

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

龚燕燕¹, 殷欣², 邬敏辰^{*3}, 曾妍¹

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 本研究通过 RT-PCR 技术从宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)E001 中克隆了编码阿魏酸酯酶 A 的成熟肽 cDNA (*AusfaeA*), 构建重组表达质粒 pPIC9K-*AusfaeA*, 将其经 Sac⁺ 线性化后转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115, 通过抗 G418 筛选获得高拷贝重组子 GS115/*AusfaeA*, 用甲醇诱导表达重组阿魏酸酯酶(reAusFaeA)。SDS-PAGE 显示, 纯化后的 reAusFaeA 为单一条带, 其表观相对分子质量为 36 000; 以阿魏酸甲酯为底物, 经高效液相色谱法测定, 该酶的酶活为 29.4 U/mg; reAusFaeA 的最适反应温度为 45 ℃, 并在 45 ℃以下稳定; 最适反应 pH 为 5.0, 在 pH 4.0~6.0 范围内稳定; 多数测定的金属离子及 EDTA 对该酶的活性影响不大。结果表明在 *P. pastoris* 中成功实现了 *AusfaeA* 的异源表达, 该重组酶优良的酶学性质表明其具有较大的工业应用潜力。

关键词: 宇佐美曲霉; 阿魏酸酯酶 A; 基因克隆; 表达; 毕赤酵母; 酶学性质

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)07—0706—07

Cloning, Expression and Enzymatic Characterization of Feruloyl Esterase A from *Aspergillus usamii*

GONG Yan-yan¹, YIN Xin², WU Min-chen^{*3}, ZENG Yan¹

(1. School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A cDNA gene (*AusfaeA*), which encodes a feruloyl esterase (FAE) A from *Aspergillus usamii* E001 (abbreviated to AusFaeA), was amplified by RT-PCR. The expressing plasmid pPIC9K-*AusfaeA* was constructed and linearized with Sac⁺, followed by transforming it into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant *P. pastoris* GS115/*AusfaeA* was screened by G418 and then was induced with methanol to express reAusFaeA. The purified reAusFaeA showed one single band on SDS-PAGE with an apparent molecular weight of 36.0 kDa. The feruloyl esterase activity of the reAusFaeA against methyl ferulate (MFA) reached 29.4 U/mg determined by HPLC. Its optimal temperature and pH were 45 ℃ and 5.0, respectively. It was stable at a

收稿日期: 2012-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通讯作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。E-mail: bioch@163.com

temperature of 45 °C or below, and at a pH range of 4.0~6.0. Its enzymatic activity was not significantly affected by an array of tested metal ions. This indicated that the *AusfaeA* was successfully expressed in *P. pastoris* and the excellent properties of the reAusFaeA make it a potential candidate for applications in industrial processes.

Keywords: *Aspergillus usamii*, feruloyl esterase A, gene cloning, expressing, *Pichia pastoris*, enzymatic characterization

阿魏酸(Ferulic acid), 化学名为 4-羟基-3-甲氧基苯丙烯酸, 是普遍存在于多种植物中的一种酚酸^[1], 除少数以游离形式存在外, 在细胞壁中阿魏酸或二聚体阿魏酸主要以酯键的形式连接在阿拉伯木聚糖的阿拉伯糖残基上^[2-3], 可增强阿拉伯木聚糖链的强度, 但从空间上限制了动物和微生物对植物细胞壁中纤维素、半纤维素的有效降解。

