

分类号: Q815

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520117

土曲霉阿魏酸酯酶融合表达、酶学性质及应用
Fusion expression, enzymatic properties, and applications of
ferulic acid esterase from *Aspergillus terreus*

学 生 姓 名: 韩红祥

校 内 教 师: 李 松 (副教授)

校 外 导 师: 刘尚

专业学位类别: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：韩江峰

日期：2025 年 5 月 17 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名： 韩江峰

指导教师签名： 李旭

日期：2025 年 5 月 17 日

日期：2025 年 5 月 17 日

土曲霉阿魏酸酯酶融合表达、酶学性质及应用

摘要

阿魏酸酯酶 (Feruloyl esterase, FAE, EC 3.1.1.73), 指能水解阿魏酸甲酯、低聚糖阿魏酸酯和多糖阿魏酸酯中的酯键, 将阿魏酸 (Ferulic Acid, FA) 游离出来的一种酶。它能切断细胞壁中多糖-多糖、多糖-木质素间的交联, 有利于细胞壁物质中多糖的降解和木质素的释放, 因此在食品、饲料和造纸工业具有广阔的应用前景。以本实验室保藏含有土曲霉阿魏酸酯酶 (AtFAE) 编码基因的重组质粒 pMD-rAtFAE 为基础, 与瘤胃真菌木聚糖酶 (rNpXYL, GenBank: MK138894.1) 编码基因进行融合后共表达 (rNpXYL-rAtFAE)。以构建的重组酵母 GS115/rAtFAE 分泌的 rAtFAE 为对照, 系统比较了 rAtFAE 与 rNpXYL 共表达产物对麸皮阿魏酸制备效率和黄芪多糖提取工艺中的协同效应, 为 rAtFAE 在应用方面提供了技术与理论支撑。为实现 rAtFAE 的高效应用, 本论文对 rAtFAE 进行了纯化和酶学性质研究, 对 rNpXYL 性质进行了研究, 同时对融合表达的重组毕赤酵母进行了发酵条件优化, 主要研究结果如下:

(1) 为提高阿魏酸酯酶的应用属性, 研究中将 AtFAE 编码基因与 rNpXYL 编码基因进行融合, 得到重组基因 *rNpXYL-rAtFAE*。融合基因 *rNpXYL-rAtFAE* 与 pPIC9K 质粒连接后导入巴斯德毕赤酵母 GS115, 得到重组菌 GS115/rNpXYL-rAtFAE。将重组菌 GS115/rNpXYL-rAtFAE 在 15 L 发酵罐中发酵, 结果表明, rAtFAE 最高的酶活力为 17.38 ± 0.34 U/mL, rNpXYL 酶活力为 952.01 ± 20.7 U/mL。较原始菌株 AtFAE 酶活力 (0.5 U/mL), rAtFAE 酶活力提高了约 34 倍。发酵液经 SDS-PAGE 检验, rAtFAE 分子量约为 39 kDa, rNpXYL 分子量约为 25 kDa。rAtFAE 经纯化后进行酶学性质研究, 结果显示 rAtFAE 在 50°C 时, 酶的相对活力最高; 当温度高于 50°C 时, 酶的活力急剧下降; 在 35-50°C 内具有良好的

稳定性, 其仍保留了 80% 以上的活性, 高于 50℃ 时酶活力开始逐渐下降; 30-50℃ 具有良好的热稳定性, 经过 3 h 保温之后, 酶活仍保留了 80% 以上。rNpXYL 酶学性质研究结果显示 rNpXYL 的相对催化活力在 65℃ 时最高。当温度高于 65℃ 时, 酶的活力开始下降, 在 40-55℃ 内的相对酶催化活力在 50%-80% 之间; pH 4.5-8.5 范围内催化活力较高, 最适 pH 值为 7.5, 具有较为广泛的 pH 作用范围。

(2) 为提高融合蛋白的表达量, 研究中分别使用摇瓶发酵法和 15 L 发酵罐发酵法对发酵培养基组分和发酵控制工艺进行了优化。获得摇瓶发酵培养基组分为: K₂SO₄ 25.0 g/L, CaSO₄ 5.0 g/L, 酵母粉 13.4 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 硝酸铵 20.0 g/L, PTM₁ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 7.5 g/L, 生物素(500×) 0.1%, 甘氨酸 20.0 mM, 苏氨酸 20.0 mM, 半胱氨酸 20.0 mM, 色氨酸 0.7 mM, 谷氨酸 20 mM, 天冬氨酸 14.0 mM; 利用该培养基在摇瓶发酵条件下获得 rAtFAE 酶活力为 4.33 ± 0.15 U/mL。相较于未优化前的 2.03 ± 0.08 U/mL, 优化后酶活力提高了约 2.13 倍。使用摇瓶发酵培养基在 15 L 发酵罐进行发酵条件优化, 结果显示在 30℃、pH 6.0、溶解氧浓度(诱导时溶解氧浓度在 10%-40% 区间)条件下, 获得 rAtFAE 的最高发酵单位为 17.38 ± 0.34 U/mL, rNpXYL 的最高发酵单位为 952.01 ± 20.7 U/mL。

(3) 为提高融合共表达获得的 rNpXYL-rAtFAE 在麸皮阿魏酸制备中的应用效果, 分别研究了温度、pH、料液比三个因素对重组酶 rAtFAE 和 rNpXYL-rAtFAE 释放麸皮中 FA 的影响。结果显示 rAtFAE (50 U/g 麸皮) 与 XYL (商品木聚糖酶, 300 U/g 麸皮) 释放麸皮中 FA 最优条件为: 温度 50.0℃、pH 5.0、料液比 1 g/35 mL, 在此条件下进行 5 次平行验证, 得到 FA 最大释放量为 1876.45 ± 30.05 μg/g 麸皮。rNpXYL-rAtFAE (rAtFAE 50 U/g 麸皮, rNpXYL 2750.12 U/g 麸皮) 在优化后的作用条件下(温度 50.0℃、pH 为 6.5、料液比为 1 g/35 mL) 获得 FA 最大释放量为 1917.62 ± 28.39 μg/g 麸皮。结果显示在麸皮 FA 制备过程中, 利用 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶组合所得到的作用效果, 表明在利用 rNpXYL-rAtFAE 制备麸皮 FA 时不用再额外添加 XYL 商品酶。

