

研究报告

产绿原酸内生菌的分离及其绿原酸合成途径关键基因的克隆和功能研究

王川* 李丽 魏丕伟 黄非

(四川理工学院 生物工程学院 四川 自贡 643000)

摘要:【目的】分离产绿原酸的内生菌并对其绿原酸合成途径的一种关键酶基因进行克隆和功能研究。【方法】采用表面消毒法从金银花中分离内生菌,以高效液相色谱(HPLC)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)筛选确定产绿原酸的内生菌,克隆、表达该内生菌的组氨酸解氨酶(HAL)并进行酶活测定。【结果】从金银花根中分离到一株产绿原酸的内生细菌 RP1,同时在该内生菌发酵液中检测到了绿原酸代谢的中间物肉桂酸。对 RP1 的分子鉴定表明该内生菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。对 RP1 的 HAL 基因进行克隆和原核表达,酶活测定表明该酶具有 HAL 和 PAL(苯丙氨酸解氨酶)双功能,其 PAL 活性产生的肉桂酸与 LC-MS 检测的结果一致。【结论】推测该内生菌可能利用其 HAL 的苯丙氨酸解氨酶活性将苯丙氨酸的催化产物肉桂酸导入苯丙烷途径,从而产生绿原酸。

关键词: 绿原酸, 内生菌, 分离, HAL 基因, 活性

Isolation of chlorogenic acid-producing endophyte and cloning of a key gene of chlorogenic acid synthetic pathway

WANG Chuan* LI Li WEI Pi-Wei HUANG Fei

(College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: [Objective] To isolate a chlorogenic acid (CGA)-producing endophyte, and to study the function of a key gene of the CGA synthetic pathway from the endophyte. [Methods] Endophytes were isolated from *Flos Lonicerae japonicae* by surface sterilization. The endophytic bacterium producing CGA was screened and confirmed by HPLC and LC-MS. Histidine ammonia lyase (HAL) gene of the endophytic bacterium was cloned and expressed in *Escherichia coli* and enzyme activity of the recombinant HAL was determined. [Results] An endophytic bacterium RP1 isolated from the root of *Flos Lonicerae japonicae* was confirmed to produce CGA. Moreover, cinnamate, an intermediate of CGA synthetic pathway, was detected from RP1 fermentation broth. RP1 was identified as *Bacillus subtilis* through 16S rRNA gene sequence analysis. The recombination HAL protein had dual function of HAL and PAL (phenylalanine ammonia lyase). Cinnamate produced by PAL activity of recombination protein agreed with the result of LC-MS. [Conclusion] Presumably endophytic RP1

基金项目: 四川省教育厅理工科重点项目(No. 14ZA0211)

*通讯作者: ✉: watpc57944@163.com

收稿日期: 2014-12-15; 接受日期: 2015-03-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-10

leaded cinnamate, produced from phenylalanine by the PAL activity of HAL, to the phenylpropanoid metabolic pathway to produce CGA.

Keywords: Chlorogenic acid, Endophyte, Isolation, HAL gene, Activity

在自然界中, 药用植物中的活性物质多为植物次生代谢产物, 这些活性成分一般都从植物体提取, 其产量和质量难免要受到植物的遗传性、生长条件、收获时间及贮藏和运输等因素所影响。内生菌存在于几乎所有植物中, 研究表明, 内生菌可产生与宿主相同或相似的活性成分^[1], 这就使内生菌具有成为植物活性成分的替代药源的潜力。目前对内生菌的研究主要集中在分类以及抗菌活性方面, 对内生菌的代谢途径及相关基因报道较少。金银花是我国传统中药, 其有效成分绿原酸(Chlorogenic acid, CGA)有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降血压、清除自由基等作用^[2-4], 广泛应用于医药、日用化工和食品等行业。绿原酸是植物中的葡萄糖经莽草酸途径产生的^[5], 其中苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是莽草酸途径第一步的限速酶, PAL 广泛存在于高等植物和一些真菌中, 而目前在细菌中还没有 PAL 的报道^[6]。本研究从金银花中分离一株产绿原酸的内生细菌, 并拟从该内生菌中克隆出 PAL 的同工酶基因, 并对该基因进行表达、纯化和酶活测定, 为该内生菌的进一步利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料: 金银花(*Flos Lonicerae japonicae*) 采自四川自贡, 选择生长 5-10 年、处于花期(6-9 月)的健康金银花植株, 分别收集金银花的根、茎、叶、花于保鲜袋中, 24 h 内进行内生菌分离实验。