阿魏酸酯酶(E.C.3.1.1.73, Ferulic acid esterase, FAE)又称肉桂酸酯酶, 是羧酸水解酶的一个亚类, 属于胞外酶, 能水解阿魏酸甲酯、低聚糖阿魏酸酯和多糖阿魏酸酯中的酯键, 将阿魏酸释放出来^[4-5]。自 1991 年 Faulds^[6]等首次分离出阿魏酸酯酶以来, 已有超过 30 种阿魏酸酯酶被纯化, 其主要生物功能是水解植物细胞壁中多糖与阿魏酸连结的酯键, 释放出游离的单体阿魏酸或阿魏酸二聚体^[7]。阿魏酸因其具有较强的抗氧化活性和防腐作用而被广泛应用, 它也是目前诸多药材中的有效成分, 并在新型药材开发和化妆品行业广受青睐^[8]。反式阿魏酸在美国、日本已被允许用作食品添加剂^[1], 合成品阿魏酸钠具有治疗偏头痛、抑制花生四烯酸代谢等作用^[9]。目前生产阿魏酸的方法有化学合成法、碱法和酶法, 化学合成法因为反应周期长和产率低限制了其发展; 碱解法是目前商品化生产阿魏酸的主要途径, 但该法受原料限制, 产量低, 成本高, 因而国际市场上阿魏酸的价格居高不下^[10]。近年来通过酶解法生产阿魏酸已逐渐吸引众多学者的关注。已有报道表明, 阿魏酸酯酶可以和其它的半纤维素酶(如木聚糖酶) 协同作用促使微生物对植物细胞壁进行最大程度的降解^[11]。因此, 阿魏酸酯酶在造纸业、饲料业、乙醇制造等诸多领域具有广泛的应用前景。

作者利用实验室保藏的宇佐美曲霉菌株 *Aspergillus usamii* E001, 结合生物信息学分析的手段, 借助 RT-PCR 技术克隆了编码阿魏酸酯酶 A 的 cDNA 片段, 并实现了其在毕赤酵母 GS115 中的分

泌表达。同时, 对 reAusFaeA 的酶学性质进行了初步研究, 优良的酶学性质表明该酶具有较大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)E001 菌株由江南大学无锡医学院分子生物学实验室筛选和保藏; *E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 为克隆宿主菌, pUCm-T 为克隆质粒, 购于上海 Sangon 公司; *P. pastoris* GS115 为表达宿主菌, pPIC9K 表达质粒, 购自 Invitrogen 公司。

1.2 工具酶和试剂

各种限制性内切酶、rTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低分子量蛋白质 Marker 均购自 TaKaRa 公司; YNB、生物素、酵母粉、蛋白胨、G418、UNIQ-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; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 培养基

种子活化培养基(质量分数): 2% 玉米粉, 3% 豆饼粉, 3% KH₂PO₄, 1% CaCl₂, 1% MgSO₄; 诱导培养基(用于提 RNA): 0.9% NaNO₃, 0.05% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄, 0.4% 酵母提取物, 20% 麸皮提取液; LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基参考 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司)操作手册。

1.4 引物设计及合成

基于宇佐美曲霉与黑曲霉基因序列的相似性^[12-13], 参照 NCBI 上公布的 *Aspergillus niger* CBS 513.88 菌株基因组中阿魏酸酯酶 A 的基因序列, 结合生物信息学分析的手段, 设计出一对扩增编码 AusFaeA 成熟肽 cDNA 的特异性上下游引物。

上游引物 (Fae-F): 5'-GAATTCGCTTCCACG CA AGGCATCTC-3', 含 *EcoR* 位点。

下游引物 (Fae-R): 5'-GCGGCCGCTTACCAAG TACAAGCTCCG-3', 含 *Not* 位点。

1.5 宇佐美曲霉总 RNA 的提取

将 *A. usamii* E001 接种至种子活化培养基中, 于 30 °C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h, 以 3% 的接种量转至诱导培养基中, 于上述条件下振荡培养 24 h 后收集菌体, 用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取 *A. usamii* 的总 RNA。

1.6 编码 AusFaeA 成熟肽 cDNA 的克隆及分析

以提取的 *A. usamii* 总 RNA 为模板、Oligo dT-Adaptor 为引物, 逆转录合成 cDNA 第一链。以其为模板、Fae-F 和 M13 primer M4 为引物进行第一轮 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L, 包括: 5 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, 逆转录产物 2 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.5 μ L, Fae-F/M13 Primer M4 各 0.5 μ L, rTaq 酶 0.25 μ L, 双蒸水 35.25 μ L; 反应条件为: 94 °C 5 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 60 s), 72 °C 10 min。以第一步 PCR 产物为模板、Fae-F 和 Fae-R 为引物进行第二轮 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 5 min, 30 个循环 (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 60 s), 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 割胶回收目的条带, 具体操作参见 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit 说明书。将纯化的 PCR 产物直接与 pUCm-T 连接, 转化 JM109 感受态细胞; 经蓝白斑初选、质量分数 0.7% 琼脂糖凝胶电泳和 PCR 鉴定正确后, 送上海 Sangon 公司测序, 测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-*AusfaeA*。最后, 将测得的序列在 NCBI 上进行 Blast 分析。