(4) 为拓展融合共表达获得的 rAtFAE 和 rNpXYL 的应用范围, 本研究系统评估了共表达酶制剂与纤维素酶、漆酶协同效应对黄芪多糖提取效率的影响。

实验结果表明，在优化反应条件（50℃、pH 5.5、料液比 1 g /15 mL）下，分别应用 rAtFAE 和 rNpXYL-rAtFAE 处理黄芪粉。在上述反应体系中添加 rAtFAE（5 U）、纤维素酶（100 U）、漆酶（5 U）、XYL 商品酶（100 U）后的总多糖提取率为 16.16%±0.25%（可溶性多糖 6.34%±0.12%，不可溶性多糖 9.82%±0.18%）。与水提法所得总多糖提取率 6.7%±0.15%（可溶性多糖 2.44%±0.08%，不可溶性多糖 4.26%±0.10%）相比，酶法使总多糖提取效率提高了 2.41 倍。在对照实验中（未额外添加木聚糖酶），采用同样的反应体系使 rNpXYL-rAtFAE（rAtFAE 活力 10 U，rNpXYL 活力 553.9 U）配合纤维素酶（200 U）与漆酶（5 U）时，多糖得率为 16.69%±0.27%。结果显示黄芪多糖提取过程中，利用 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶组合所得到的作用效果，表明在利用 rNpXYL-rAtFAE 制备麸皮 FA 时不用再额外添加 XYL 商品酶。

关键词：阿魏酸酯酶，融合表达，毕赤酵母，酶学性质，发酵优化，阿魏酸，多糖

Fusion expression, enzymatic properties, and applications of ferulic acid esterase from *Aspergillus terreus*

ABSTRACT

Feruloyl esterase (FAE, EC 3.1.1.73) refers to an enzyme that can hydrolyze the ester bonds in methyl ferulate, oligosaccharide ferulate and polysaccharide ferulic acid ester, and free ferulic acid (FA). It can cut off the cross-links between polysaccharides and polysaccharides and lignin in the cell wall, which is conducive to the degradation of polysaccharides and the release of lignin in cell wall substances, so it has a broad application prospect in the food, feed and paper industries. Based on the recombinant plasmid pMD-rAtFAE containing the gene encoding *Aspergillus* feruloesterase (AtFAE) in our laboratory, it was co-expressed with the gene encoding rumen fungus xylanase (rNpXYL, GenBank: MK138894.1) after fusion (rNpXYL-rAtFAE). The synergistic effects of rAtFAE and rNpXYL co-expression products on the preparation efficiency of bran ferulic acid and the extraction process of *Astragalus* polysaccharides were systematically compared with the constructed recombinant yeast GS115/rAtFAE secreted rAtFAE as the control, which provided technical

and theoretical support for the application of rAtFAE. In order to realize the efficient application of rAtFAE, the purification and enzymatic properties of rAtFAE, the properties of rNpXYL were studied, and the fermentation conditions of recombinant *Pichia pastoris* fused and expressed were optimized, and the main results are as follows:

(1) In order to improve the application properties of ferulic esterase, the recombinant gene rNpXYL-rAtFAE was obtained by fusing the gene encoding AtFAE with the gene encoding rNpXYL. The fusion gene rNpXYL-rAtFAE was linked to the pPIC9K plasmid and introduced into *Pichia pasteur pasteur* GS115 to obtain the recombinant bacterium GS115/rNpXYL-rAtFAE. The recombinant bacteria GS115/rNpXYL-rAtFAE were fermented in 15 L fermenter, and the results showed that the highest enzyme activity of rAtFAE was 17.38 ± 0.34 U/mL, and the activity of rNpXYL was 952.01 ± 20.7 U/mL. Compared with the original strain AtFAE (0.5 U/mL), the activity of rAtFAE was increased by about 34 times. The molecular weight of rAtFAE and rNpXYL was about 39 kDa and 25 kDa. The enzymatic properties of rAtFAE were purified and the results showed that the relative activity of rAtFAE was the highest at 50°C. When the temperature is higher than 50 °C, the activity of the enzyme decreases sharply; It has good stability at 35-50 °C, and it still retains more than 80% of its activity, and the enzyme activity begins to decline gradually when it is higher than 50 °C. It has good thermal stability at 30-50°C, and

more than 80% of the enzyme activity is retained after 3 h of heat preservation. The results of enzymatic properties of rNpXYL showed that the relative catalytic activity of rNpXYL was the highest at 65°C. When the temperature is higher than 65°C, the activity of the enzyme begins to decrease, and the relative catalytic activity of the enzyme in 40-55°C is between 50%-80%. The catalytic activity was high in the range of pH 4.5-8.5, and the optimal pH value was 7.5, which had a wide pH range.

(2) In order to improve the expression of fusion protein, the fermentation medium composition and fermentation control process were optimized by shake flask fermentation and 15 L fermentation tank fermentation, respectively. The components of shake flask fermentation medium were obtained as follows: K₂SO₄ 25.0 g/L, CaSO₄ 5.0 g/L, yeast powder 13.4 g/L, peptone 5 g/L, ammonium nitrate 20.0 g/L, PTM₁ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 7.5 g/L, biotin (500×) 0.1%, glycine 20.0 mM, threonine 20.0 mM, cysteine 20.0 mM, tryptophan 0.7 mM, glutamate 20 mM, Aspartic acid 14.0 mM; The activity of rAtFAE enzyme was 4.33±0.15 U/mL under shake flask fermentation conditions. Compared with 2.03±0.08 U/mL before optimization, the enzyme activity increased by about 2.13 times after optimization. The results showed that the highest fermentation units for rAtFAE were 17.38±0.34 U/mL, and the highest fermentation units for rNpXYL were 952.01±20.7 U/mL at 30°C, pH 6.0

and dissolved oxygen concentration (dissolved oxygen concentration in the range of 10%-40% at induction).

