

来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质

李夏兰¹, 范韵敏¹, 方柏山^{1, 2*}

[¹ 福建省高校工业生物技术重点实验室(华侨大学), 泉州 362021]

(² 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361005)

摘要:【目的】从桔青霉的发酵液中分离纯化了胞外阿魏酸酯酶(PcFAE)并进行了酶学性质的研究,初步探讨了PcFAE对麦糟的酶解作用。【方法】利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换层析、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow疏水层析纯化得到电泳纯的阿魏酸酯酶。【结果】从该菌株的发酵液中获得一阿魏酸酯酶,该酶亚基分子量约为31 kDa,全酶分子量约为58 kDa。其最适pH为6.0,最适温度为45℃-65℃,在pH 5.0-6.0及25℃-55℃之间,酶保持了较好的稳定性。 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Na^+ 对酶活有一定的促进作用, Zn^{2+} 对PcFAE酶活有一定的抑制作用,而 Cu^{2+} 、亮抑肽素、抑肽酶有显著的抑制作用, Hg^{2+} 、苯甲基磺酰氟几乎完全抑制了酶活。EDTA对PcFAE活性无明显影响。PcFAE的 k_{cat}/K_m 对香豆酸甲酯、芥子酸甲酯、阿魏酸甲酯、咖啡酸甲酯的值分别为823、416、103、0,PcFAE对MpCA的催化效率最高。PcFAE作用于麦糟,当5 U PcFAE/g麦糟时,其阿魏酸的释放量为7.2%。【结论】获得了一阿魏酸酯酶,其理化性质与至今报道的阿魏酸酯酶有所不同,为阿魏酸酯酶的开发提供了重要的实验依据。

关键词: 阿魏酸酯酶;纯化;性质

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1058

禾本植物细胞壁的半纤维素是由木糖通过 β -1,4-糖苷键连接成木聚糖主链,侧链主要有阿拉伯糖基、乙酰基、半乳糖基等,酚酸通过酯键与半纤维素主链上的取代糖基相连,或通过醚键与木质素相连,形成多重交联构成复杂的网络结构,在禾本植物纤维质中,反式阿魏酸是含量最多的酚酸^[1-6],其主要是以酯键与半纤维素连结^[7]。尽管阿魏酸基在植物细胞壁中的作用还没有完全被阐明,但是研究已表明半纤维素中的阿魏酸及双阿魏酸含量及连结键是决定木质纤维生物降解的最关键因素,因此断裂阿魏酸与半纤维素连结键是提高半纤维素降解程度的关键^[8-9]。阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)是羧酸酯水解酶的一个亚类,属胞外酶,其主要生物功能是水解脱糖与阿魏酸连结的酯键^[10]。产酶的主要真

菌有黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、嗜热侧孢霉(*Sporotrichum thermophile*)、黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)、青霉类(*Penicillium*)等。细菌和放线菌也能分泌阿魏酸酯酶。各种微生物分泌的阿魏酸酯酶在氨基酸序列、肽链的结构、物化性质和催化特性上有所不同^[11-12]。

本文报道了实验室筛选的一菌株发酵产阿魏酸酯酶(PcFAE)的分离纯化及其酶学性质,初步探讨了PcFAE酶解麦糟释放阿魏酸的情况,为木质纤维的综合利用提供前期的研究基础。

