

约氏乳酸杆菌中一种新的阿魏酸酯酶基因的克隆表达与性质研究

张 强¹, 白亚军², 蔡宇杰^{*1}, 郑晓晖²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 阿魏酸是一种重要的抗氧化剂,是近几年研究的热点。阿魏酸酯酶(FAEs)能够水解酯键来释放游离的阿魏酸。本文作者根据约氏乳酸杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)的全基因组序列和阿魏酸酯酶保守序列设计了一个新的阿魏酸酯酶的编码基因 Lj0900。通过 PCR 扩增,酶切连接,成功构建重组载体,并在大肠杆菌(BL21)中成功表达。对表达的 FAEs 用镍柱进行纯化,对获得纯酶进行了初步的酶学性质研究,用阿魏酸甲酯为底物的情况下,发现该酶的最适温度为 30 ℃,最适 pH 6。

关键词: 阿魏酸酯酶;克隆表达;酶学性质;约氏乳酸杆菌

中图分类号: Q 81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)11—1129—06

Cloning, Expression and Characterization of a New Feruloyl Esterases from the *Lactobacillus johnsonii* Strain

ZHANG Qiang¹, BAI Yajun², CAI Yujie^{*1}, ZHENG Xiaohui²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Ferulic acid is an important antioxidant, is a hot topic research in recent years. Ferulic acid esterase (FAEs) can hydrolyze the ester bond to release free ferulic acid. In this paper, according to the whole genome sequence of *Lactobacillus johnsonii* and the conserved sequence of ferulic acid esterase, the author designed a new encoding gene Lj0900 of ferulic acid esterase. By PCR amplification, enzyme connection, constructing the restructuring of the carrier, and successfully expressed in *E. coli* BL21. To study the preliminary properties of pure enzyme, crude FAEs was purified by nickel column. With the methyl ferulate as the substrate, discovered that the optimum temperature for the enzyme is 30 ℃, the optimum pH is 6.

Keywords: ferulic acid esterase, cloning and expression, enzymatic property, *Lactobacillus johnsonii*

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275066)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—),男,江苏无锡人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物化学及下游工程等方面交叉科学的研究。E-mail: yjcai@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张强,白亚军,蔡宇杰,等. 约氏乳酸杆菌中一种新的阿魏酸酯酶基因的克隆表达与性质研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1129-1134.

阿魏酸酯酶(Feruloyl esterases, FAEs), 另一名称是肉桂酸酯酶, 它属于羧酸酯水解酶类, 通常植物细胞中的阿魏酸与多糖连接的酯键就是由它水解的, 释放出游离的阿魏酸。它可以裂解植物细胞壁中的酯键, 破坏细胞壁结构, 从而可以创造出更多的生物资源, 因此在生物资源开发方面具有一定的应用价值。自从 1987 年第一次从 *Streptomyces olivochromogenes* 中发现以来, 相继已经发现有多种真菌, 细菌都能分泌 FAEs。目前已知的产 FAEs 的微生物主要有乳酸杆菌 (*Lactobacilli*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*), 黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*) 等^[1]。并且大部分的 FAEs 是从真菌中分离出来的^[2]。

自 1991 年第一个 FAEs 纯化以来, 现如今已有 30 多种 FAEs 得到了纯化^[3]。纯化的 FAEs 在分子量、等电点、最适反应条件等物理化学特性方面都各不相同^[4]。有报道表明单糖和双糖不支持微生物产 FAEs, 含有阿魏酸酯键的底物能诱导产 FAEs。

植物细胞壁之所以这么坚硬, 就是阿魏酸在其中起着举足轻重的作用。它可以在半纤维素与半纤维素之间, 木质素与木质素之间, 半纤维素与木质素之间形成连接, 形成一个网状的骨架结构^[5]。此外, 释放的阿魏酸是一种生理活性物质, 对它可以进行进一步的加工处理, 开发出更多的药用或保健等经济产品^[6]。