(3) In order to improve the application effect of rNpXYL-rAtFAE obtained by fusion co-expression in the preparation of bran ferulic acid, the effects of temperature, pH and solid-liquid ratio on the release of FA from bran by recombinant enzymes rAtFAE and rNpXYL-rAtFAE were studied. The results showed that the optimal conditions for the release of FA in bran from rAtFAE (50 U/g bran) and XYL (commercial enzyme, 300 U/g bran) were as follows: temperature 50.0°C, pH 5.0, and solid-liquid ratio of 1 g/35 mL, and the maximum release of FA was 1876.45 ± 30.05 $\mu\text{g/g}$ bran under these conditions. The maximum release of FA was 1917.62 ± 28.39 $\mu\text{g/g}$ under the optimized conditions (temperature 50.0°C, pH 6.5, solid-liquid ratio 1 g/35 mL) of rNpXYL-rAtFAE (rAtFAE 50 U/g bran, rNpXYL 2750.12 U/g bran). The results showed that the effect obtained by the combination of rAtFAE and XYL commercial enzyme could be fully achieved by using rNpXYL-rAtFAE in the preparation of bran FA, indicating that there was no need to add XYL commercial enzyme when using rNpXYL-rAtFAE to prepare bran FA.

(4) In order to expand the application scope of rAtFAE and rNpXYL obtained by fusion and co-expression, the synergistic effect of co-expression enzyme preparations, cellulase and laccase on the extraction efficiency of Astragalus polysaccharides was systematically evaluated.

The experimental results showed that under the optimized reaction conditions (50°C, pH 5.5, solid-liquid ratio 1 g/15 mL), rAtFAE and rNpXYL-rAtFAE were used to treat Astragalus powder, respectively. The extraction rates of total polysaccharides were $16.16\% \pm 0.25\%$ (soluble polysaccharides $6.34\% \pm 0.12\%$, insoluble polysaccharides $9.82\% \pm 0.18\%$) after adding rAtFAE (5 U), cellulase (100 U), laccase (5 U) and XYL commercial enzyme (100 U). Compared with the extraction rate of total polysaccharides obtained by water extraction ($2.44\% \pm 0.08\%$ soluble polysaccharides, $4.26\% \pm 0.10\%$ of insoluble polysaccharides), the extraction efficiency of total polysaccharides was increased by 2.41 times by enzymatic method. In the control experiment (without the addition of xylanase), the polysaccharide yield was $16.69\% \pm 0.27\%$ when rNpXYL-rAtFAE (rAtFAE activity 10 U, rNpXYL activity 553.9 U) was combined with cellulase (200 U) and laccase (5 U) using the same reaction system. The results showed that rNpXYL-rAtFAE could fully achieve the effect obtained by the combination of rAtFAE and XYL commercial enzyme in the extraction process of Astragalus membranaceus polysaccharides, indicating that there was no need to add XYL commercial enzyme when using rNpXYL-rAtFAE to prepare bran FA.

KEY WORDS: ferulic esterase, fusion expression, *Pichia pastoris*, enzymatic properties, fermentation optimization, ferulic acid, polysaccharides

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 阿魏酸酯酶研究概述.....	1
1.1.1 阿魏酸酯酶的微生物来源.....	1
1.1.2 阿魏酸酯酶性质及分类.....	1
1.1.3 阿魏酸酯酶异源表达.....	2
1.1.4 阿魏酸酯酶结构及催化机制.....	3
1.1.5 阿魏酸酯酶活力测定方法.....	5
1.2 阿魏酸酯酶的应用.....	5
1.3 阿魏酸酯酶与木聚糖酶的协同作用.....	8
1.4 立题依据、主要研究内容及技术路线.....	10
1.4.1 立题依据.....	10
1.4.2 主要研究内容.....	11
1.4.3 技术路线.....	11
第二章 土曲霉阿魏酸酯酶的重组表达、纯化及酶学性质研究.....	13
2.1 引言.....	13
2.2 实验材料.....	13
2.2.1 菌种与质粒.....	13
2.2.2 主要仪器设备.....	13
2.2.3 主要试剂.....	14
2.2.4 主要培养基.....	15
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 阿魏酸酯酶与木聚糖酶融合表达设计及重组菌构建.....	15
2.3.2 GS115/rNpXYL-rAtFAE 与 GS115/rAtFAE 发酵.....	16
2.3.3 重组阿魏酸酯酶的分离纯化.....	16
2.3.4 重组阿魏酸酯酶酶学性质研究.....	16
2.3.5 重组木聚糖酶学性质研究.....	18

2.3.6 阿魏酸酯酶活力的测定.....	19
2.3.7 木聚糖酶活力测定.....	20
2.3.8 蛋白质含量测定.....	20
2.4 结果与讨论.....	20
2.4.1 标准曲线.....	20
2.4.2 土曲霉阿魏酸酯酶 (AtFAE) 聚类分析	21
2.4.3 重组表达载体 pPIC9K-rNpXYL-rAtFAE 及重组毕赤酵母的构建	22
2.4.4 重组菌 GS115/rNpXYL-rAtFAE 发酵.....	23
2.4.5 rAtFAE 发酵制备及纯化.....	24
2.4.6 rAtFAE 最适反应温度及温度稳定性.....	25
2.4.7 rAtFAE 最适 pH 值及 pH 值稳定性.....	26
2.4.8 金属离子对 rAtFAE 酶活力的影响.....	26
2.4.9 表面活性剂对 rAtFAE 酶活力的影响.....	27
2.4.10 rAtFAE 米氏常数的测定.....	28
2.4.11 木聚糖酶最适温度及稳定性.....	29
2.4.12 木聚糖酶最适 pH 及 pH 稳定性.....	30
2.6 本章小结.....	30
第三章 重组毕赤酵母产阿魏酸酯酶发酵条件优化.....	32
3.1 引言.....	32
3.2 实验材料.....	32
3.2.1 主要仪器设备.....	32
3.2.2 主要试剂.....	32
3.3 实验方法.....	34
3.3.1 GS115/rNpXYL-rAtFAE 摇瓶发酵条件.....	34
3.3.2 摇瓶发酵培养基优化.....	34
3.3.3 15 L 发酵罐发酵工艺	37
3.3.4 15 L 发酵罐放大发酵工艺优化	37
3.4 方法分析.....	38
3.4.1 阿魏酸酯酶活力的测定.....	38

5.3 实验方法.....	60
5.3.1 黄芪多糖的酶法辅助提取.....	60
5.4 分析方法.....	62
5.4.1 总糖的测定.....	62
5.4.2 总糖得率计算方法.....	62
5.5 结果与讨论.....	62
5.5.1 总糖标准曲线.....	62
5.5.2 纤维素酶对黄芪多糖提取影响.....	63
5.5.3 木聚糖酶对黄芪多糖提取影响.....	63
5.5.4 漆酶对黄芪多糖提取影响.....	64
5.5.5 重组酶 rAtFAE 对黄芪多糖提取率的影响.....	65
5.5.6 重组酶 rNpXYL-rAtFAE 对黄芪多糖提取率的影响.....	65
5.6 本章小结.....	66
第六章 结论与展望.....	67
6.1 结论.....	67
6.2 本文创新点.....	67
6.3 展望.....	67
参考文献.....	69
攻读学位期间发表的学术论文目录.....	78
致谢.....	79