* 通信作者。Tel: +86-592-2185869; E-mail: fbs@xmu.edu.cn

作者简介:李夏兰(1965-),女,福建人,教授,研究方向是生物化工。E-mail: xialan@hqu.edu.cn

收稿日期:2009-12-25;修回日期:2010-03-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:反式阿魏酸标准品、苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA、亮抑肽素(leupeptin)、抑肽酶(aprotinin), Sigma公司;阿魏酸甲酯(MFA)、咖啡酸甲酯(MCA)、香豆酸甲酯(MpCA)、芥子酸甲酯(MSA), 盐城朗德化学品科技有限公司赠送;麦糟, 福建泉州雪花啤酒厂提供;其他常规试剂均为国产或进口分析纯。DEAE-Sepharose Fast Flow层析介质、Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow层析介质, 均购自Amersham pharmacia biotech公司;AKTA Prime蛋白质纯化仪, Amersham pharmacia biotech公司;蛋白电泳仪, 美国Bio-Rad公司;Agilent 1100高效液相色谱仪, 美国安捷仑公司;Thermo EC120小型垂直电泳系统, 美国Thermo公司;ODS-C18色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 美国Thermo公司;Gis-2008凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.1.2 菌种:从土壤中筛选得到, 桔青霉(*Penicillium citrinum*), 本实验室保藏。

1.2 培养基及培养条件

①斜面培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养72 h。②种子培养基:PDA培养基, 不加琼脂, 装液量为150 mL三角瓶30 mL, pH自然, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养72 h。③发酵培养基^[13](%): KH_2PO_4 0.30、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.60、 NaCl 0.01、酵母粉0.80、麦糟1.33(粒径 <0.054 mm)。装液量为250 mL三角瓶75 mL, 初始pH 6.0, 接种量5%(V/V), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养68 h。

1.3 阿魏酸及阿魏酸酯酶酶活测定

阿魏酸的测定采用HPLC法^[14]。样品液3470 \times g离心20 min后取上清液500 μL , 加入1.0 mL, 50%的甲醇4338 \times g离心15 min。色谱条件:Agilent1100型高效液相色谱仪, ODS-C18柱, 紫外检测器, 检测波长为318 nm;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇:水:冰乙酸=30:69.5:0.5(V/V);流速为0.9 mL/min;进样量为20 μL 。

阿魏酸酯酶活力测定^[15]:取250 μL 样品, 加入250 μL , pH6.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液配制的阿魏酸甲酯溶液, 在50 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min后加入500 μL 10%冰乙酸(V/V), 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min离心20 min后测定阿魏酸含量。空白对照为煮沸失活的酶液。

在50 $^{\circ}\text{C}$ 、pH6.0条件下, 每分钟酯解阿魏酸甲酯, 生成1 μmol 阿魏酸所需酶量定义为1个酶活力

单位(U)。

1.4 麦糟中用碱提取阿魏酸总量的测定

麦糟经珠磨机粉碎, 过100目筛后取0.10 g于水解管中, 加入5.5 mL 4 mol/L NaOH溶液, 充 N_2 后放入恒温振荡器中避光室温振荡水解24 h。水解液于4000 r/min离心15 min, 上清液用2 mol/L盐酸调至pH 2.0, 用醋酸乙酯1:1(V/V)萃取其中的阿魏酸^[6], HPLC法测定阿魏酸含量。

1.5 蛋白质测定

蛋白质的测定采用考马斯亮蓝法^[16]。

1.6 PcFAE的纯化

1.6.1 DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换层析:将处理好的DEAE-Sepharose树脂装柱, 用0.01 mol/L、pH 6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液充分平衡色谱柱(1.5 cm \times 20 cm), 至 OD_{280} 基线走平, 将粗酶液I用0.01 mol/L、pH 6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液溶解并上柱, 上样量为2 mL, pH 6.0, 0.01 mol/L的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液洗脱至流出液的 OD_{280} 至0.1以下, 采用NaCl节梯洗脱, 时间 $t=0-30$ min, 含0.1 mol/L NaCl的0.01 mol/L、pH 6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液;时间 $t=30-60$ min, 含0.4 mol/L NaCl的0.01 mol/L、pH 6.0的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液。流速为5 mL/min, 检测波长为280 nm, 每2 mL收集洗脱液, 测酶活, 将有酶活的洗脱峰透析, 得粗酶液II。

1.6.2 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow疏水层析:将处理好的Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow树脂装柱, 用含有0.4 mol/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的pH 6.0, 0.1 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液充分平衡色谱柱(0.5 cm \times 7.5 cm), 至 OD_{280} 基线走平。将粗酶液II上柱, 上样量为2 mL, 用含有0.4 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的pH 6.0, 0.1 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸的缓冲液洗脱至流出液的 OD_{280} 降到0.1以下。在90 min内, 用含有1 mol/L至0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的pH 6.0、0.1 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液梯度洗脱, 流速为1 mL/min, 检测波长280 nm。每2 mL收集洗脱液, 测酶活, 将有酶活性的洗脱峰透析、冷干, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保藏。