1.7 重组表达质粒的构建

将测序验证过的 pUCm-T-*AusfaeA* 用 *EcoR* 和 *Not* 双酶切, 割胶回收目的基因 *AusfaeA*, 并与经同样双酶切的 pPIC9K 质粒连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 筛选鉴定获重组表达质粒 pPIC9K-*AusfaeA* 后, 送上海 Sangon 公司测序。

1.8 AusfaeA 在毕赤酵母 GS115 中的表达

pPIC9K 和测序验证过的 pPIC9K-*AusfaeA* 经 *Sal* 线性化后, 用电穿孔法分别将其导入毕赤酵母 GS115 中, 涂布于 MD 平板上筛选重组毕赤酵母; 将在 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含不同浓度 G418 的 YPD 平板上筛选抗最高浓度 2.0

mg/mL G418 的重组毕赤酵母, 分别命名为 GS115/9K 和 GS115/*AusfaeA*; 参照《分子克隆实验指南》的方法提取重组 GS115 基因组 DNA, 利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX PCR 鉴定目的基因是否整合入 GS115 基因组内。GS115/9K 和 GS115/*AusfaeA* 的常规表达参见 Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.9 reAusFaeA 的分离纯化与活性测定

将诱导表达的发酵液经 8 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 再经质量分数 80% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 盐析, 离心收集沉淀, 复溶于适量 20 mmol/L pH 6.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, 经透析、超滤浓缩 (超滤膜的截留相对分子质量为 10 000, Millipore 公司) 后用 Sephadex G-75 凝胶过滤层析柱纯化。蛋白质浓度测定采用 Bradford 法^[14], 以牛血清白蛋白为标准。采用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析。

以阿魏酸甲酯 (MFA) 为底物, 用高效液相色谱法 (HPLC) 测定经 reAusFaeA 水解后的产物中阿魏酸的释放量。具体步骤按 zhang^[15]提供的方法稍作修改: 移取 900 μ L MFA (1 mM, pH 6.0 磷酸盐缓冲液配制) 于 2 mL EP 管中, 45 °C 保温 10 min, 加入 100 μ L 适当稀释的酶液, 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分析。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。在测定条件下 (45 °C、pH 6.0), 以每分钟产生 1 μ mol 阿魏酸所需的酶量为一个酶活单位 (U)。

1.10 reAusFaeA 酶学性质的测定

1.10.1 reAusFaeA 的最适温度及温度稳定性 在 pH 6.0 的条件下反应 10 min, 测定 reAusFaeA 在不同温度下 (30~70 °C) 的酶活性。以某一温度下的最高酶活性为 100%, 其他温度下酶活性与最高酶活性的比值为该温度下的相对酶活, 绘制温度-相对酶活性曲线。将酶液分别置于 45、50、55 °C 下处理 10、20、30、40、50、60 min, 收取酶液, 采用高效液相色谱法测定残余酶活性。以 0 min 分钟取出酶液的酶活性为 100%, 残余酶活与其比值为相对酶活, 绘制时间-相对酶活性曲线。

1.10.2 reAusFaeA 的最适 pH 及 pH 稳定性 在最适反应温度下反应 10 min, 测定 reAusFaeA 在不同 pH 值 (pH 3.5~7.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液) 下的酶活性。以某一 pH 值下的最高酶活性为 100%,

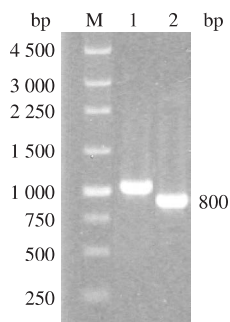
其他 pH 下酶活性与最高酶活性的比值为该 pH 下的相对酶活,绘制 pH-相对酶活性曲线。将用不同 pH 值缓冲液 (pH 3.5~7.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)稀释 25 倍的酶液于 35℃保温 1 h,按标准测定方法测定残余酶活性。以其中酶活性最高者为 100%,其他 pH 下酶活性与最高酶活性的比值为该 pH 下的相对酶活,绘制 pH-相对酶活性曲线。