第 1 章 绪论

1.1 阿魏酸酯酶研究概述

阿魏酸酯酶（Feruloyl esterase, FAE, EC 3.1.1.73）是羧酸酯酶的一个亚类，能够从植物细胞壁^[1]、细胞质和合成底物中释放阿魏酸（FA）和其他羟基肉桂酸^[2]。FAE 存在于细菌^[3]、真菌和植物中^[4]，具有许多生物技术应用，例如：从农业副产品废物中获得 FA^[5]，随后将其生物转化为高附加值的芳香族化合物^[6]，在造纸工业中对非木本植物进行生物脱木素^[7]，为生物乙醇生产进行酶水解，改善反刍动物对饲料植物的消化，以及作为催化羟基肉桂酸酯酯化和酯交换的生物合成工具^[8]。

1.1.1 阿魏酸酯酶的微生物来源

20 世纪 80 年代，Mackenzie 等^[9]在橄榄色链霉菌（*Streptomyces olivochromogenes*）中发现了 FAE，该酶作用于麸皮并释放 FA，因此该酶被认为是属于半纤维素降解酶系。随后的研究中发现越来越多的真菌和细菌都可以分泌 FAE^[10]。目前自然界发现的 FAE 主要来源于微生物，分为真菌 FAE 和细菌 FAE 两种。尤其是关于真菌 FAE 的研究报道最多，例如黑曲霉（*Aspergillus niger*）^[11]、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）^[12]、土曲霉（*Aspergillus terreus*）^[13]、构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）^[14]、塔宾曲霉（*Aspergillus tubingensis*）^[15]和青霉（*Penicillium*）^[16-18]等。可以产 FAE 的细菌主要来源于动物的肠道菌或植物病原菌等，其 FAE 的研究和应用相对较少^[19]。

1.1.2 阿魏酸酯酶性质及分类

FAE 自 1987 年首次从黑曲霉中分离纯化以来^[9]，随后于 1991 年纯化。此后从植物、微生物中慢慢开始发现 FAE，其生化特性区间为：分子量（18.5-210 kDa）、pI（3.0-9.9）、最佳温度（20-75℃）和 pH（3.0-10.0）^[20]。底物特异性方面，FAE 可选择性水解 FA、芥子酸等酚酸与木聚糖或果胶的酯键，其结合口袋的疏水性与极性残基分布决定底物偏好性^[21]。此外，FAE 在有机溶剂（如甲醇）中部分保留活性^[22]，但高浓度离子易导致失活^[23]。研究还揭示其与半纤维素酶的协同效应：通过破坏木质素-碳水化合物复合体（LCC），提升多糖溶出率。目前，基于

理性设计或定向进化的分子改造正聚焦于优化其耐热性、催化效率及底物广谱性^[24]，以推动其在生物炼制与高值酚酸提取中的应用。

依据 FAE 对芳香型底物的特异性及其从酯化底物释放 FA 脱氢二聚体的能力，Crepin 等^[9]根据四种底物：阿魏酸甲酯（MFA）、咖啡酸甲酯（MCA）、对香豆酸甲酯（MpCA）和芥子酸甲酯（MSA）的特异性等因素，可以将该类酶分类为 A、B、C、D 四种基本类型^[25]（如表 1-1）所示，以及一种根据氨基酸序列的相似性而归类的一种假定的 E 型，例如细菌来源的 FAE 多被归类于 E 型之中^[26]。此外，随着宏基因组技术和蛋白质结构建模技术的发展，越来越多新的 FAE 及其结构被发现和鉴定，一些具有特殊催化性质的 FAE 被发现且无法归类于上述 5 种 FAE 的亚类之中^[27]。

表 1-1 阿魏酸酯酶的分类
Table 1-1 Classification of ferulic esterases

类型	底物	序 列 相 似 性	代表酶 名称	酶来源	是 否 释 放 阿 魏 酸 二 聚 体	参 考 文 献
A	MpCA/MSA/ MFA	脂肪酶 CE 家族	FaeA	<i>A. niger</i>	是 (5-5')	[28]
B	MCA/MpCA/ MFA	乙 酰 木 聚 糖 酯 酶绿原 酸酯酶、	FaeB/Fae-1	<i>P.funiculosum</i> / <i>N. crassa</i>	否	[29]
C	MCA/MpCA/ MFA/MSA	单宁 酸酶	FaeB/FaeC	<i>A.niger</i> / <i>T. stipitatus</i>	否	[30]
D	MCA/MpCA/ MFA/MSA	木聚 糖酶	XYLD/EstA	<i>P.equi</i> / <i>P. fluorescens</i>	是 (5-5')	[31]

1.1.1.3 阿魏酸酯酶异源表达

发酵法制备主要依赖于丝状真菌或细菌的高效表达系统，其中黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[32]、木霉 (*Trichoderma*)^[33]和嗜热真菌 (如 *Thermomyces lanuginosus*)^[34]是常用生产菌株。而利用原始菌株发酵制备 FAE，一般有液态发酵和固态发酵方式两种，可以使用麸皮、燕麦木聚糖和甜菜渣等廉价原料，但发酵单位一般较低，通常在 1 U/mL^[35]以下。因此，利用蛋白重组技术是目前实现 FAE 高效表达制备的有效途径之一^[36, 37]。20 世纪 90 年代初首次报道了从真菌中纯化酶，而直到 1997 年才报道了第一个真菌 FAE 基因的克隆。随着技术的成熟，越来越多不同来源的 FAE 在毕赤酵母和大肠杆菌中进行异源表达。如 Gong 等^[36]将 *Aspergillus usamii* E001(AuFaeA)基因克隆入毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中进行异源表达，并对酶学性质进行了研究。Wu 等^[37]对来源于 *Aspergillus niger* 的 (Anfae)基因克隆入毕赤酵母(*P. pastoris*)中进行异源表达，为了提高重组菌的酶活力对其密码子进行了优化并。此外，分子层面针对酶活力的优化方式还有启动子替换^[38]、启动子前面加一个增强子^[39]、重塑催化活性口袋等。如 Chin 等^[40]经过密码子优化的黑曲霉 FAE 表达量(35.12 U/mL)，相比较于未优化前的(5.51 U/mL)，提高了约 6.4 倍。此外还有大量 FAE 在原核大肠杆菌中进行表达，如 Tavera^[41]分离并鉴定了一株 FAE 产生菌 (脆乳杆菌 S524)，并将其 FAE 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了异源表达。