1.7 分离效果检测和目标蛋白的相对分子质量测定

采用SDS-PAGE法, 12%分离胶、4%浓缩胶, 凝胶用考马斯亮蓝染色, 检测目标蛋白的分离效果及测定亚基分子量。采用Native-PAGE法测定全酶分

子量,凝胶用考马斯亮蓝染色^[16]。

1.8 纯化的 PcFAE 酶学性质研究

1.8.1 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性的测定:最适反应 pH 值的测定:将加入阿魏酸甲酯的 0.1 mL 酶液分别与 0.1 mL、0.2 mol/L 的 pH 3-10 的缓冲液混合,在 50 °C 下放置 0.5 h,测定残留酶活,以所测的最高酶活为 100%,计算相对酶活。

pH 值稳定性的测定:将酶液置于 0.2 mol/L 的 pH 3-10 的缓冲液中,在 50 °C 保温 2 h,测定残留酶活,以各 pH 值的初始酶活为 100%,计算相对酶活。

缓冲液是 pH3.0、pH4.0、pH5.0、pH6.0、pH7.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液,pH 8.0、pH9.0 的 Gly-NaOH 缓冲液。

1.8.2 最适反应温度和温度稳定性的测定:最适反应温度的测定:将加入阿魏酸甲酯的酶液 0.1 mL 与 0.1 mL 0.2 mol/L 的 pH 6.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液混合,在 25-70 °C 保温 0.5 h 后,测定残留酶活。以所测的最高酶活为 100%,计算相对酶活。

温度稳定性的测定:在 0.2 mol/L, pH 6.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲溶液中,分别将酶液置于 25-60 °C 保温 14 h,每隔 2 h 取样测定残留酶活,以初始酶活为 100%,计算相对酶活。

1.8.3 金属离子对 PcFAE 酶活的影响:将加入阿魏酸甲酯的 0.1 mL 酶液分别与 0.1 mL 含有 10 mmol/L 各种金属离子浓度的 0.2 mol/L 的 pH 6.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液混合,在 50 °C 下放置 0.5 h,测残留酶活。以不添加金属离子的酶活为 100%。

1.8.4 蛋白酶抑制剂对 PcFAE 酶活的影响:配制 10 mmol/L 的 PMSF、5 mmol/L EDTA、20 mmol/L 的 EDTA、5 mg/mL 的 leupeptin、10 mg/mL 的 aprotinin 5 种溶液,其中 PMSF 用异丙醇溶解,EDTA 用 pH8.0 的 NaOH 溶液溶解,其它试剂用灭菌水溶解。将加入阿魏酸甲酯的 0.1 mL 酶液分别与 0.1 mL 上述浓度的抑制剂混合,在 50 °C 下放置 2 h,测残留酶

活。以不添加抑制剂的酶活为 100%。

1.8.5 米氏常数的测定:取 8 支试管,每管都加好 200 g/L 阿魏酸酯甲酯溶液,0.2 mol/L、pH 6.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液,在 50 °C 预热 3 min,用同一管已稀释好的酶液依次加样,依次在酶作用 1-30 min 时测定酶活性,然后算出酶活性与反应时间的比值,在一定时间内比值保持稳定,则在此时间内酶作用为一级反应,此时间即可确定为测 K_m 值和 V_{max} 的反应时间。用不同浓度的底物,在 0.2 mol/L, pH 6.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲体系中,50 °C 下反应,测定酶活,计算相应的反应速度,利用米氏方程双倒数法求得 K_m 值及 V_{max}。