1.1.2 培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基, PDA 培养基, LB 培养基^[7]。

1.1.3 主要试剂: 标准品绿原酸、苯丙氨酸、组氨酸、肉桂酸、尿刊酸, 购自 Sigma 公司; *Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21, 购自 Transgen Biotech 公司; 内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、T4 连接酶, 购自 Fermentas 公司; pMD19-T、pET28a、ExTaq、PCR 试剂, 购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、

IPTG, 购自 Amresco 公司; 胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒、溶菌酶、BCA 蛋白定量试剂盒, 购自 Tiangen 公司; 镍亲和层析预装柱 1.5 mL, 购自 Merck 公司; 引物由上海英潍捷基(Invitrogen)公司合成。测序由上海华津生物公司完成。其余化学试剂为分析纯。

1.1.4 仪器: Waters Breeze2 高效液相色谱仪、Waters Acquity UPLC-Quattro Premier XE 质谱仪、PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离和纯化: 采用组织块法分离内生菌, 将金银花材料依次以 75% 的酒精、10% 次氯酸钠处理 2 min, 无菌水洗涤数次后以无菌剪刀剪成 2-3 cm 的细段, 分别置于牛肉膏和 PDA 培养基平板, 以最后一次的洗涤水和灭菌的完整植株材料为对照, 于 28 °C (PDA 培养基)和 37 °C (牛肉膏培养基)培养 3-7 d。对生长出的菌落进行纯化、编号和保存。

1.2.2 产绿原酸内生菌的筛选: 将分离的各菌种接种于 100 mL 相应液体培养基中, 28 °C 或 37 °C、150 r/min 发酵 7 d。以超声破碎发酵液 30 min, 离心, 取上清液加入 1:1 的 75% 乙醇静置 5 h, 真空浓缩至 10 mL, 调 pH 为 2.0-3.0, 加入相同体积乙酸乙酯萃取, 分层后取乙酸乙酯层真空浓缩至干, 加入 3 mL 色谱级甲醇溶解后分别以高效液相色谱(HPLC)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)筛选。

HPLC 条件: Waters C₁₈ 反相色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相甲醇:水(体积比)=15:85, 进样量 10 μL, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 324.8 nm。

LC-MS 工作条件: Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈:1% 醋酸(绿原酸 90:10, 肉桂酸 70:30), 流速 0.25 mL/min; 质谱条件为 ESI 电喷雾电离, 负离子检出模式, 多

反应监测(MRM)定量。工作参数为毛细管电压 2.8 kV, 锥孔电压 20 V, 萃取锥孔电压 5 V, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 锥孔气流 40 L/h, 脱溶剂气流 700 L/h, 碰撞能量 15 eV。

1.2.3 产绿原酸内生菌株分子鉴定:经 LC-MS 鉴定产绿原酸的内生菌采用 16S rRNA 基因分子鉴定, 鉴定方法参考文献[7]。16S rRNA 基因测序结果提交 GenBank 数据库, 参考文献[8-9]方法进行多重序列对比和绘制系统进化树。

1.2.4 内生菌 HAL 基因克隆:内生菌基因组 DNA 提取采用 DNA 提取试剂盒提取。以枯草芽孢杆菌的 HAL 基因 *hutH* 为基础, 设计引物如下: sense: 5'-GGATCCATGGTGA CTTT AGACGGTTCTTCAT-3' (*Bam*H I); anti sense: 5'-AAGCTTTCATATGTTT ATCCCCCTTAGTTCT-3' (*Hind* III)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后以胶回收试剂盒回收。回收片段连接 pMD19-T 载体, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 以 M13 引物进行菌落 PCR 筛选, 阳性子送上海华津生物公司测序。