1.1.4 阿魏酸酯酶结构及催化机制

Jeon 等^[42]对嗜酸乳杆菌阿魏酸酯酶 (LaFae) 的晶体结构进行了阐述，该晶体拓扑结构包含 9 个 α 螺旋和 8 个 β 链， $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 链形成反平行的 β -折叠，而 $\beta 3$ - $\beta 8$ 链形成平行的 β 折叠。七个 α -螺旋围绕 β -折叠，形成一个核心结构域，其中包含一个具有保守催化三联体残基 (Ser106、Asp197 和 His225) 的活性位点。 $\alpha 5$ -和 $\alpha 6$ -螺旋形成帽域，这些结构特征表明 FAE 具有典型的 α/β 折叠。该序列中的丝氨酸 (Ser) 与天冬氨酸 (Asp)、组氨酸 (His) 构成了 FAE 的三联体催化活性中心 (Ser106-Asp197-His225)。

黑曲霉来源的阿魏酸酯酶 AnFaeA 具有典型的 A 类酶结构特征。McAuley 等^[43]与 Hermoso 等^[44]通过 X 射线晶体学解析发现，该酶呈现经典的 α/β 水解酶折叠构型 (图 1-1A)，其核心结构包含：由 9 个 β 折叠片组成的主 β -折叠层 (图 1-1B)、两个各含 2 个 β 折叠片的辅助结构域以及 7 个 α 螺旋，该拓扑结

构与真菌脂肪酶及其他丝氨酸水解酶具有显著同源性^[45]。该酶的催化中心由保守的 Ser133-His247-Asp194 三联体构成，其中 Ser133 定位于特征性五肽基序（GX SXG，"亲核肘"）的核心位点^[46]，His247 作为质子受体，而 Asp194 通过氢键网络稳定 His247 的取向^[47]。值得注意的是，68-80 位氨基酸残基形成的"盖子"结构调控活性中心的可及性，其动态行为与脂肪酶的催化调控机制相似^[48]。该区域附近的极性氨基酸残基（如 Glu72、Asp75）及唯一的 N-糖基化位点（Asn76）通过构象调控维持催化中心的开放状态，这对酶活性的表达至关重要。

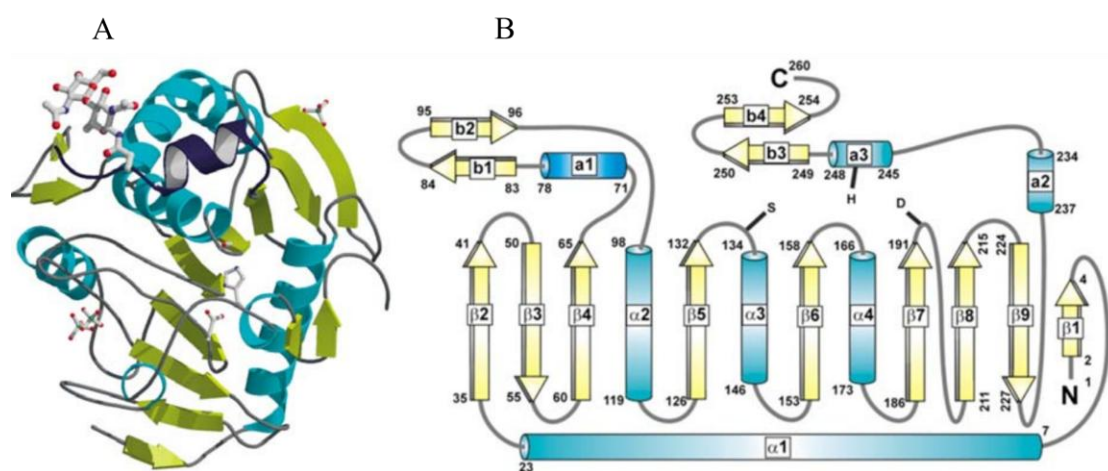


图 1-1 阿魏酸酯酶 AnFaeA 的结构 A: AnFaeA 的三级结构; B: AnFaeA 的二级结构
Fig. 1-1 Structure of ferulic esterase AnFaeA A: Tertiary structure of AnFaeA; B: Secondary structure of AnFaeA

尽管越来越多的 FAE 被挖掘出来，但是不同来源的 FAE 都有着共同点，其催化机理与丝氨酸蛋白酶相同^[49]，即催化中心均由 Ser-Asp-His 三联体结构组成。在催化过程中，被催化底物中经 FAE 的活性中心和辅助中心联同约束阿魏酸残基^[50]，经活性中心 Ser-Asp-His 三联体催化将酯键打开，酯键断裂后 FA 游离出来，如图 1-2 所示。

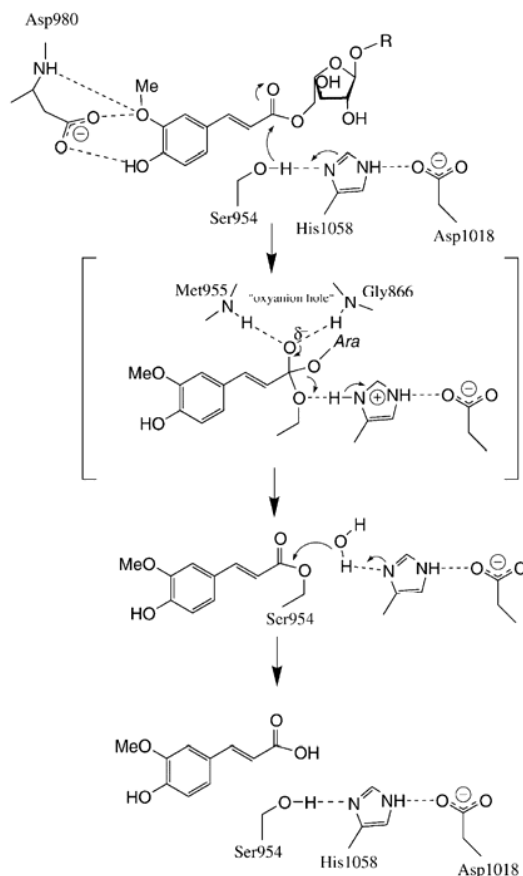


图 1-2 阿魏酸酯酶的催化机制

Fig.1-2 Catalytic mechanism of feruloyl esterase

1.1.5 阿魏酸酯酶活力测定方法

F AE 活力测定方式有很多种，液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳分析以及作用于麸皮当中^[51]，通过紫外分光光度计检测释放的 FA 释放量来测定酶活力。液相色谱法检测手段最为常见，但比较费时费力，而人工合成的对硝基苯酚阿魏酸酯与 F AE 结合后可以在紫外分光光度计下快速的检测对硝基苯酚的生成量。