1.10.3 金属离子和 EDTA 对 reAusFaeA 酶活性的影响 将酶液与不同金属离子或 EDTA (终浓度为 2.0 mmol/L)混匀后于 35℃保温 1 h,按标准测定方法测定残余酶活性。以只加缓冲液同样经过 35℃保温 1 h 的酶活性为 100%,来衡量金属离子和 EDTA 对 reAusFaeA 酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 编码 AusFaeA 成熟肽 cDNA 的克隆及分析

按照 1.6 中的方法进行 RT-PCR 及 PCR 反应,经质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测得到的电泳图如图 1 所示,目的条带位于 800 bp 左右的位置,与预期的基因片段大小相符。将目的条带割胶回收后与 pUCm-T 质粒进行连接,转化至 JM109 感受态细胞进行蓝白斑筛选。最后提取质粒进行电泳检测、PCR 鉴定并将带有目的基因的质粒送至上海生工进行测序,测序结果与预期序列相符,测序正确的重组质粒命名为 pUCm-T-AusfaeA。Blast 分析结果表明该序列与 *Aspergillus niger faeA* (Y09330.2)、*Aspergillus flavus* NRRL3357 *faeA* (XM_002380132.1) 及 *Aspergillus oryzae* RIB40 *faeA* (XM_001818700.1) 的序列同源性分别为 99%、70.9%和 70.6%。



M:250bp DNA Ladder Marker;1:第一轮 PCR 产物;2:第二轮 PCR 产物

图 1 AusfaeAPCR 产物电泳图

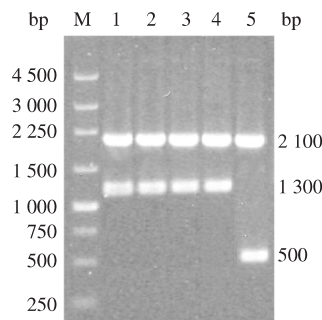
Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of AusfaeA

2.2 pPIC9K-AusfaeA 的构建与鉴定

按照 1.7 中的方法,将 pUCm-T-AusfaeA 和 pPIC9K 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切,酶切后分别进行电泳检测。前者得到了两条条带,一条在 2.7 kb 左右,另一条位于 800 bp 左右;后者得到一条位于 9 kb 左右的条带。将 800 bp 和 9 kb 左右的条带割胶回收。然后将回收的产物连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞。用 PCR 检测的方法筛选目的重组子,将目的重组子送至上海生工进行测序,结果表明基因没有发生突变,且读码框完全正确。

2.3 重组 GS115 的构建及高拷贝重组子的筛选与表达

按照 1.8 中的方法得到高拷贝的 GS115/*AusfaeA* 和 GS115/9K 重组酵母,提取酵母基因组利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 做 PCR 检测,如图 2 所示,因为 *P. pastoris* 基因组中本身含有一个醇氧化酶基因(AOX1),其大小为 2.1 kb,而 pPIC9k 中包含醇氧化酶-1(AOX1)基因的启动子和转录终止子(5'-AOX1 和 3'-AOX1),它们被多克隆位点(MCS)分开,外源基因可以在此插入,所以当利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 鉴定时,重组 GS115 均出现两条条带,GS115/*AusfaeA* 的 PCR 产物分别位于 2.1 kb 和 1.3 kb 附近,而 GS115/9K 的 PCR 产物分别位于 2.1 kb 和 0.5 kb 附近,结果表明 *AusfaeA* 已经成功整合入毕赤酵母 GS115 基因组内。然后,随机挑取鉴定过的重组酵母菌株进行诱导表达,8 000 r/min 离心 5 min 收集表达产物备测。