本文从实验室保藏菌中筛选产阿魏酸酯酶的乳酸杆菌, 对其基因组序列进行对比分析。并利用大肠杆菌工程菌异源表达可能的阿魏酸酯酶基因以验证其酶活性, 对其分离纯化后, 进一步研究其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 菌株和质粒 菌株为约氏乳酸杆菌株, *Lactobacillus johnsonii* NBC455 (由江南大学食品学院陈卫课题组惠赠)。大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* DH5 α 、质粒 pCold II。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 7.0~7.4, 115 °C 灭菌 20 min, LB 平板需添加额外 2% 的琼脂。

LB-氨苄青霉素(Amp)培养基(g/L): LB 培养基灭菌冷却至 40~50 °C 后加入 Amp, 终质量浓度为

0.1 mg/L。

1.1.3 主要试剂 基因工程操作作用酶, 包括限制性内切酶 (Xba I、BamH I)、T4DNA 连接酶、DNA 聚合酶、核酸电泳 DNA marker、核酸电泳 Loading Buffer、标准分子量蛋白购于大连 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖 (IPTG)、引物、柱式细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、质粒小量纯化试剂盒 Plasmid Purification Kit 均从上海生工购买; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器 超净工作台(苏州净化设备有限公司); 立式自动压力蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司); 高压细胞破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司); HYL-C 组合式摇床(太仓市强乐实验设备有限公司); DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 台式高速冷冻离心机(TGL-16M 湘仪); AKTA avant 蛋白纯化系统(美国通用公司); 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad); PCR 仪(美国 Applied Biosystems); 高效液相色谱 PerkinElmer Series225 (广东省设备厂); 扫描型紫外可见分光光度计 UV-3900(日本日立)。

1.2 方法

1.2.1 约氏乳酸杆菌总 DNA 的提取 (1) 在 3 mL LB 培养基中加 3 μ L 氨苄青霉素, 加 3 μ L 甘油管中的菌液, 37 °C 培养 12 h。(2) 取 2 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。(3) 按柱式细菌 DNAout 试剂盒的方法提取基因组 DNA, 保存在 -20 °C 冰箱中。(4) 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定其质量和纯度, 用紫外分光光度计测定其浓度大小。

1.2.2 设计引物及 PCR 扩增 通过序列比对, 根据保守氨基酸序列, 设计引物, 划线处的两个酶切位点分别为 Sac I 和 Xba I。

引物 1: 5'-GCCGAGCTCATGAGAACTGGTACTAAAATTATTA 3'

引物 2: 5'-GCCGTCTAGACTATTCACCTTTAAACCTACCA 3'

以 *Lactobacillus johnsonii* NBC455 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶纯化回收, 电泳验证一条带。

1.2.3 PCR 产物及质粒的双酶切和连接 将质粒和 PCR 产物进行双酶切。质粒酶切体系: 10 $\times$ cut buffer 5 μ L, 质粒 10 μ L, Sac I 和 Xba I 各 0.5 μ L, 无菌水 34 μ L 共 50 μ L。PCR 产物酶切体系: 10 $\times$ cut buffer 3 μ L, DNA 4 μ L, Nde I 和 Xba I 各 0.5

μL , 无菌水 $2\ \mu\text{L}$ 共 $30\ \mu\text{L}$ 。37℃水浴中切 1 h。将 DNA 片段克隆到 pCold-Ⅱ Vector 上, 并转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。连接体系: 10 $\times$ DNA ligase buffer $2.5\ \mu\text{L}$, DNA 片段 $8\ \mu\text{L}$, 载体 DNA $2\ \mu\text{L}$, T4DNA ligase $1\ \mu\text{L}$, 无菌水 $11.5\ \mu\text{L}$ 共 $25\ \mu\text{L}$ 。16℃水浴下连接 12~16 h。