1.2 阿魏酸酯酶的应用

F AE 作为一种关键水解酶，在多个工业与生物技术领域展现出重要应用价值。其核心功能在于特异性切断植物细胞壁中阿魏酸与多糖（如阿拉伯木聚糖）间的酯键^[52]，释放游离阿魏酸（FA）及低聚糖，同时破坏半纤维素-木质素交联结构，显著提升植物生物质的可及性。在生物燃料领域^[53]，F AE 与纤维素酶协同作用可增强木质纤维素的酶解效率，降低生物乙醇生产的预处理成

本，推动可再生资源的高效转化^[54]。在食品工业中，FAE 催化谷物副产物（如麸皮）中结合态 FA 的释放，不仅提高其抗氧化活性^[55]，还可生成功能性低聚糖，作为天然防腐剂或益生元添加剂，用于功能性食品开发^[56]。医药领域则聚焦于 FA 的生理活性，FAE 介导的 FA 可控释放系统被用于抗炎、抗肿瘤及神经保护药物的递送载体，而阿魏酸二聚体因其抗菌特性在创面敷料研发中备受关注^[57]。此外，FAE 在纸浆漂白与饲料加工中通过降解木质素-碳水化合物复合体，可减少化学试剂用量并提升产品质量^[58, 59]。当前研究通过酶工程优化（如定向进化、固定化技术）^[60]及发酵工艺创新，进一步提升 FAE 的催化效率与稳定性，为其工业化应用奠定基础。

1.2.1 在阿魏酸制备中的应用

在植物细胞壁中，FA 在聚合物间和聚合物内交联中起着关键作用。它也可能通过醚或酯键与木质素共价连接，并酯化为多糖^[61]。FA 及其脱氢二聚体在特定过氧化物酶的催化下与邻近的阿拉伯木聚糖交联。阿拉伯木聚糖主链由 β -1,4 糖苷键连接的 D-吡喃木糖（Xylp）残基构成^[62]，如图 1-3 所示。其侧链通过阿拉伯呋喃糖（Araf）取代基修饰，形成复杂的支化结构^[63]。阿拉伯呋喃糖通过 α -1,3 键或 α -1,2 键连接到主链木糖的 O-2 或 O-3 位羟基上，形成侧链分支。部分阿拉伯呋喃糖的 C-5 羟基进一步通过酯键 FA 的羧酸基团结合，形成阿魏酰化阿拉伯木聚糖酯^[64]。阿魏酸单体或二聚体作为“分子桥”，通过酯键将不同阿拉伯木聚糖链的侧链阿拉伯呋喃糖交联，形成三维网络结构^[65]。在植物细胞壁中，这种交联进一步通过氢键或范德华力与木质素（Lignin）的苯丙烷单元结合^[66]，增强细胞壁的机械强度和抗降解性。FAE 特异性识别并水解阿拉伯木聚糖酯中阿魏酸与阿拉伯呋喃糖之间的酯键（R-O-CO-FA）^[67]，释放游离阿魏酸及其二聚体。酶解后，阿拉伯木聚糖的交联网络被破坏^[68]，半纤维素-木质素复合体解离，从而提高纤维素酶对纤维素的可及性，促进植物细胞壁多糖的高效降解^[69]。

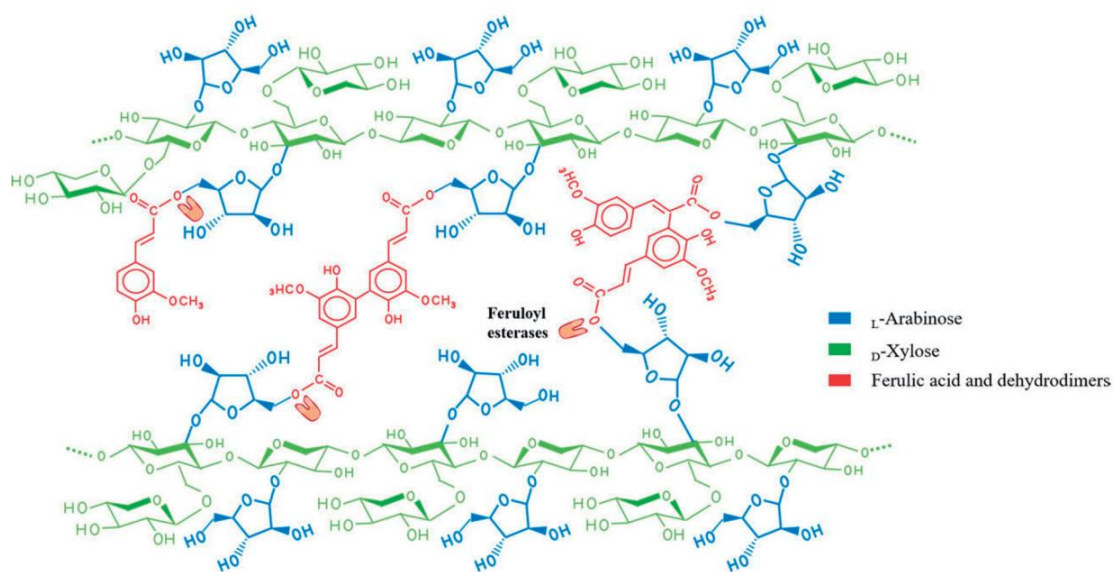


图 1-3 阿拉伯木聚糖酯与 FA 和 FA 脱氢二聚体连接的示意图。木质聚糖由 β -1,4-D-吡喃二糖残基。阿拉伯呋喃糖基取代基通过 α -1,3 和/或 α -1,2 键连接在 D-木糖残基中。阿魏酰残基通过酯键连接到阿拉伯呋喃糖取代基的 C-5 位置。

Fi.1-3 Schematic diagram of arabinoxylan ester attached to FA and FA dehydrodimer. Lignylan consists of β -1,4-D-pyranodiol disaccharide residues. The arabinofuran furanosyl substituent is linked to the D-xylose residue by A-1,3 and/or A-1,2 bonds. The ferulic residue is attached to the C-5 position of the arabinoyloxyyl substituent by an ester bond.