1.9 PcFAE 酶解麦糟的初步探讨

把麦糟浸没在 85% (V/V) 的乙醇中煮沸 5 min 后冷却,搅拌均匀后过滤。重复以上步骤两次,分别用无水乙醇和乙醚清洗后烘干,珠磨机粉碎后过 50 目的土样筛,得到麦糟的乙醇不溶物^[17]。

将实验室分离纯化的阿魏酸酯酶液(用 pH6.0, 0.1 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液稀释)或经离心的发酵液上清液(粗酶液)30 mL、添加木聚糖酶液 2 mL、1 g 的麦糟乙醇不溶物,在 50 °C 酶解麦糟 24 h 后测定阿魏酸释放率。阿魏酸释放率为阿魏酸的释放量占麦糟中碱提取的阿魏酸总量的百分率。

2 结果和讨论

2.1 PcFAE 的分离纯化

发酵上清液,加入饱和度为 80% (NH₄)₂SO₄ 盐析,得沉淀,将沉淀用 pH 6.0, 0.02 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液溶解,得溶解液,截留分子量为 5 kDa 的透析袋透析 24 h,得粗酶液 I。粗酶液 I 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析,有 3 个洗脱峰。将洗脱峰 1 收集液进行 Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析,有 2 个洗脱峰。对分离纯化过程的盐析、离子交换层析、凝胶层析分别进行酶活性测定及蛋白浓度测定,结果见表 1。发

表 1 PcFAE 的纯化

Table 1 Summary of the purification of PcFAE

Enzyme sample	Total protein/ mg	Total activity/ mU	Specific activity/ (U/g)	Purification fold	Total activity recovery/%
Crude culture supernatant	958	4578	4.78		
80% ammonium sulphate and dissolve	108	1210	11.2	2.34	26.4
DEAE-Sepharose chromatography	49.8	986	19.8	1.77	21.5
Phenyl-Sepharose chromatography	22.6	675	29.9	2.67	14.7

醇液的上清液经 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、透析、溶解, 酶的比活由 4.78 mU/mg 提高到 11.2 mU/mg, 纯化倍数为 2.34, 总回收率为 26.4%。经 DEAE-Sepharose Fast Flow 纯化后, 酶的比活由 11.2 mU/mg 提高到 19.8 mU/mg, 纯化倍数为 1.77, 总回收率为 21.5%。经 Phenyl FF 纯化, 酶的比活达到 29.9 mU/mg, 纯化倍数为 2.67, 总回收率为 14.7%。

2.2 分离效果检测和目标蛋白的相对分子质量测定结果

采用 SDS-PAGE 电泳检验纯化后的蛋白溶液纯度, 如图 1 所示。图 1-A 表明, 经纯化后的阿魏酸酯蛋白仅有 1 条单一的条带, 说明得到了电泳纯的目标蛋白, 纯化的 PcFAE 的分子量约为 31 kDa。图 1-B 的 Native-PAGE 测定结果表明, 该酶非变性情况下的分子量约为 58 kDa 左右, 推测该酶为同二聚体结构。

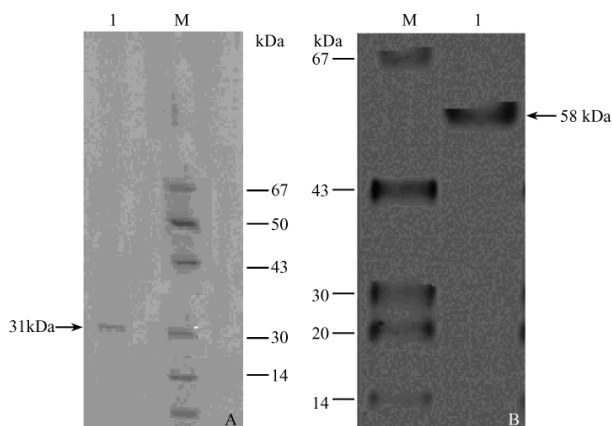


图 1 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE and Native-PAGE of purified PcFAE. A: SDS-PAGE. 1. feruloyl esterase; M. standard protein markers. B: Native-PAGE. M. standard protein markers; 1. feruloyl esterase.

