为 783 bp, 编码 260 个氨基酸。Blast 分析结果表明该序列与黑曲霉 *Aspergillus niger faeA* (GenBank Accession No. ADI70526.1) 的序列同源性为 71%, 与土曲霉 *Aspergillus terreus* NIH2624 *faeA* (GenBank Accession No. XP_001217493.1) 的序列同源性为 71%, 与塔宾曲霉 *Aspergillus tubingensis faeA* (GenBank Accession No. CAA70511.1) 的序列同源性为 74%。将重组质粒 pUCm-T-AorfaeA 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切及割胶回收, 与经同样双酶切后回收的质粒 pPIC9K 连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选获得重组质粒 pPIC9K-AorfaeA, 将重组质粒 pPIC9K-AorfaeA 送上海 Sangon 公司测序, 测序结果与预期的一致。

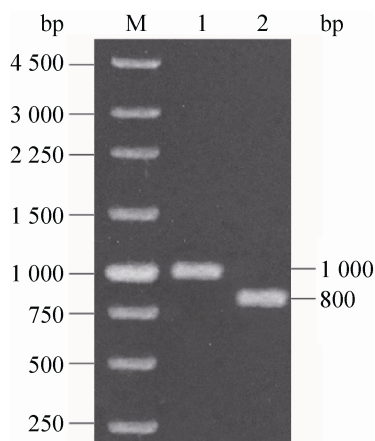


图1 *AorfaeA* PCR产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of *AorfaeA*. M: DNA marker; 1: the first round of PCR product; 2: the second round of PCR product.

2.2 *AorfaeA* 基因在毕赤酵母中的表达

参考 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册, 以及陈小芳等^[19]筛选高拷贝重组子所采用的方法, 转化子的拷贝数与其抗 G418 的能力有关 (如 0.5 mg/mL G418 对应于 1-2 个拷贝), 通过筛选抗高浓度 G418 的酵母即可获得高拷贝转化子。以筛选到的抗 4.0 mg/mL G418 高拷贝重组毕赤酵母 GS115/*AorfaeA* 的基因组为模板, 用 5'-AOX 和 3'-AOX 引物进行 PCR 检测, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示。结果显示以 GS115/*AorfaeA* 基因组为模板的 PCR 产物在约 1 300 bp 和 2 100 bp 处有两条特异性的条带 (图 2, 泳道 1), 而以 GS115/9K 基因组为模板的 PCR 产物在 500 bp 和 2 100 bp 处出现 DNA 条带 (图 2, 泳道 2), 结果表明目的基因 *AorfaeA* 已成功整合入 GS115 基因组内。挑取几个高拷贝的重组子按照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册中的方法进行诱导表达, 筛选到一个产酶活性最高的

GS115/*AorfaeA* 重组子, 其发酵上清液的酶活为 2.11 U/mL, SDS-PAGE 分析条带不唯一 (图 3, 泳道 1), 发酵上清液经硫酸铵沉淀及凝胶层析纯化后, SDS-PAGE 分析得到一条清晰的条带 (图 3, 泳道 2), 纯化后的酶液比酶活为 58.35 U/mg, 相比于 Koseki 等^[20]在毕赤酵母中表达的泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* *AwfaeA* 的酶活 (9.01±0.89) U/mg 达较高水平。SDS-PAGE 的结果显示 reAorFaeA 的表观分子量约为 39.0 kDa, 明显大于其理论分子量, 用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对翻译后加工的 N 糖基化位点进行预测, 结果表明 reAorFaeA 氨基酸序列中含有两个潜在 N-糖基化位点, 从而使得 reAorFaeA 的表观分子量较其理论分子量有所增大。

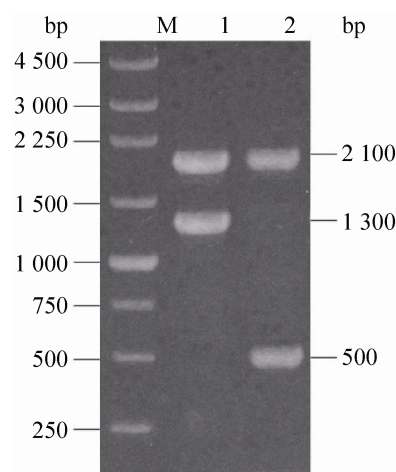


图2 重组毕赤酵母 GS115/*AorfaeA* 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant *Pichia pastoris* GS115/*AorfaeA* by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of GS115/*AorfaeA*; 2: PCR product of GS115/9K.