1.2.4 制备大肠杆菌感受态 (1) 接种 *E. coli* DH5 α 和 BL21(DE3) 分别于含有 20 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 37℃、200 r/min 培养过夜。(2) 按 1% 接种量接种于 50 mL LB 培养基中, 37℃培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 (约 2~3 h)。(3) 将菌液转移到 50 mL 预冷的离心管中, 冰上放置 30 min, 8 000 r/min、4℃离心 5 min。(4) 弃上清, 加入 5 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液, 使菌体悬浮, 冰上放置 20 min, 8 000 r/min、4℃离心 5 min。重复 2 次。(5) 弃上清, 加入 1.5 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液, 含有 15% 的甘油, 轻轻悬浮菌体, 然后 100 μL 分装到 1.5 mL 离心管中, -70℃冰箱保藏备用。

1.2.5 重组大肠杆菌的诱导表达 (1) 重组质粒导入 BL21 大肠杆菌感受态中。(2) 加入 1 mL 不含抗生素的 LB 培养液, 37℃摇 1 h 使菌复苏。(3) 取 50 μL 涂布在含氨苄的 LB 琼脂平板培养基上。(4) 37℃培养 12 h 左右。(5) 挑平板上菌接到小试管 37℃培养过夜。(6) 部分保存甘油管, 加 500 μL 到 50 mL 摇瓶, 之前加 50 μL 氨苄。37℃培养 2.5 h, 15℃下静置 0.5 h, 在超净工作台中加 20 μL 的 IPTG。15℃下培养 24 h (摇床均设置为 250 r/min)。空载体转化的 BL21 同时诱导表达。(7) 离心收集菌体 (8 000 r/min, 5 min), 20 mmol 缓冲液复溶。

1.2.6 SDS-PAGE 及蛋白含量的检测 (1) SDS-PAGE 凝胶电泳。根据 Laemmli^[7] 方法, 在 1 mL 小试管中加入 10 μL 上样 buffer, 加 40 μL 细胞破碎上清液, 煮沸 10 min。同时空质粒表达的也要进行电泳检测。用 12% 的分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可以用来初步判定蛋白表达情况和后面纯化分离情况。(2) 蛋白浓度检测。根据 Bradford 考马斯亮蓝法^[8], 以牛血清蛋白为标准蛋白测定标准曲线, 测定蛋白浓度。取 0.1 mL 酶液, 0.9 mL 蒸馏水, 加 5 mL 考马斯亮蓝试剂盒染液, 反应 5 min 后测定 OD₅₉₅ 的吸光值。同时测定纯酶的蛋白浓度。

1.2.7 酶活测定方法 酶活测定方法为: 4 mL 反应体系, 包含 3 mL 磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 6.0),

0.5 mL 底物溶液 (4 mg/mL), 0.5 mL 酶液, 35℃反应 4 h, 高温 100℃加热终止反应, 以缓冲液替换酶液作为对照反应。用高效液相色谱^[9]检测底物和产物的含量。高效液相色谱检测条件为: 0~15 min 为 10% 乙腈, 90% 水 (0.1% 甲酸); 15~20 min 为 100% 乙腈, 0% 水; 20~30 min 为 10% 乙腈, 90% 水 (0.1% 甲酸)。定义酶活力: 每分钟氧化 1 μmol 底物为产物所需的酶量为一个酶活力单位。

1.2.8 重组蛋白的初步分离纯化 得到的粗酶液用 AKTA avant 蛋白纯化仪^[10] 进行镍柱纯化, 将 A1、A2、B1、B2 四根管路都放进水里, 设置 system flow 20 mL/min 流速, 进行排气。之后把 A1 放进结合液中, B1 放进洗脱液中, 再进行排气一次, 然后设置 system flow 1 mL/min、flow path (column position 3)、delta pressure 0.3、pre-pressure 0.5、Gradient 0, inset A1 平衡 10 min 后装柱子。然后上样粗酶液, 用 500 mmol/L 的高浓度咪唑缓冲液 B1 洗脱目的蛋白, 将吸附在离子柱上的蛋白洗脱下来, 收集有酶活的洗脱液用超滤管 (30 kDa) 进行浓缩。SDS-PAGE 验证纯化后蛋白条带是否单一。