M: 250 bp DNA Ladder Marker;1-4:GS115/AusfaeA;5: GS115/9K

图 2 毕赤酵母重组子基因组 PCR 验证

Fig. 2 Verification of *P. pastoris* transformants by PCR

2.4 reAusFaeA 的酶活及 SDS-PAGE 分析

将表达产物按 1.9 的方法测定 reAusFaeA 的酶活,结果表明 GS115/*AusfaeA* 发酵上清液中 reAusFaeA 的酶活可达到 7.05 U/mL,而 GS115/9K

的发酵上清液中并未检测到阿魏酸酯酶活性。经纯化后的 reAusFaeA 比酶活为 29.4 U/mg。SDS-PAGE 结果显示, GS115/*AusfaeA* 的表达产物在约 36 000 处可见明显的特异性目的蛋白条带(图 3 泳道 2-3), 而 GS115/9K 的表达产物在该处并无特异性条带(图 3 泳道 1)。结果表明 reAusFaeA 的表观分子量高于理论计算相对分子量(28 300)。这可能由于 reAusFaeA 在 *P. pastoris* 表达过程中发生了糖基化或磷酸化等翻译后修饰。用软件 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分别对 N 和 O 糖基化位点进行预测。结果表明 *AusFaeA* 氨基酸序列中含有 1 个 N-糖基化位点。

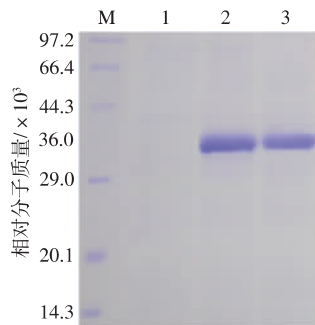


图 3 reAusFaeA 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of reAusFaeA

2.5 reAusFaeA 的酶学鉴定

按照 1.10.1 中的方法测定 reAusFaeA 的最适温度及温度稳定性。结果表明, 该酶的最适反应温度为 45 °C, 在 40~50 °C 的范围内催化活性较高(图 4); 由图 5 可以看出, 该酶在 45 °C 的条件下相当稳定, 处理 60 min 残余酶活仍能达到 89.3%; 当温度高于 45 °C 时, 残余酶活下降较快, 在 55 °C 下处理 20 min 后残余酶活性仅为 7.91%。这也说明该酶的热稳定性有待进一步地提高。

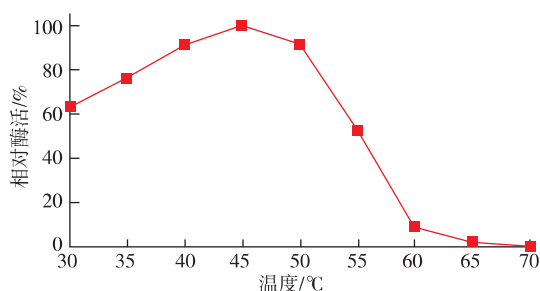


图 4 温度对 reAusFaeA 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of the reAusFaeA

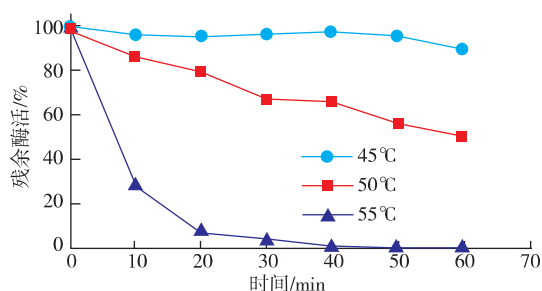


图 5 reAusFaeA 的温度稳定性

Fig. 5 Effect of temperature on enzyme stability

按照 1.10.2 中的方法测定 reAusFaeA 的最适 pH 及 pH 稳定性。结果表明, 该酶的最适 pH 为 5.0, 当 pH 低于 3.5 和高于 7.5 时该酶几乎没有催化活性(图 6)。由图 7 可知, 该酶在 pH 4.0~6.0 的范围内处理 1 h 后残余酶活仍能达到 60% 以上; 当 pH 值低于 4.0 和高于 6.5 时该酶的稳定性较差。