1.2.5 HAL 基因的表达和纯化:以质粒提取试剂盒提取阳性子质粒, 将质粒与载体 pET28a 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切过夜后以 T4 连接酶连接, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 阳性子转化 *E. coli* BL21(DE3) 细胞, 转化子接种于 LB 液体培养基, 30 °C、140 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4-0.6, 加入 250 μ mol/L IPTG 以 20 °C、160 r/min 诱导培养过夜, 菌液经 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液重悬后以溶菌酶破碎 30 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达情况。

重组蛋白以镍亲和层析柱进行纯化, 咪唑浓度梯度洗脱(10、20、50、100、200 mmol/L), 纯化蛋白经 SDS-PAGE 检测后以 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 加 5% 甘油透析过夜, 以 BCA 蛋白定量试剂盒测定含量。

1.2.6 重组蛋白酶活测定:HAL 活性按文献[10]进行, 测定组氨酸解氨基后的产物尿刊酸在 277 nm 下的吸光值, 2 mL 反应体系如下: 100 mmol/L pH 9.3 焦磷酸钠(包括 10 μ mol/L $ZnCl_2$ 和 2 mmol/L 谷胱甘肽), 25 mmol/L 组氨酸, 10 μ L 纯化蛋白, 以 10 μ L 水为空白对照。酶与缓冲液在 30 °C 预热

5 min, 加入底物后立即测定 OD_{277} 值, 30 °C 反应 30 min 后测定 OD_{277} 值。测定不同底物浓度(2、5、10、20、25、35、50 mmol/L)下的酶活力。以双倒数作图法确定反应的 K_m 值和 V_{max} 。

PAL 活性测定按文献[11]进行, 测定苯丙氨酸解氨基后的产物反肉桂酸在 290 nm 下的吸光值, 2 mL 反应体系如下: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 40 mmol/L L-苯丙氨酸, 10 μ L 纯化蛋白, 以 10 μ L 水为空白对照, 加入酶后立即测定 OD_{290} 值, 37 °C 反应 30 min 后测定 OD_{290} 值。测定不同底物浓度(10、20、40、60、80、100 mmol/L)下的酶活力, 以双倒数作图法确定反应的 K_m 值和 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

从金银花根、茎、叶中共分离内生菌 96 株, 其中内生细菌 58 株, 内生真菌 38 株, 细菌在各种培养基中都可分离, 内生菌在金银花的根(51 株)和茎(31 株)中分布相对较多, 而在叶(10 株)和花(4 株)中分布较少。将分离纯化的各内生菌发酵液经有机溶剂萃取处理后, 进行 HPLC 初步检测, 结果显示一株分离自金银花根的内生细菌 RP1 的发酵液处理产物与绿原酸标品具有相同的保留时间和特征吸收波长, 对 RP1 进一步的 LC-MS 验证结果表明, 内生菌株 RP1 与绿原酸标品具有相同的保留时间: 1.57 min (图 1A、B), 并在总离子色谱图上含有相同的绿原酸母离子特征 m/z 值: 353.22 和子离子[奎尼酸-H]⁻特征 m/z 值: 191 (图 1C、D), 同时, LC-MS 结果表明, RP1 的发酵液与肉桂酸具有相同的保留时间: 0.96 min (图 2), 而肉桂酸是绿原酸合成代谢的一种中间产物。以上结果表明, 内生菌 RP1 能发酵产生和宿主植物金银花相同的活性物质绿原酸。

2.2 内生菌的分子鉴定

以 RP1 基因组 DNA 为模板, 利用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物测序后用 BLAST 在 GenBank 中进行一致性搜索, 结果显示 RP1 的 16S rRNA 基因与 *Bacillus subtilis* 相似性为 100%, 选择各种芽孢杆菌进一步构建进化树分析表明, 内生菌 RP1 与 *Bacillus subtilis* 属于同一菌群, 而与其他产芽孢杆状细菌的发育关系相对较远(图