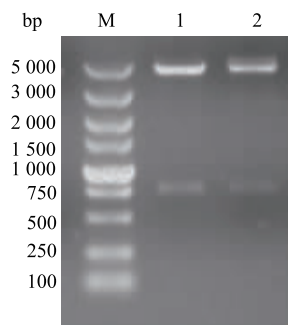
1.2.9 酶学性质 (1) 最适温度分析。以阿魏酸甲酯为底物研究温度对本发明所述酯酶酶活的影响, 将酯酶分别在 20~70℃下测定其酶活, 将酯酶置于 40、50、60 与 70℃下处理 3 h, 分别测定剩余酶活。(2) 最适 pH 分析。以阿魏酸甲酯为底物研究 pH 对本发明所述酯酶酶活的影响, 将酯酶分别置于 pH 值为 3~9 的缓冲液中处理 96 h, 测定剩余酶活。(3) 反应动力学常数的测定。加相同量的酶液到不同底物浓度的反应液中, 在最适温度和 pH 下测定酶活, 使用 Lineweaver-Burk^[11] 双倒数法做曲线计算 K_m 和 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆

通过序列比对, 根据保守氨基酸序列, 预测一段酯酶基因命名 Lj0900, 利用 PCR 技术成功扩增, 将质粒 pCold Ⅱ 和经割胶回收的 PCR 目的片段进行双酶切, 酶切后在 16℃条件下过夜连接。之后把连接产物导入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 挑取形态较好的单菌落进行菌落 PCR 后对其结果呈阳性克隆的转化子接种到含 Amp 的 LB 小试管中培养过夜, 提取重组质粒送往上海桑尼测序, 测序结果与

预期的目的基因序列一致,说明重组质粒构建成功。双酶切结果见图1。



M-Marker; 1, 2-重组质粒酶切

图1 重组质粒双酶切图

Fig. 1 Result of use enzyme to cut recombinant plasmid
测序结果如图2所示。

TTTTTATAAAGGGAATACACCATGAAATCACAAGT
GCATCATCATCATCATATGGAGCTCATGCTATTT
AAGACAAGTGATAATGTAGAAATTAATTACAGTTA
ACCGGAAAAGGAAAAATAATTGTTTATGTTAATGGT
TTTGGAGCTATCAAGAAATATGGTCAGCACAAGTA
CCATTTTAAATAAACTAGAGTATCAAGTTTAAACC
TATGATCAGAGAAATATGGGAAAAAGCCAACGAAC
AGAAAAAGGCCATACTATTGAGCGTTTGACACAAG
ATTTGAATGAAGTACATCATTTTGAAGAAATTAAC
AAGCTATTTTATAGGACATTCATGAGGGGCTTCTA
TCATCTTTTGTATTAATGAAAAATAATCCAAAGCTAG
TTAAACAAACATTGTTAATAGATCAGTCACCTAAAA
TGCTTAATGATGAAAAATTGGAAATATGGCTTTATGG
ATTATACAAAAGAAAAATTTTAAAAAATGCCAA
GAAATACACCGGTTTCATGAAACATATAATGGCTTG
GATGATAATGTGTATGCTAAGTTAATGAAGGCCAAG
AAAGCCAATCCATTAAATGAAAAAGATAATGTAGAT
TTGCTTGAAAAATCATATGTCATTAGATTGGCGAAGA
GTTTTAGAAAAAACAACTTCCAACTACTTTTTTT
GTTGCAAAAGGAAAGTCTTATTATCGAGAGGGATAT
GAAAAAGATCTTGAACAAAAGAAATGCCGAATAAA
TAGCTTTATTATGTCACCGACGGGACATGTAATTAT
GGCGGAAATCCACAGCAATTTAATATAAGTTAA
AGATATTTTAAAGTAATCTAGATAGGTAATCTCTGC
TTAAAAGCACAGAATCTAAGATCCCTGCCATTGGC
GGGGATTTTTTATTTGTTTCAGGAAATAAATAAAT
CGATCGCGTAATAAAATCTATTATTTTGTGAA
GAATAAATTTGGGTGCAATGAGAATGCGCAGCCCTT
TCGTCTCGCGCTTTTCGGTGATACGGTGAAACCT
CTGAACCATGC