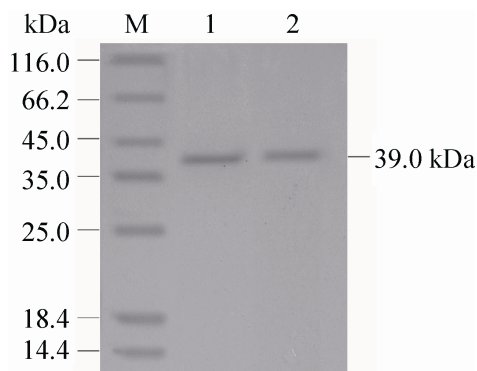


图3 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE profile of expressed products. M: protein marker; 1 and 2: the expression products of GS115/*AorfaeA* unpurified and purified, respectively.

2.3 不同大孔树脂对阿魏酸的吸附量和解吸率的测定

因为阿魏酸为弱极性物质,相对于强极性大孔吸附树脂,其在非极性或弱极性大孔树脂上的吸附和解吸效果均较好^[21]。按照 1.4.7 中的方法测定 5 种大孔树脂对阿魏酸粗提液中阿魏酸的吸附量和解吸率,结果显示 HPD-300 型大孔树脂的吸附量和解吸率均较高(表 3),通过比较这几种树脂的物理性质(表 2),发现 HPD-300 型大孔树脂的比表面积较大,而较大的比表面积有利于酚酸类物质在树脂表面形成更加有序的排列,增加吸附过程中的氢键作用和 π - π 作用位点,从而提高大孔树脂对酚酸类物质的选择性。故选择 HPD-300 型大孔树脂用于纯化阿魏酸的工艺研究。

表 2 各类大孔树脂物理性质

Table 2 Physical properties of macroporous resins

Resin type	Partical size (mm)	Pore diameter (Å)	Polarity	Surface area (m ² /g)	Moisture (%)	Apparent density (g/mL)	Wet true density (g/mL)
HPD-100	0.3–1.20	85–90	Non-polar	650–700	65–75	0.28–0.34	1.03–1.07
HPD-300	0.3–1.20	50–55	Non-polar	800–870	65–75	0.28–0.34	1.03–1.07
HP-20	0.3–1.20	55–65	Non-polar	600	65–75	0.68	1.26–1.29
D-101	0.3–1.25	100–110	Non-polar	≥400	65–75	0.27–0.34	1.03–1.07
AB-8	0.3–1.25	13–14	Weakly polar	480–520	65–75	0.60–0.70	1.00–1.10

表 3 静态吸附解吸结果

Table 3 Static adsorption analytic results

Resin type	Adsorption capacity (mg/g)	Desorption ratio (%)
HPD-100	9.53	81.5
HPD-300	13.65	87.3
HP-20	5.68	55.5
D-101	6.81	70.2
AB-8	8.29	60.7

2.4 洗脱液浓度对阿魏酸洗脱效果的影响

分别将 10 mL 处理好的阿魏酸粗提液上柱后静置吸附 2 h,用去离子水进行洗涤除去多糖等杂质,当水洗液为 4 BV 时流出液中不含有还原糖,经 HPLC 检测,流出液中均不含有阿魏酸。然后分别选用 30%、50% 和 70% 浓度的乙醇溶液以 1.0 mL/min 的流速进行洗脱,每 1 BV 收集一份洗脱液,共收集 7 BV,分别置于旋转蒸发器中

蒸干,复溶于10 mL乙醇中,测量其中阿魏酸的含量。结果如图4A所示。由图4A可见30%的乙醇不易将阿魏酸洗脱下来,另外,70%乙醇洗脱液在洗脱时颜色较深,表明过高浓度的乙醇会将色素等杂质一并洗脱,因此宜选择50%乙醇溶液作为洗脱液。

2.5 洗脱液流速对阿魏酸洗脱效果的影响

分别采用 0.5 mL/min、1.0 mL/min 和 2.0 mL/min 的流速对树脂进行洗脱,每1 BV 收集一份洗脱液,共收集 7 BV,分别置于旋转蒸发仪中蒸干,复溶于 10 mL 乙醇中,测量其中阿魏酸的含量。结果如图 4B 所示。由图 4B 可见在一定流速范围内,流速越慢,洗脱效果越好。这可能是因为洗脱液流速越慢,越有利于树脂中阿魏酸解吸于洗脱液中。在 0.5 mL/min

和 1.0 mL/min 的洗脱流速下,阿魏酸的洗脱量较大,洗脱效果差别不大,4 BV 洗脱液可洗脱完全,从缩短生产周期的角度出发,选择 1.0 mL/min 的流速进行洗脱。