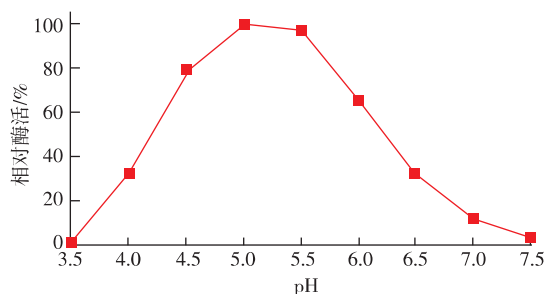


图 6 pH 对 reAusFaeA 酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on the activity of the reAusFaeA

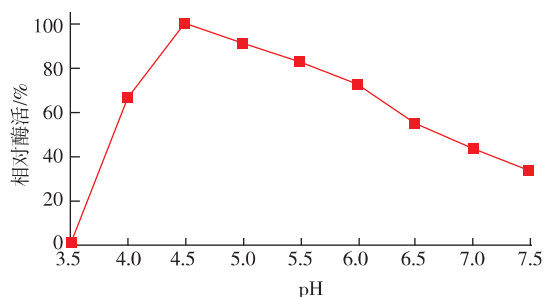


图 7 reAusFaeA 的 pH 稳定性

Fig. 7 Effect of pH on enzyme stability

按照 1.10.3 中的方法, 研究了不同金属离子及 EDTA 对 reAusFaeA 酶活性的影响。结果表明, 大多数被测的金属离子及 EDTA 对该酶的活性影响不大, 说明该酶具有被广泛应用的潜力。

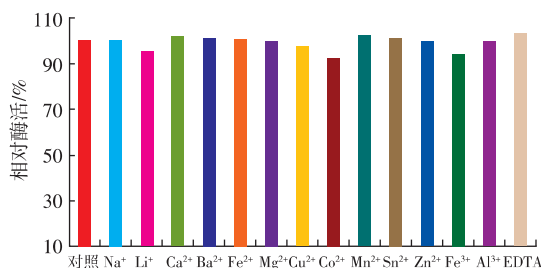


图8 金属离子和EDTA对AusFaeA酶活力的影响

Fig. 8 Effects of various metal ions and EDTA on the activity of the reAusFaeA

3 结语

阿魏酸酯酶有着重要的工业应用价值,通过基因工程技术实现阿魏酸酯酶的异源高效表达是降低其工业应用成本、适应工业应用条件的有效手段。国内对于阿魏酸酯酶异源表达的相关报道较少。Mathew等^[16]对*Aspergillus flavipes*进行了液体深层发酵获取了阿魏酸酯酶,以阿魏酸甲酯为底

物,最高酶活可达6.82 U/mL。

作者首次成功实现了*AusfaeA*在*P. pastoris* GS115中的分泌表达,毕赤酵母是一个优良的表达体系,其具有操作简便、可高水平地胞外表达、可进行糖基化、二硫键形成等真核翻译后修饰等优点^[17]。以阿魏酸甲酯为底物, reAusFaeA粗酶液的酶活可达到7.05 U/mL,经纯化后,该酶的比酶活为29.4 U/mg; SDS-PAGE表明出 reAusFaeA的表观分子量约为36.0 kDa;初步的酶学性质研究表明该酶的最适反应温度为45℃,并在45℃下相当稳定;最适反应pH为5.0,在pH 4.0~6.0的条件下处理1 h仍有60%以上的残余酶活;EDTA和大多数被测金属离子对该酶的活性影响不大;这些优良的酶学特性表明了该酶具有被广泛应用的潜力。遗憾的是,该酶在55℃的条件下处理20 min后残余酶活性仅为7.91%,表明该酶的热稳定性较差。若要将其与某些耐热的木聚糖酶共同使用,今后还需对其热稳定性进行必要的理性改造。

参考文献:

- [1] 许晖,孙兰萍,张斌,等. 微生物阿魏酸酯酶的研究进展[J]. 中国酿造,2008,10:11-15.
XU Hui, SUN Lan-ping, ZHANG Bin, et al. Advance research on feruloyl esterases produced by microbes[J]. *China Brewing*, 2008, 10: 11-15. (in Chinese)
- [2] Vries RP, DE Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(4): 497-522.
- [3] Luonteri E, Kroon P A, Tenkanen M, et al. Activity of an *Aspergillus terreus* α -arabinofuranosidase on phenolic-substituted oligosaccharides[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 67: 41-48.
- [4] Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, et al. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79: 428-434.
- [5] Crepin V F, Faulds C B, Connerton I F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 647-652.
- [6] Williamson G J, Faulds C B. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137: 2339-2345.
- [7] 胡雪松,李夏兰. 阿魏酸酯酶基因克隆表达调控及其应用进展[J]. 生物技术通报,2009,12:11-16.
HU Xue-song, LI Xia-lan. Review on cloning, expression, regulation and applications of feruloyl esterase genes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 12: 11-16. (in Chinese)
- [8] 刘晶晶,曹阳春,杨红建. 阿魏酸酯酶表达体系与酶蛋白拓扑空间结构分析[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(12):26-30.
LIU Jing-jing, CAO Yang-chun, YANG Hong-jian. Ferulic acid esterase expression system and enzyme protein topology analysis of the spatial structure[J]. *China Animal Husbandry And Veterinary Medicine*, 2009, 36(12): 26-30. (in Chinese)
- [9] Nethaji B M, Pattabhi V. Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid). *Acta Cryst*, 1988, C44: 275-277.
- [10] 刘子立,欧仕益. 离子交换法纯化阿魏酸的研究[J]. 广州食品工业科技,2003,20:44-47.
LIU Zi-li, OU Shi-yi. Extraction of ferulic acid from enzymatic hydrolysate by using ion-exchange adsorption [J]. *Guangzhou Food Science and Technology*, 2003, 20: 44-47. (in Chinese)

- [11] 李夏兰,程珊影,杨道秀,等. 阿魏酸酯酶和木聚糖酶协同降解麦糟[J]. 化工进展,2012,31(5):1096-1102.
LI Xia-lan, CHEN Shan-ying, YANG Dao-xiu, et al. Utilization of feruloyl esterase and xylanase for the degradation of brewers' spent grain[J]. **Chemical Industry And Engineering Progress**, 2012, 31(5): 1096-1102. (in Chinese)
- [12] Li J F, Zhao S G, Tang C D, et al. Cloning and functional expression of an acidophilic beta-mannanase gene (*Anman5A*) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*[J]. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, 2012, 60(3): 765-773.
- [13] Tang C D, Guo J, Wu M C, et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel acidophilic β -mannanase gene, *Auman5A*, from *Aspergillus usamii* YL-01-78[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(12): 2921-2929.
- [14] Bradford M. 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: 248-254.
- [15] Zhang S B, Pei X Q, Wu Z L. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 117: 140-147.
- [16] Mathew S, Abraham T E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005, 36: 565-570.
- [17] 谌斌,唐雪明,沈微,等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 23(4): 43-47.
CHEN Bin, TANG Xue-ming, SHEN Wei, et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and its preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 23(4): 43-47. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 第7届国际药用菌大会

会议名称(英文): The 7th International Medicinal Mushroom Conference

所属学科: 动植物微生物学, 病毒与免疫学, 医学免疫学, 病原生物学, 生物医学工程学

开始日期: 2013-08-26

结束日期: 2013-08-29

所在城市: 北京市 东城区

主办单位: Chinese Academy Engineering China Chamber of Commerce of Import and Export of Foodstuffs, Native Produce, and Animal By-Products

联系电话: +86-10-87109860

传真: +86-10-87109861

通讯地址: immc7@hotmail.com

会议网站: <http://www.immc7.com/>

会议名称(中文): 第十一届海峡两岸菌物学学术研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 细胞生物学, 病毒与免疫学

开始日期: 2013-08-17

结束日期: 2013-08-18

所在城市: 北京市 海淀区

具体地点: 中国科学院微生物研究所

主办单位: 中国菌物学会 中国科学院微生物研究所

[会务组联系方式] 联系人: 蒋娜、齐莎

联系电话: 010-64807455

E-MAIL: hsla2013@163.com

会议网站: http://www.msconf.org.cn/templates/T_Content/index.aspx?nodeid=8&page=ContentPage&contentid=539