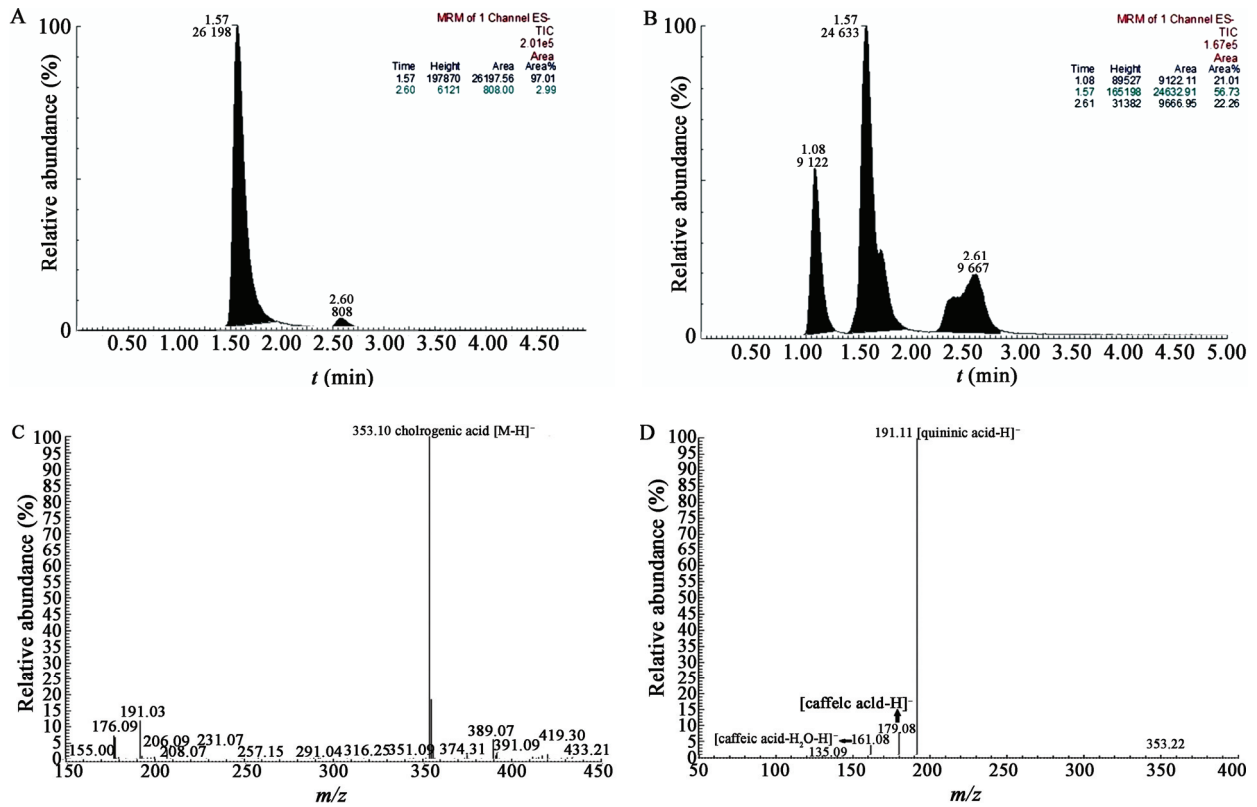


图1 绿原酸标品(A)、RP1提取物(B)的MRM色谱图和绿原酸标品的ESI-MS, ESI-MS/MS质谱图(C、D)
 Figure 1 MRM chromatogram of standard chlorogenic acid (A) and RP1 extracts (B), ESI-MS, ESI-MS/MS mass spectra of standard chlorogenic acid (C, D)