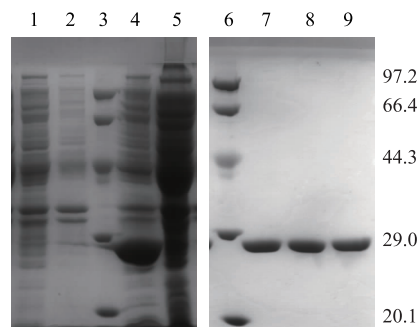
图2 重组基因测序

Fig. 2 Recombinant gene sequence

2.2 重组质粒的表达及纯化

按照1.2.5节方法对重组大肠和空质粒大肠进行诱导表达,培养24 h后,对表达后的菌体破碎,对上清液进行SDS-PAGE验证和酶活验证。对比发现重组大肠酶量得到很好的表达,并且按照1.2.7节方法,测定重组菌具有阿魏酸酯酶活性,而空质粒菌没有发现酶活。按照1.2.8节方法,重组蛋白经HisTrapHP组氨酸标记亲和层析柱纯化,收集峰位置的蛋白,进行SDS-PAGE验证和酶活验证,结果显示收集峰位置的蛋白具有阿魏酸酯酶的活性,并

且呈单一的条带,达到了下一步实验的要求。表达及纯化结果如图3所示。



1-pCold II 空质粒菌; 2-pCold II 空质粒菌+IPTG; 3-Marker; 4-Lj0900+IPTG; 5-Lj0900; 6-Marker; 7~9-纯化后的酶

图3 SDS-PAGE 验证酶的诱导表达和纯化

Fig. 3 To verify the result of induced expression and purification by using SDS-PAGE

2.3 酶学性质测定

2.3.1 最适温度的测定 不同温度下,阿魏酸酯酶的活力会有很大的影响,在以阿魏酸甲酯为底物时测定该酶在20、30、40、50、60、70℃下的酶活,以最高酶活为100%计算相对酶活。从图4中可以看出其最适温度为30℃,在低温下呈上升趋势,但超过40℃时酶活急剧下降,其与方园等人^[12]研究的最适温度25℃也相差无几。

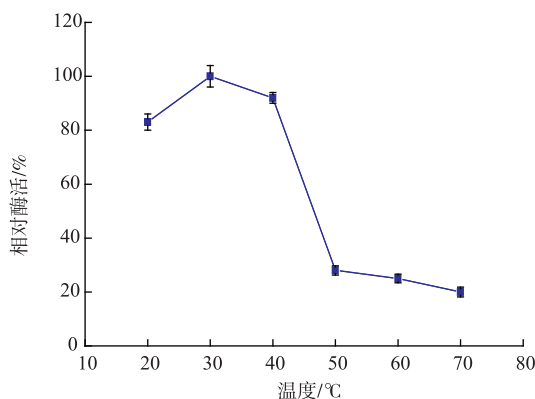


图4 酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of enzyme

2.3.2 最适pH的测定 pH对酶催化反应的影响也很大,pH过大(偏碱)或过小(偏酸)都会使酶失活。pH的改变能影响酶活性中心上必须基团的解离程度,同时影响底物与辅酶的解离程度,从而影响酶分子与底物分子的结合和催化。在以阿魏酸甲酯为底物时测定该酶在pH为3、4、5、6、7、8、9时的