2.3 纯化的 PcFAE 酶学性质研究

2.3.1 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性的测定: 在不同 pH 下进行酶促反应以测定 PcFAE 的最适 pH 值, 结果表明, pH 值为 6.0 时, PcFAE 酶活最大。在 pH 5.0-6.0 之间, 酶保持了较高的稳定性。当 pH > 6.0, 随着 pH 的增大, 其酶活愈不稳定, 当 pH 为 9.0 时, 14 h 酶活为初始的 68.1%。

2.3.2 最适反应温度和温度稳定性的测定: 在不同温度下进行酶促反应以测定 PcFAE 的最适温度, 结果表明, 在 45℃-65℃ 时, PcFAE 酶活最大, 其相对酶活都保持 98% 以上, 当反应温度超过 70℃ 时酶活下降较快。25℃-55℃ 保温 14 h, PcFAE 酶活为初始酶的 80% 以上, 温度高于 55℃, PcFAE 的热稳

定性有所下降。当温度为 60℃ 时, 14 h 后 PcFAE 酶活仍保持初始酶活的 55.2%。PcFAE 具有较好的热稳定性。

2.3.3 金属离子对酶活力的影响: 金属离子对 PcFAE 酶活性的影响见表 2。Mg²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Na⁺ 和对酶活有一定的促进作用, Zn²⁺ 对 PcFAE 酶活有一定的抑制作用, 而 Cu²⁺、Hg²⁺ 有显著的抑制作用, 尤其是 Hg²⁺, 几乎完全抑制了酶活。

表 2 金属离子对 PcFAE 酶活力的影响

Table 2 Effects of various metal ions on PcFAE

Cation	Residual activity/%
Mg ²⁺	132
Fe ²⁺	118
Mn ²⁺	109
Ca ²⁺	104
Na ⁺	102
Zn ²⁺	84
Cu ²⁺	44
Hg ²⁺	2.3

2.3.4 蛋白酶抑制剂对酶活力的影响: 蛋白酶抑制剂对 PcFAE 酶活性的影响见表 3。PMSF 完全抑制 PcFAE 的活性, aprotinin、leupeptin 对 PcFAE 活性有一定的抑制作用, 5 mmol/L 的 EDTA 对 PcFAE 活性有轻微促进作用, 20 mmol/L 高浓度的 EDTA 对 PcFAE 活性无明显影响。

表 3 抑制剂对 PcFAE 酶活力的影响

Table 3 Protease inhibitor of various metal ions on PcFAE

Cation	Residual activity/%
PMSF	0
5 mmol/L EDTA	108
20 mmol/L EDTA	101
leupeptin	69
aprotinin	78

2.3.5 米氏常数的测定: 测定 PcFAE 酶的反应初速度, 结果在 0-30 min 内酶活性与反应时间的比值均保持稳定, 其反应初速度为 $7.43 \times 10^{-3} \text{U}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。根据以上所测定的酶的反应初速度, 确定测其 K_m 值及 V_{\max} 时的反应时间为 12 min。按照米氏方程, 采用双倒数做图法, 测定了不同底物 (MFA、MCA、MpCA、MSA) 的动力学曲线, 求出各种底物 K_m 和 V_{\max} 。结果见表 4。

表 4 PcFAE 对底物专一性

Table 4 Substrate specificity of the purified PcFAE

Substrates	Specific activity/(U/mg)	K_m (mmol/L)	V_{\max} [U/(min·mg)]	k_{cat}/K_m [1/(mmol/L·min)]
MFA	29.9	0.146	450	103
MSA	9.6	0.263	1050	416
MpCA	38.2	0.0496	1560	823
MCA	0	0	0	0

实验结果表明,实验所得的 PcFAE 对苯乙酯甲酯的亲合力大小如下: MpCA > MFA > MSA,对 MCA 没有活性。从催化效率 k_{cat}/K_m 值可看出,PcFAE 对 MpCA 的催化效率最高,其催化效率约是 MSA 的 2 倍、MFA 的 8 倍。