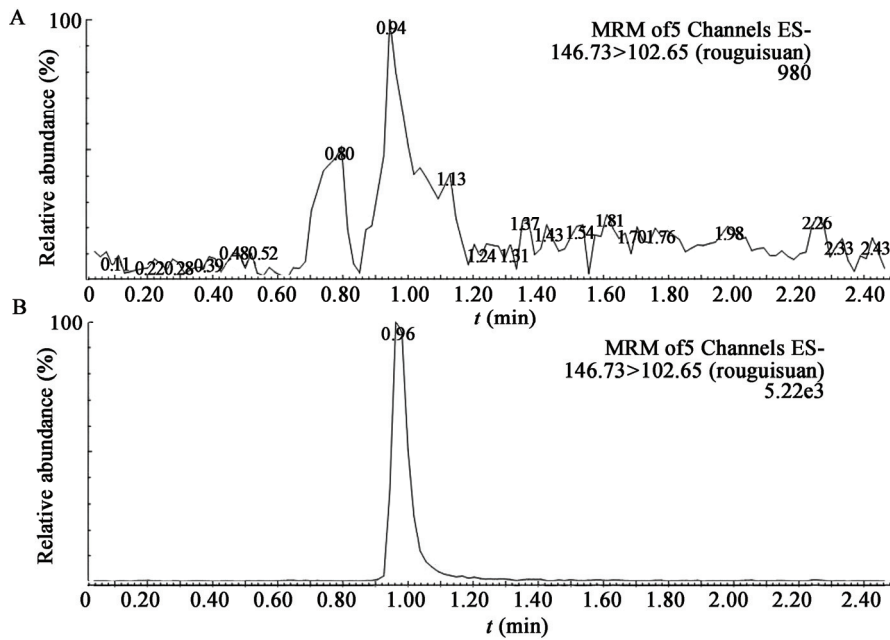


图2 RP1提取物(A)与肉桂酸(B)的MRM色谱图
 Figure 2 MRM chromatogram of RP1 extracts (A) and cinnamic acid (B)

3)。综合分子鉴定结果,可以确定内生菌 RP1 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。内生菌 RP1 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为 KF053071。

2.3 内生菌 RP1 的 HAL 基因的克隆、表达和酶活测定

苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL),是植物合成绿原酸的莽草酸途径的关键酶和限速酶,在枯草芽孢杆菌中没有 PAL 基因的报道,而在细菌中 PAL 与组氨酸解氨酶(Histidine ammonia-lyase, HAL)有很高的同源性^[6],因此以枯草芽孢杆菌 HAL 为基础设计引物,通过 PCR 扩增

获得了内生枯草芽孢杆菌 RP1 的 HAL 基因(图 4),测序结果表明目的基因全长 1 626 bp, GenBank 比对结果表明该基因与 *Bacillus subtilis* str. RO-NN-1 的 Histidine ammonia-lyase (HAL)有 99% 的相似性,表明目的基因克隆成功,将内生菌 HAL 与载体 pET28a 构建成重组表达质粒经酶切后验证,得到分别与载体 pET28a 和基因片段大小相符的两条带(图 4),表明 HAL 基因片段与表达载体 pET28a 构建成功。

含重组表达质粒 pET28a-HAL 的 *E. coli* BL21 以 IPTG 诱导表达,结果显示以 IPTG 诱导的重组菌产生了与预期分子量(57.5 kD)大小一致的重组蛋