活性,发现在低 pH 下,pH 越大,活性越高,在 pH 超过 6 时,活性开始下降,中性条件下活性比较高。其最适 pH 为 6。其最适 pH 与方园等人^[12]研究的阿魏酸酯酶基本一致。结果如图 5 所示。

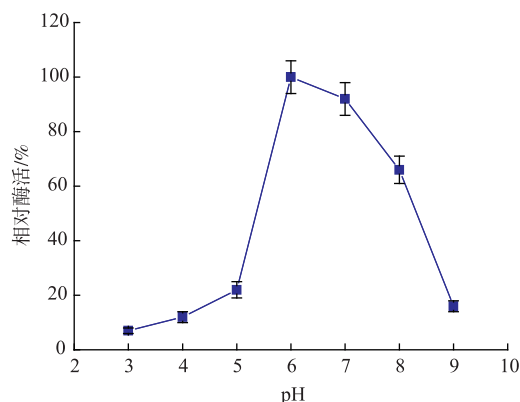


图 5 酶的最适 pH

Fig. 5 Optimum pH of enzyme

2.3.3 酶的反应动力学常数 K_m 是极为重要的反应动力学参数, $1/K_m$ 表示酶分子与底物之间亲和力的大小。 $1/K_m$ 值越大,酶与底物的亲和力越大。 k_{cat}/K_m 大小反映酶对底物的催化能力,值越高说明催化效率越高。分别以阿魏酸甲酯、阿魏酸乙酯、绿原酸、咖啡酸乙酯、对羟基肉桂酸甲酯为底物,测定该酶的 K_m 及 k_{cat}/K_m 值,如表 1 所示。发现以绿原酸为底物时, K_m 值最小,且催化效率最高, k_{cat}/K_m 达到 $1.13 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。在以阿魏酸甲酯为底物时,其 k_{cat}/K_m 值高于 Topakas 等^[13]研究的 $2.79 \times 10^2 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,但低于 Rumbold 等人^[14]的 $3 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。在以绿原酸为底物时,发现其 k_{cat}/K_m 小于 Lai 等人^[15]研究的数值。

表 1 反应动力学参数

Table 1 Kinetics parameters

底物	$K_m/$ (mmol/L)	$V_{max}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}/\text{mg}$)	$k_{cat}/$ (1/s)	$k_{cat}/K_m(\text{L}/$ ($\text{mol} \cdot \text{s}))$
阿魏酸甲酯	4.48	3.54	1.78	3.97×10^2
阿魏酸乙酯	14.62	0.43	0.22	0.15×10^2
绿原酸	3.12	7.02	3.53	1.13×10^3
咖啡酸乙酯	18.26	0.42	0.21	0.12×10^2
对羟基肉桂酸甲酯	8.27	0.45	0.23	0.28×10^2

3 结 语

龚燕燕等人^[16]从宁佐美曲美中克隆了编码阿魏酸酯酶 A 的基因,并成功在毕赤酵母中得到了异源表达。先前的研究已经在约氏乳酸杆菌中发现两个阿魏酸酯酶^[15],本文根据菌株的全基因组序列和阿魏酸酯酶的保守序列又发现了一个新的阿魏酸酯酶,是约氏乳酸杆菌杆菌中第三个阿魏酸酯酶。对其成功克隆表达,并具有较高的活性,对其酶学性质进行了初步的研究,发现其最适温度为 30°C ,最适 pH 为 6。新发现的阿魏酸酯酶为后人进一步研究阿魏酸酯酶奠定了一定的基础。现在随着分子技术的日益成熟,为 FAEs 找到更好的受体菌,从而实现更高效、高量的表达奠定了一定的基础。但是,不同菌株来源的 FAEs 在性质、作用等方面还是参差不齐的,况且这种酶主要是应用于医药、化妆品、食品等行业,更要对其安全性要求高,对此,尤其还要研究该酶的微生物安全性。所以说要实现工业化生产还是很难的。另一方面还可以结合微生物信息学研究其基因与酶学性质的关系。总而言之,阿魏酸酯酶具有广泛的应用前景,但距离实际的工业化生产还有不少的路要走,仍需要对其进行更深的研究。

参考文献:

- [1] MATHETW 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.
- [2] TOPAKAS E, VAFIADI C, CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 497-509.
- [3] FAUIDS C B, WILLIAMSON G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olitrochromogenes*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137: 2339-2345.