2.6 验证试验

室温下,树脂装填量为 50 mL,将阿魏酸粗提液浓缩至 0.1 mg/mL,上样量为 10 mL,静置吸附 2 h,然后用 4 BV 去离子水冲洗以除去还原糖等杂质,用 50%乙醇溶液以 1.0 mL/min 流速进行解吸,收集洗脱液 4 BV,旋转蒸发浓缩,真空低温干燥成粉末,称重为 8.72 mg,阿魏酸的纯度为 10.55%,回收率为 92%。而纯化前粗提物总固体物中阿魏酸的质量分数为 0.13%,纯化倍数达到了 81.2,表明采用大孔吸附树脂纯化小麦麸皮中阿魏酸效果良好。

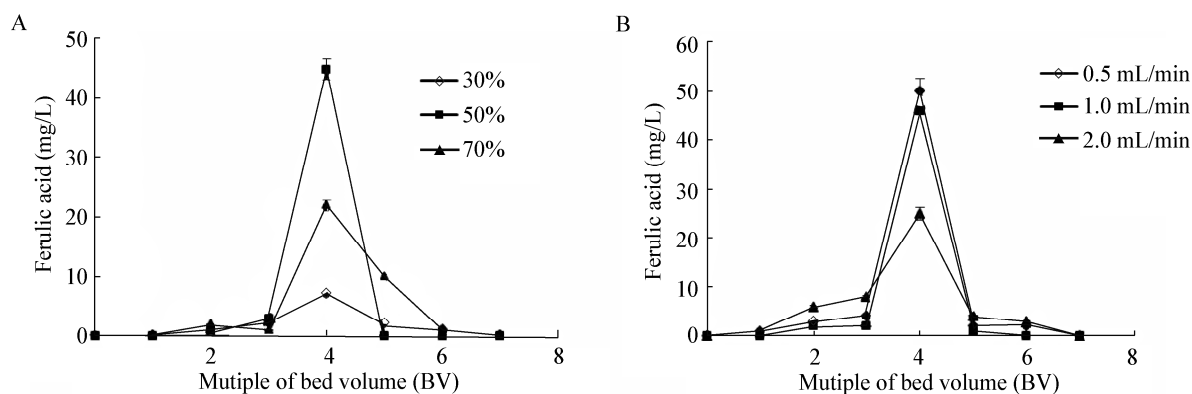


图 4 洗脱液浓度及洗脱液流速对阿魏酸洗脱效果的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of ethanol and flow speeds on elution of ferulic acid. (A) Change of ferulic acid concentration with different ethanol contents. (B) Change of ferulic acid concentration with different flow speeds.

3 讨论

本研究首次成功实现了米曲霉 *AorfaeA* 在 *P. pastoris* GS115 中的分泌表达, 以阿魏酸甲酯为底物, 其发酵上清液的粗酶活可达到 2.11 U/mL, reAorFaeA 经硫酸铵沉淀及凝胶层析纯化后, 比酶活为 58.35 U/mg。经 SDS-PAGE 检测 reAorFaeA 的表观分子量约为 39.0 kDa, 明显大于其理论分子量。由于毕赤酵母表达体系可以对蛋白质进行糖基化修饰作用^[22], 并且经 NetNGlyc 1.0 预测表明 reAorFaeA 氨基酸序列中含有两个潜在 N-糖基化位点, 因此推测 reAorFaeA 可能是经过糖基化修饰后的蛋白, 使得其表观分子量大于理论分子量。

José 等^[23]研究了醇提水沉法, 活性炭吸附法和聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 吸附法 3 种方法纯化阿魏酸, 醇提水沉法步骤复杂, 需要多步沉淀, 回收率为 57%; 活性炭吸附分离阿魏酸, 回收率为 66%, 可除去大部分色素, 但活性炭的再生能力差, 且分离过程中使用乙酸乙酯等有机溶剂, 对环境有污染; PVPP 纯化阿魏酸其回收率较低, 为 51.8%。大孔树脂与其他天然吸附剂相比具有吸附性强、解吸附容易、可反复使用、流体阻力小、价格便宜、操作简单, 抗污染能力强等优点^[24]。特别是其孔径和孔度大小、比表面积、极性性能都可以人为控制调节, 供任意选择, 在对天然产物进行大孔树脂纯化后, 可以去除大部分糖类和水溶性杂质。本研究探索了利用大孔树脂从阿魏酸粗提液中纯化阿魏酸的工艺, 基于测定出的不同树脂对阿魏酸的吸附量和解吸率, 本研究选用 HPD-300 型大孔树脂探索从阿魏酸粗提液中纯化阿魏酸的工艺条件, 确定了最佳纯化条件为: 上样量 10 mL, 静置吸附 2 h, 用 4 BV 去

离子水冲洗以除去还原糖等杂质, 用 4 BV 50% 的乙醇溶液以 1.0 mL/min 流速进行解吸, 纯化后阿魏酸的回收率为 92%, 纯度为 10.55%, 较阿魏酸粗提液纯化了 81.2 倍。