2.4 PcFAE 酶解麦糟的初步探讨

对 PcFAE 酶解麦糟释放阿魏酸进行了初步的 i , 结果见表 5。当加入的是纯酶时,随着纯化的 PcFAE 阿魏酸酯酶量的增加,无论添加木聚糖酶与否,其阿魏酸的释放率都提高;在 5 U PcFAE/g 麦糟时,不加木聚糖酶时,其阿魏酸量的释放量为 7.2%,当加木聚糖酶时,阿魏酸的释放量大大提高,可达 21.9%,说明木聚糖酶和阿魏酯酶对阿魏酸的

释放有协同作用。当加入的是粗酶液时,与纯酶相比,加与不加木聚糖酶,其阿魏酸的释放量都得到提高。在 5 U PcFAE/g 麦糟时,加入了木聚糖酶,其阿魏酸的释放率最高可达 27.2%。分析了粗酶液中木聚糖酶的活性为 58 U/mL,添加的木聚糖酶其活性为 256 U/mL。实验过程也发现增加 PcFAE 纯酶至 15 U PcFAE/g 麦糟,同时增加木聚糖酶的酶活至 745 U/mL,麦糟中的阿魏酸释放率最大也只增加至 30.6%。若仅加木聚糖酶酶解麦糟,添加纯化的 PcFAE 或粗酶液,其阿魏酸的释放率仅为 1.45%。这表明,阿魏酸酯酶是降解麦糟释放阿魏酸的关键酶,同时粗酶中存在其他的水解酶,与 PcFAE 及木聚糖酶共同作用于麦糟纤维的降解。

表 5 PcFAE 添加或不添加木聚糖酶酶解麦糟时阿魏酸释放率

Table 5 Release percent of ferulic acid from Brewers' Spent Grain by PcFAE with and without xylanase

Yield/%	Purified PcFAE		Crude PcFAE	
	Not add xylanase	add Xylanase	Not add xylanase	add Xylanase
0.5 U PcFAE/g Brewers' Spent Grain	5.6	18.2	9.3	22.3
5U PcFAE/g Brewers' Spent Grain	7.2	21.9	11.2	27.2

3 讨论

产阿魏酸酯酶的菌种类较多,但有关桔青霉产阿魏酸酯酶还未见报道。不管是细菌还是真菌,它们的理化性质都差异很大,包括分子量、等电点、最适水解反应条件等。

PcFAE 亚基分子量约为 31 kDa,全酶分子量约为 58 kDa。其最适 pH 为 6.0,最适温度为 50 °C。从 PcFAE 的酶学性质来看,最适 pH、最适温度与来自 *S. thermophile* 的阿魏酸酯酶(StFAE-A)及来自 *A. niger* 的阿魏酸酯酶(FAE-B)最为接近^[18-19]。PcFAE 与 StFAE-a、FAE-B 都为同二聚体。StFAE-A 的反应最适 pH 为 6.0,在 pH 5.0-7.0 范围内酶活保持稳定,最适反应温度为 55 °C-60 °C,在 55 °C 酶活迅速下降;FAE-B 的反应最适 pH 为 6.0,最适反应温度为 50 °C。至今来自真菌的阿魏酸酯酶其反应的最适温度未超过 60 °C^[12]。仅见报道来自嗜温细菌 *C. stercorarium* 的阿魏酸酯酶其最适温度为 65 °C,在 70 °C 时酶活才迅速下降^[20],而本文报道的 PcFAE 是来自真菌,最适温度为 45 °C-65 °C,且在 25 °C-55 °C 之间,酶有很好的稳定性,其相对酶活都保持 98% 以上,当温度为 60 °C 时,14 h 后 PcFAE 酶活仍保持初始酶活的 55.2%。PcFAE 最适 pH 为酸性环境,且在 pH 5.0-6.0 保持酶活的稳定性。木质纤维的降解一般在酸性条件下进行,PcFAE 的这些特性有利于木质纤维的降解。