- [4] LI Xialan, HU Xuesong. Review on cloning, expression, regulation and applications of feruloyl esterase genes [J]. **Biotechnology Bulletin**, 2009(12): 12-16. (in Chinese)
- [5] PRIEFERT H, RABENHORST J, STEINBCHEL A. Biotechnological production of vanillin [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 56: 296-314.
- [6] FAULDS C B. What can feruloyl esterases do for us[J]. **Phytochemistry Reviews**, 2009, 9: 121-132.
- [7] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**, 1970, 227: 680-685.
- [8] BRADFORD M 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.
- [9] MASTIHUBA V, KREMICKY L, MASTIHUBOVA M, et al. A Spectrophotometric assay for feruloyl esterases [J]. **Analytical Biochemistry**, 2002, 309: 96-101.
- [10] GONZALEZ C F, PROUDFOOT M, BROWN G, et al. Molecular basis of formaldehyde detoxification, characterization of two S-formylglutathione hydrolases from *Escherichia coli*, FrmB and YeiG [J]. **Journal of Biology Chemistry**, 2002, 281: 14514-14522.
- [11] BENOIT I, ASTHER M, BOURNE Y, et al. Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73: 5624-5632.
- [12] FANG Yuan, OU Shiyi, ZHANG Ning. Preparation and enzymatic properties of ferulic acid esterase [J]. **Journal of Jinan University (Natural Science)**, 2012, 33(5): 481-485. (in Chinese)
- [13] TOPAKAS E, STAMATIS H, CHRISTAKOPOULOS P. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004, 63: 686-690.
- [14] RUMBOLD K, BIELY P, MASTIHUBOVA M, et al. Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aureobasidium pullulans*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(9): 5622-5626.
- [15] LAI K K, LORCA G L, GONZALEZ C F. Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabeted-resistant rats [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, 75(15): 5018-5024.
- [16] GONG Yanyan, YIN Xin, WU Minchen, et al. Cloning, expression and enzymatic characterization of feruloyl esterase a from *Aspergillus usami*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(7): 706-712. (in Chinese)

会 议 消 息

2018 第一届全国代谢生物学大会

会议网址: <http://smb.csp.escience.cn>

会议时间: 2018 年 12 月 4 日-7 日(4 日全天报到)

会议地址: 海南海口新燕泰大酒店

主办单位: 海南大学

承办单位: 海南大学热带农林学院

协办单位: 海南大学科学技术协会, 海南东南海会议有限公司

大会主席: 陈晓亚、朱健康、Cathie Martin

大会顾问: 李家洋、许智宏

组委会主任: 罗杰

会议简介: 为展示我国代谢生物学研究的最新成果和进展, 促进代谢生物学发展、助力动植物资源开发利用与人类健康, 加强相关领域科研人员间交流合作, 海南大学邀请代谢生物学相关领域具有重要学术影响的专家学者举办“2018 第一届全国代谢生物学大会”。大会邀请相关领域学者做口头报告。口头报告分为大会报告(40 分钟, 35 分钟报告+5 分钟提问)和专题报告(25 分钟, 20 分钟报告+5 分钟提问)。

大会主题: 代谢生物学助力动植物资源开发利用与人类健康

会议议题: “代谢生物学基础研究”、“代谢生物学技术前沿”、“代谢组学与疾病诊断”、“生物资源多样性与开发利用”。