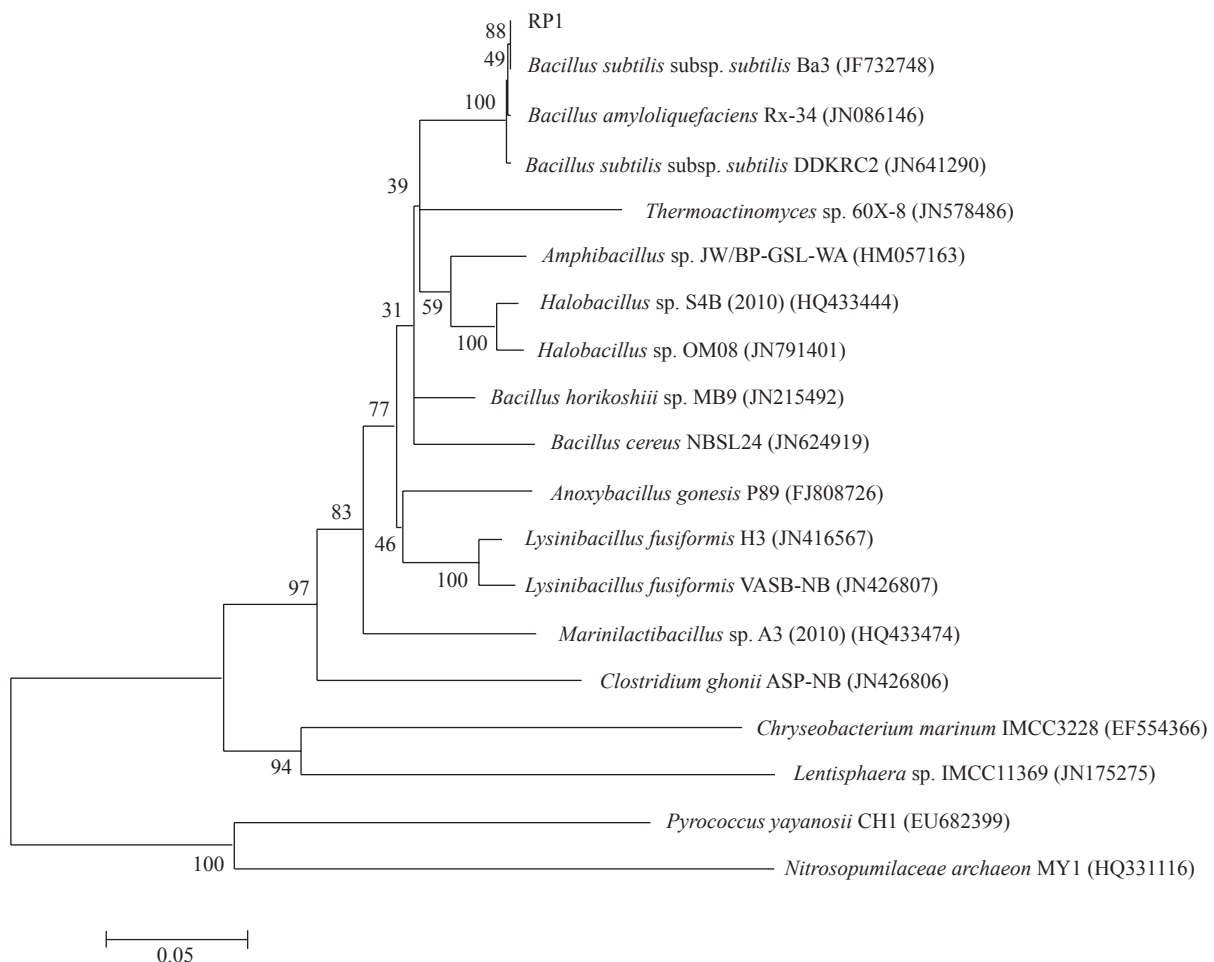


图 3 内生细菌 RP1 的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of the endophytic bacterium RP1

注:括号内数字为菌株登录号;分支上的数字为自展支持率;标尺为核苷酸替换率。

Note: The numbers in the brackets are gene sequence accession numbers in GenBank. The number on the branch is bootstrap value. Scale 0.05 is the substitutions per nucleotide position.

白, 而对应的非诱导重组载体和空载体对照, 均未出现目的重组蛋白(图 5), 这表明重组蛋白表达成功, HAL 重组蛋白可进行可溶性表达。进一步对 HAL 重组表达蛋白进行镍亲和层析纯化, 结果(图

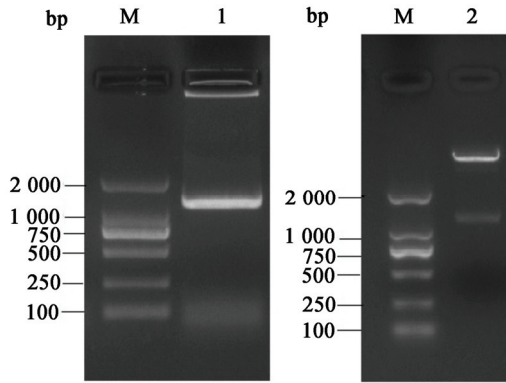


图 4 RP1 的 HAL 基因扩增产物和重组 pET28a-HAL 酶切鉴定

Figure 4 The PCR product of HAL gene and the *Bam*H I and *Hind* III digest products of pET28a-HAL

注: M: DNA 对照; 1: PCR 产物; 2: pET28a-HAL 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物。

Note: M: DNA marker; 1: PCR product; 2: *Bam*H I and *Hind* III digest products of pET28a-HAL.