PcFAE 对苯乙烯甲酯的亲合力大小如下: MpCA > MFA > MSA,对 MCA 没有活性。而 StFAE-a、FAE-B 对苯乙烯甲酯的亲合力为: MSA > MFA > MpCA > MCA,与 PcFAE 不一致。根据 Crepint 等人^[10]确定的 FAE 分类标准,PcFAE 为 A 类,而 StFAE-a、FAE-B 是典型的 B 类酶^[18-19]。PcFAE 全酶分子量、最适 pH、最适温度与 StFAE-A 及 FAE-B 很接近,但是与底物亲和力却不一样。

丝氨酸蛋白质化学抑制剂 PMSF 完全抑制了 PcFAE 的活性,丝氨酸蛋白质生物抑制剂 aprotinin 及 leupeptin,对 PcFAE 也有一定的抑制作用。这是因为阿魏酸酯酶的结构是一个类似 α/β 水解酶的结构,含有一个由天冬氨酸/组氨酸/丝氨酸组成的催化三联体作为催化结构域^[21]。EDTA 对阿魏酸的酶活作用不明显,说明 PcFAE 不是金属蛋白酶。 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对 PcFAE 有显著的抑制作用,尤其是 Hg^{2+} ,几乎完全抑制了酶活,这与 Donaghy 等人的报道的来自细菌的阿魏酸酯酶一致^[20]。

另,目前报道产阿魏酸酯酶的青霉属有短密青霉^[22] (*Penicillium expansum*),扩张青霉^[23] (*Penicillium brevicompactum*)、绳状青霉^[24] (*Penicillium funiculosum*),其分泌的阿魏酸酯酶的部分理化特性如表 7。

从表 7 可知,青霉属产阿魏酸酯酶的分子量较为接近,且反应最适 pH 也很接近,但是反应最适温度却差别较大,且对羟基化肉桂酸甲酯的催化活性

不一致^[22-24]。阿魏酸酯酶的催化机理有待进一步深入研究。

表7 青霉属阿魏酸酯酶特性

Table 7 Properties of *Penicillium* feruloyl esterases

Species	Enzyme	Mol mass/ kDa	pH _{opt}	T _{opt} /°C
<i>Penicillium citrinum</i>	PcFAE	58	6.0	45-65
<i>Penicillium expansum</i>	FE	65	5.6	37
<i>Penicillium brevicompactum</i>	FE	nd	6	25-30
<i>Penicillium funiculosum</i>	FAEB	53	nd	nd

nd = no detect

由于植物细胞壁的复杂网络结构,研究结果表明单一使用阿魏酸酯酶并不能有效地降解植物纤维质,只有阿魏酸酯酶和细胞壁降解酶(主要是木聚糖酶)的协同作用,才能大大提高植物纤维质的降解,提高阿魏酸的释放量,因此课题组将研究 PcFAE 与其他水解酶的协同作用,以提高降解率,为综合利用木质纤维提供理论基础。