REFERENCES

- [1] Fazary AE, Hamad HA, Lee JC, et al. Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: characterization and crystal studies of the recombinant enzyme. *Int J Bio Macromol*, 2010, 46(4): 440–444.
- [2] Wong DS, Chan V, Liao H, et al. Cloning of a novel feruloyl esterase gene from rumen microbial metagenome and enzyme characterization in synergism with endoxylanases. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(3/4): 287–295.
- [3] Topakas E, Moukouli M, Dimarogona M, et al. Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(2): 399–411.
- [4] Mathew S, Abraham TE. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36(4): 565–570.
- [5] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Cloning and expression of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*, and establishment of fast activity detection methods. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, 15(2): 276–279 (in Chinese).
张帅兵, 裴小琼, 吴中柳. 黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的克隆、表达及快速酶活检测体系的建立. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(2): 276–279.
- [6] Faulds C. What can feruloyl esterases do for us? *Phytochem Rev*, 2010, 9(1): 121–132.
- [7] Debeire P, Khoune P, Jeltsch JM, et al. Product patterns of a feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* on large feruloyl-arabino-xylo-oligosaccharides from wheat bran. *Bioresource Technol*, 2012, 119: 425–428.
- [8] Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural

- sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem*, 2008, 109(4): 691–702.
- [9] Kikugawa M, Tsuchiyama M, Kai K, et al. Synthesis of highly water-soluble feruloyl diglycerols by esterification of an *Aspergillus niger* feruloyl esterase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(3): 615–622.
- [10] Couto J, St-Louis R, Karboune S. Optimization of feruloyl esterase-catalyzed synthesis of feruloylated oligosaccharides by response surface methodology. *J Mol Catal B-Enzym*, 2011, 73(1/4): 53–62.
- [11] Inns EL, Buggley LA, Booer C, et al. Effect of modification of the kilning regimen on levels of free ferulic acid and antioxidant activity in malt. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(17): 9335–9343.
- [12] Machida M, Asai K, Sano M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1157–1161.
- [13] Li JF, Gao SJ, Liu XT, et al. Modified pPIC9K vector-mediated expression of a family 11 xylanase gene, *Aoxyn11A*, from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*. *Ann Microbiol*, 2013, 63(3): 1109–1120.
- [14] Li JF, Zhao SG, Tang CD, et al. Cloning and functional expression of an acidophilic β -mannanase gene (*Anman5A*) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(3): 765–773.
- [15] Wang P, Zhao Y, Zhu P, et al. Expression and purification of human β -secretase (BACE1) in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(11): 1655–1666 (in Chinese).
王鹏, 赵颖, 朱平, 等. 人 β -分泌酶(BACE1)在毕赤酵母中分泌表达及纯化. *生物工程学报*, 2011, 27(11): 1655–1666.
- [16] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [17] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol*, 2012, 117: 140–147.
- [18] Wu MC, Zeng Y, Gong YY, et al. Gene cloning, expression of a feruloyl esterase A (*faeA*) from *Aspergillus oryzae*: China, CN 201210562540.X. 2012-12-24 (in Chinese).
邬敏辰, 曾妍, 龚燕燕, 等. 一种米曲霉阿魏酸酯酶基因 (*faeA*) 的克隆及表达: 中国, CN 201210562540.X. 2012-12-24.
- [19] Chen XF, Chen XL, Zou QL, et al. Expression, purification and identification for fibronectin C-terminal heparin-binding domain polypeptide in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(10): 1265–1273 (in Chinese).
陈小芳, 陈显凌, 邹起练, 等. 纤维连接蛋白 C 端肝素结合域多肽在毕赤酵母中的表达、纯化及鉴定. *生物工程学报*, 2012, 28(10): 1265–1273.
- [20] Koseki T, Takahashi K, Fushinobu S, et al. Mutational analysis of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* involved in substrate discrimination and pH dependence. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1722(2): 200–208.
- [21] Chu Y, Song HT, Li D, et al. Purification of extract of *Ligusticum chuanxiong* hort by macroporous resin. *J Shenyang Pharm Univ*, 2007, 24(6): 365–370 (in Chinese).
初阳, 宋洪涛, 李丹, 等. 应用大孔吸附树脂纯化川芎有效部位. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(6): 365–370.
- [22] Koseki T, Takahashi K, Handa T, et al. N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(10): 2476–2480.
- [23] José MS, Belén M, Raquel RS, et al. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. *Ind Crop Prod*, 2012, 39: 52–61.
- [24] Li J, Chase HA. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(10): 1493–1510.

(本文责编 陈宏宇)