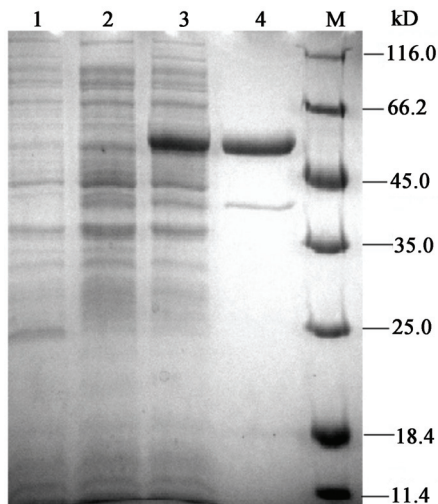


图 5 重组 HAL 蛋白的诱导表达和纯化

Figure 5 Inducible expression and purification of recombinant HAL protein

注: M: 标准蛋白对照; 1: 空载; 2: 未诱导; 3: IPTG 诱导; 4: 纯化。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: BL21/pET28a; 2: Non-induced BL21/pET28a-HAL; 3: BL21/pET28a-HAL induced by IPTG; 4: Purified recombinant HAL protein.

5)显示纯化成功, BCA 蛋白定量为 236 mg/L, 纯化的蛋白用于酶活测定实验。

酶活测定的结果表明重组蛋白具有 PAL 和 HAL 双功能酶活性, 通过对不同浓度双底物进行酶活测定, 结果(表 1)显示以组氨酸为底物的 K_m 值为 6.9 mmol/L, K_{cat} 为 20.12 s^{-1} , 而以苯丙氨酸为底物的 K_m 值为 64 mmol/L, K_{cat} 为 7.4 s^{-1} , 这表明重组蛋白的最适底物为组氨酸, 同时该蛋白也能以苯丙氨酸作为底物。

表 1 重组 HAL 蛋白的酶促动力学性质
Table 1 Enzyme kinetic property of recombinant HAL

	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mmol/L)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1} \text{ L}/\text{mmol}$)
PAL 活性 PAL activity	0.874	64.0	7.40	0.11
HAL 活性 HAL activity	2.375	6.9	20.12	3.00

3 结论

绿原酸是植物次生代谢物, 具有多种药用功能和生理活性, 是药用植物金银花的主要药性成分。内生菌能够产生和宿主植物相同的代谢物, 是潜在的药用植物代谢物药源。本研究旨在从金银花中筛选产绿原酸的内生菌, 从内生菌分离结果看, 金银花内生菌在植物根中来源较多, 这符合内生菌常来自于植物根际菌的理论^[12]。绿原酸在金银花的花蕾和叶中含量较丰富, 分布于表层及以下的细胞中, 而在根和茎中含量极少^[13], 这与内生菌的分布相反, 可能的原因在于植物及内生菌产生的绿原酸作为植保素参与对病原菌的侵害^[2], 故通过运输分布于植物的外花、叶表层细胞。对所有分离纯化的内生菌进行发酵培养并提取处理后, 通过 LC-MS 法确定了一株分离自金银花根的能发酵产生绿原酸的内生细菌 RP1, 同时在 RP1 发酵液中检测到了绿原酸代谢的一种中间物肉桂酸。对 RP1 的分子鉴定表明该菌属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 曾有从杜仲中分离产绿原酸的内生真菌的报道^[14], 而这是首次发现产绿原酸的内生枯草芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌产绿原酸的相关代谢基因和酶目前都还没