参考文献

- [1] Dervilly G, Saulnier L, Roger P, Saulnier L. Isolation of homogenous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48: 270-278.
- [2] Yosef E., Ben-Ghendalia D. Changes in the alkaline-labile phenolic compound of wheat straw cell walls as affect by SO₂ treatment and passage through the gastro-intestine of sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 2000, 83:115-126.
- [3] Liyama K, Lam TBT. Structural characteristics of cell walls of forage grasses-their nutritional evaluation for ruminants review. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2001, 14: 862-879.
- [4] Brezillon C, Kroon PA, Faulds CB, Brett GM, Williamson G. Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45: 371-376.
- [5] Micard V, Thibault JF. Oxidative gelation of sugar-beet pectins ;use of laccases and hydration properties of the Cross-linked pectins. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 39: 265-273.
- [6] Bartolome B, Santos M., Jimenez JJ, Nozal† M J, Gomez-Cordoves C. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 2002, 36: 51-58.
- [7] Mark LJ, Sun R, Banks WB. Fractional characterization of alkali-labile lignin and alkali-insoluble lignin from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 1996, 6: 291-300.
- [8] Ralet MC, Faulds CB, Williamson G, et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugarbeet pulp and wheat bran by ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 1994, 263: 257-269.
- [9] Faulds CB, Williamson G. Effect of hydroxycinnamates and benzoates on the production of Feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79: 450-452.
- [10] Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63: 647-652.
- [11] Topakas E, Vafiadi, Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Journal of Process Biochemistry*, 2007, 42: 497- 509.
- [12] Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt R-J, de Vries RP. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Journal of Biotechnology Letters*, 2008, 30: 387-396.
- [13] Crawford DL. Lignocellulose Decomposition by Selected Streptomyces Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 6: 1041-1045.
- [14] 黄艳凤,周庆礼,李士炼,等. 从黑麦麦麸中提取的阿魏酸的检测. *药物生物技术 (Pharmaceutical Biotechnology)*, 2004, 11(1):49-51.
- [15] Shin HD, Chen RR. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38: 478-485.
- [16] 汪家正, 范明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [17] Waldron KW, Selvendran RR. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiological Plant*. 1990, 80: 568-575.
- [18] Topakas E, Stamatis H, Biely P, Christakopoulos P. Purification and characterization of a type b feruloyl esterase (stfae-a) from the thermophilic fungus *sporotrichum thermophile*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63: 686-690.
- [19] Kroon PA, Faulds CB, Williamson G. Purification and characterisation of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1996, 23: 255-262.

- [20] Donaghy JA, Bronnenmeier K, Soto-Kelly PF. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 458-466.
- [21] McAuley KE, Svendsen A, Patkar SA, Wilson KS. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Biological crystallography*, 2004, 60(5): 878-887.
- [22] Donaghy JA, McKay AM. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 83: 718-726.
- [23] Donaghy JA, McKay AM. Production of feruloyl/rhocoumaroyl esterase activity by *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79: 657-662.
- [24] Kroon PA, Williamson G, Fish NM, Belshaw N J, Williamson G. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 6740-6752.

Purification and characterization of ferulic acid esterase from *Penicillium citrinum*

Xialan Li¹, Yunmin Fan¹, Baishan Fang^{1,2*}

(1Key Industry Biotechnology Laboratory of Fujian Province, HuaQiao University, Xiamen, Fujian 362021, China)

(2Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] Extracellular feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) from *Penicillium citrinum* culture filtrates was studied. The effect of feruloyl esterases on the enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain was also investigated. [Methods] Feruloyl esterase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography with a DEAE-Sepharose Fast Flow column, and column chromatography with a Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow column. [Results] The purified homogeneous preparation of native feruloyl esterase had a molecular mass of 58 kDa by native-PAGE and a subunit molecular mass of 31 kDa by SDS-PAGE. The optimum enzymatic activity was achieved at pH 6.0 and 45–65°C. The enzyme was stable at pH from 5.0 to 6.0 and temperature from 25 to 55°C. The enzymatic activity was slightly enhanced by Mg²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, and Na⁺, whereas it was slightly inhibited by Zn²⁺, strongly inhibited by Cu²⁺, and completely inhibited by Hg²⁺ and phenylmethanesulfonyl fluoride. EDTA had a slight influence on the enzymatic activity. The determination of k_{cat}/K_m revealed that the enzyme hydrolyzed methyl p-coumarate, methyl sinapate, methyl ferulate, methyl caffeate, and the values were 823, 416, 103, and 0, respectively. The k_{cat}/K_m values showed that the enzyme hydrolyzed MpCA faster and more efficiently than all the other substrates. When the crude feruloyl esterase was used to hydrolyze the brewer's spent grain, about 7.2% of the alkaline-extractable ferulic acid could be released, with the concentration of 5 u feruloyl esterase /g. [Conclusion] A feruloyl esterase was discovered. Its biochemical characteristics were different from what has been reported in literature. This provided an important basis for the exploitation of a feruloyl esterase.

Keywords: feruloyl esterase; purification; characterization

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel: +86-592-2185869; E-mail: fbs@xmu.edu.cn

Received: 25 December 2010/ Revised: 28 March 2010