1.2.2 阿魏酸酯酶在生物质能源制备中的应用

植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素构成^[70,71]。纤维素是由 β -1,4-葡萄糖链形成的微纤丝^[72]，提供抗拉强度和结构支撑；半纤维素为支链多糖（如木聚糖、葡甘露聚糖）^[73]，通过氢键连接纤维素微纤丝，并交联木质素，使细胞壁更加坚韧。木质素作为疏水聚合物填充空隙，三者形成“钢筋-混凝土”复合结构，维持细胞形态并抵御外界胁迫。导致酶解效率不高^[74]而加入纤维素酶可水解 β -1,4-糖苷键，分解纤维素为葡萄糖^[75]；半纤维素酶（如木聚糖酶）切断半纤维素的糖链主链或侧链^[76]，释放木糖等单糖；阿魏酸酯酶特异性断裂半纤维素与木质素间的阿魏酸酯键，破坏交联网络。三者的协同作用削弱细胞壁致密结构，释放被束缚的多糖，显著提高可溶性糖的溶出效率

FAE 可以从可再生木质纤维素材料生产燃料乙醇。*A.niger* FaeA 还与 XYL 和漆酶结合使用^[74]，将木质纤维素生物质转化为可发酵糖，并且本文后续的实验结果也证明了此结论。在糖化步骤中，通过测量糖产量来评估酶处理的功效，其中 FaeA 和 XYL 处理的组合获得了最佳结果^[77]。因为植物细胞壁中含有大量的

木质素，而木聚糖^[78]作为除木质素外含量第二的物质，由于木聚糖被半纤维素包裹，XYL 可以水解植物细胞壁中的半纤维素并随机切割 β -1,4-D-木糖苷键使其多糖和寡糖被释放出来，同时木聚糖暴露出来^[79]。而加入 FAE 可以水解木聚糖与其他分子交联的酯键，使 XYL 酶解效率更高并成为可发酵糖原材料^[80]。

1.2.3 阿魏酸酯酶在医疗领域中的应用

FAE 在医疗领域中的应用潜力主要源于其释放 FA 的能力，由于其抗氧化和抗菌特性^[81]，FA 被用作食品防腐剂，在某些情况下使其成为受欢迎的食品添加剂^[82]。近年研究发现^[83]，FAE 与纤维素酶协同降解植物纤维产生的活性物质可抑制病原菌增殖，在抗菌敷料或肠道微生态调节剂中具有应用价值。尽管临床转化尚处探索阶段，但其在靶向药物开发、功能性成分提取及慢性病干预中的多效性已引起广泛关注^[84]。未来需结合酶工程优化 FAE 稳定性及底物特异性，以推动其在精准医疗中的实际应用。

1.2.4 阿魏酸酯酶在造纸工业中的应用

为了获得用于工业的高质量纤维，主要问题是消除木质素，木质素在结构上嵌入纤维素和半纤维素网络中，导致纸浆颜色变深^[85]。卡夫工艺使用氯化物进行化学处理来漂白和去除木质素^[86]，但该方法会在生产过程中产生大量的二恶英和氯木质素，这是一种污染化合物。而生物转化的高特异性为化学漂白提供了一种替代方案，半纤维素酶和氧化还原酶，如 XYL 和漆酶，正被用于纸浆漂白，以减少造纸过程中氯的消耗并提高纸张的最终亮度^[87]。Record 等^[88]将 *A.niger* FaeA 与 XYL 和漆酶处理相结合，被证明可以有效地对麦草浆进行脱木素处理。

1.3 阿魏酸酯酶与木聚糖酶的协同作用

FAE 目前多应用于植物细胞壁中的生物质降解，因为它们能够破坏木质纤维素-半纤维素之间相互交联的酯键，可以通过与 XYL、阿拉伯呋喃糖苷酶(ABF)、甘露糖苷酶、半乳糖苷酶、 β -木糖苷酶和鼠李糖半乳糖苷酶协同作用来提高其生物物质的降解效率^[89]如图 1-4。

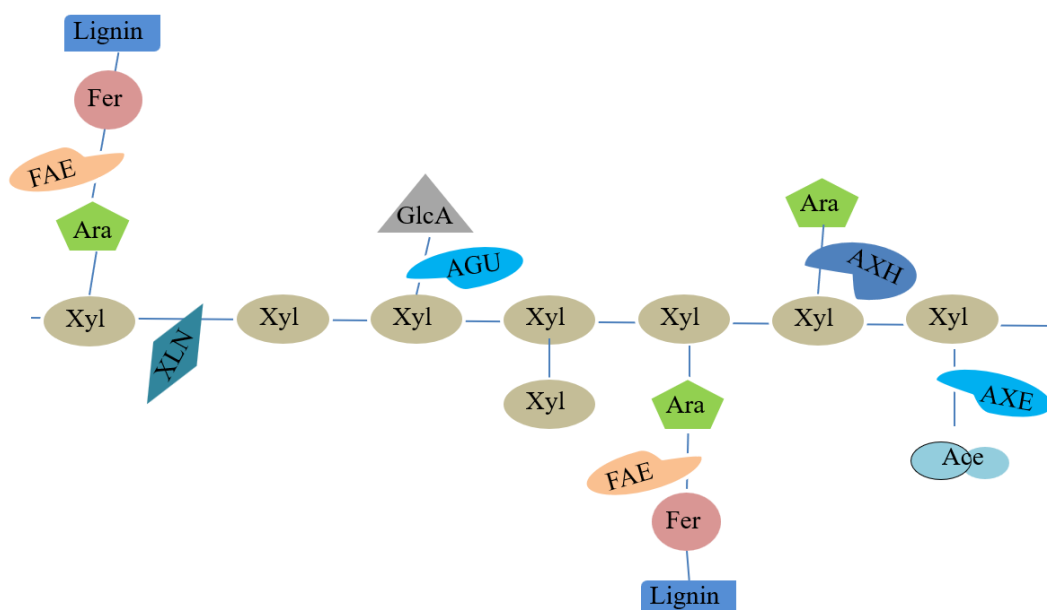


图 1-4 通过 FAE 和其他酶处理木聚糖的图示，分别指示酶可能作用的位置。Xyl: 木糖；Ara: 阿拉伯糖；Fer, 阿魏酸；GlcA, 葡萄糖醛酸；Ace, 乙酰基。XLN: 木聚糖酶；AGU: 葡萄糖醛酸酶；AXE: 乙酰木聚糖酯酶；AXH: 阿拉伯呋喃糖苷酶；FAE: 阿魏酸酯酶。

Fig. 1-4 Illustration of xylan treated with FAE and other enzymes, indicating where the enzyme may act. Xyl: xylose; Ara: arabinose; Fer, ferulic acid; GlcA, glucuronic acid; Ace, acetyl. XLN: xylanase; AGU: glucuronidase; AXE: acetyl xylansterase; AXH: arabinofuranosidase; FAE: ferulic esterase.