有相关报道,因此对内生菌 RP1 的研究可以通过其绿原酸合成代谢的基因展开。

PAL 催化苯丙氨酸生成反式肉桂酸,是植物经莽草酸途径产生绿原酸的第一个关键酶,本研究以枯草芽孢杆菌 HAL 为基础设计引物,克隆并表达了内生枯草芽孢杆菌的 HAL 基因。从酶活测定可以看出,重组蛋白具有 PAL 和 HAL 双功能酶活性,以不同浓度组氨酸和苯丙氨酸为底物得到的重组蛋白 K_m 值大小表明重组蛋白的最适底物为组氨酸。HAL 和 PAL 具有高序列同源性,催化相同类型的反应,反应需要相同的辅基,因此在一些真菌和酵母中的 HAL 也具有 HAL 和 PAL 的双功能^[15],但在蓝细菌和链霉菌(*Streptomyces maritimus*)中发现的 PAL 其蛋白序列和大小都与细菌的 HAL 更同源^[13],尽管 HAL 在原核和真核生物中普遍存在,但 PAL 在原核中很少,目前只在少数几种酵母、链霉菌和光合细菌中发现有 PAL 的存在^[16-18],该内生枯草芽孢杆菌的 HAL-PAL 双功能的存在表明在低等的细菌中, PAL 功能可能包含在 HAL 的功能中,二者是一个酶的双重活性,随着进化, PAL 活性逐渐从 HAL 中分化出来,同时没有分化的 HAL/PAL 活性也表明有些植物体内的内生菌在久远的年代就与植物共生。

本研究中的内生枯草芽孢杆菌分离自金银花,能够同宿主植物一样产生绿原酸和中间产物肉桂酸,该内生菌的 HAL 具有 PAL 活性,能催化组氨酸和苯丙氨酸解氨基,在苯丙氨酸(Phe)存在条件下可进行解氨基反应生成肉桂酸,肉桂酸的存在也与 LC-MS 的检测结果一致。由于 PAL 是次生代谢的起源流向类黄酮及绿原酸类生物合成的一个关键节点,该内生菌可能利用其 HAL 的苯丙氨酸解氨基活性将苯丙氨酸导入苯丙烷途径从而产生绿原酸。这暗示该内生菌可能有与宿主植物相同的绿原酸合成途径,这需要进一步对代谢途径中其余酶的研究来确定。

参 考 文 献

[1] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J].

- Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544
- [2] Clifford MN. Review: chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism[J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2000, 80(7): 1033-1043
- [3] Ohnishi M, Morishita H, Wahashi H. Inhibitor effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis[J]. Phytochemistry, 1994, 3(6): 579-583
- [4] Peluso G, de Feo V, de Simone F, et al. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production[J]. Journal of Natural Products, 1995, 58(5): 639-646
- [5] Ferrer JL, Austin MB, Stewart C Jr, et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 356-370
- [6] MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia-lyase[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2007, 85(3): 273-282
- [7] Persing DH, Tenover FC, Tang YW. et al. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice[M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 2003: 454-483
- [8] McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 2004(32): 20-25
- [9] Saito N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [10] Rothler D, Poppe L, Viergutz S. Characterization of the active site of histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(23): 6011-6019
- [11] Hsieh LS, Hsieh YL, Yeh CS, et al. Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (BoPAL1) from *Bambusa oldhamii*[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 283-290
- [12] Stone JK, Bacon CW, Willite JF Jr. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined[M]. Microbial Endophytes, New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29
- [13] Geng SL, Xu HH, Zhao S, et al. Distribution of chlorogenic acid in branch, blade, and flower of *Lonicera confusa*[J]. Chinese Traditional and Herbal drugs, 2004, 35(3): 315-318 (in Chinese) 耿世磊, 徐鸿华, 赵晟, 等. 山银花茎、叶、花中绿原酸分布规律研究[J]. 中草药, 2004, 35(3): 315-318
- [14] Chen XM, Sang XX, Li SH, et al. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(5): 447-454
- [15] Bezanson GS, Desaty D, Emes AV, et al. Biosynthesis of cinnamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1970, 16(3): 147-151
- [16] Xiang LK, Moore BS. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(12): 4286-4289
- [17] Nakamichi K, Nabe K, Yamada S, et al. Induction and stabilization of L-phenylalanine ammonia lyase activity in *Rhodotorula glutinis*[J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1983, 18(3): 158-162
- [18] Moffitt MC, Louie GV, Bowman ME, et al. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization[J]. Biochemistry, 2007, 46(4): 1004-1012