木聚糖酶(XYL)是一类特异性水解木聚糖主链 β -1,4-糖苷键的糖苷水解酶，在植物细胞壁降解中起关键作用^[90]。植物细胞壁中，木聚糖作为半纤维素的主要成分，通过氢键与纤维素微纤丝结合，并通过酯键（如阿魏酸交联）与木质素形成木质素-碳水化合物复合体（LCC）^[91]，构成抗降解屏障。木聚糖酶的作用机制分为两步：内切酶随机切割木聚糖主链，降低其聚合度并暴露更多水解位点；外切酶或 β -木糖苷酶进一步分解寡糖为木糖单体^[92]，破坏半纤维素网络结构。此过程不仅削弱木聚糖自身的物理屏障，还通过解除其对纤维素的包埋作用，显著提升纤维素酶的可及性^[93]。此外，木聚糖酶常与阿拉伯呋喃糖苷酶及阿魏酸酯酶（FAE）协同作用：前者去除阿拉伯糖侧链以暴露主链，后者水解阿魏酸酯键以解除木质素交联，形成多酶协同破壁效应^[94]。其作用效率受底物异质性（如侧链取代模式）影响，需通过酶工程优化底物结合域或引入碳水化合物结合模块

(CBM) 增强适应性^[95]。该机制解析为生物燃料生产、功能性低聚糖开发及绿色制浆工艺提供了理论支撑，推动木质纤维素资源的高效利用。

如龚燕燕等^[96]使用 FaeA (56 U) 和 XYL11 (300 U) 混合时从 0.5 g 去淀粉麸皮 (DSWB) 中释放了 1.5 mg FA。Fu 等^[97]使用 BpFae (60 U) 和 XYLA (300 U) 混合时从 0.5 g DSWB 中释放了 1.58 mg FA。相比较于 Gong 等^[36]使用单一 reAuXYL11A (300-1200 U) 在 0.5 g DSWB 中 FA 最大释放量为 0.77 mg, Liu 等^[98]使用 Xylanase (200 U) 在 0.5 g DSWB 中 FA 最大释放量为 0.64 mg。协同作用下其 FA 释放量相比较于单一条件下翻了一倍不止, 结果均证明 XYL 可以有效的降解植物细胞壁, 而加入 FAE 可以极大的增加水解植物细胞壁的效率。

通过 FAE 和其他酶之间的协同作用, 可以改善植物细胞壁中生物质的降解效率。协同酶处理的应用可以产生高附加值的副产物, 提高所得水解产物的产量^[99], 为进一步探索 FAE 的应用潜力奠定了坚实的基础, FAE 工业化应用概述如图 1-5 所示。

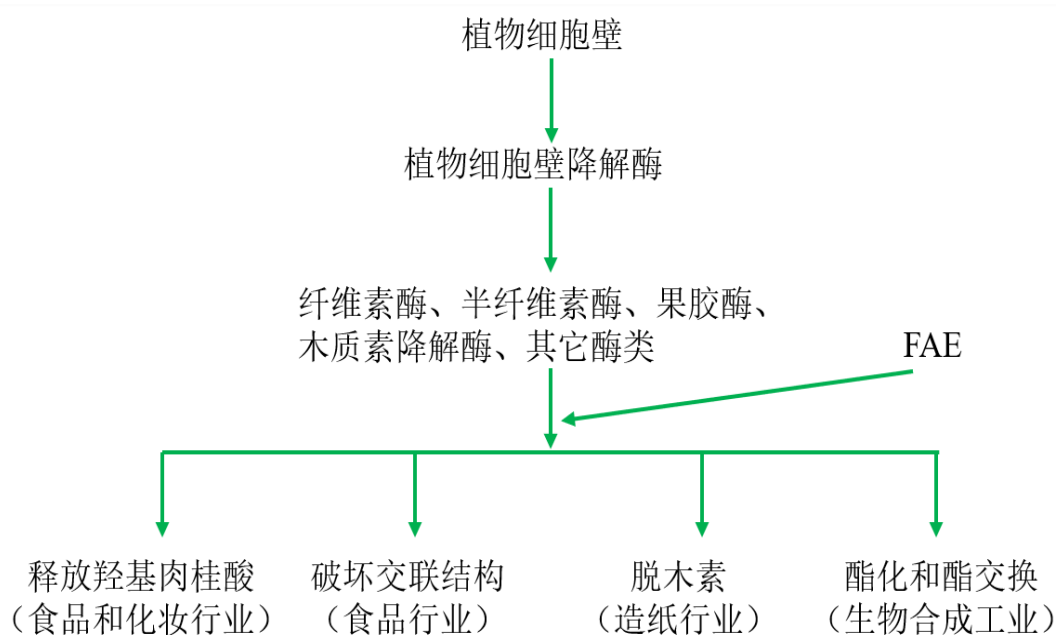


图 1-5 FAE 工业应用的示意图概述

Fig.1-5 Overview of FAE industrial applications

1.4 立题依据、主要研究内容及技术路线

1.4.1 立题依据

自然界的植物细胞壁中含有大量的纤维素、半纤维素，加入纤维素酶和半纤维素酶可以增加酶解效率，从而释放出更多的糖。半纤维素是一大类复杂的非纤维素杂多糖，根据其结构中存在的主要单糖进行分类^[100, 101]。木聚糖是木质纤维素生物质中含量最丰富的半纤维素。在当前更有效地利用木质纤维素生物质和开发环保工业工艺的趋势下，越来越多的研究活动已转向将植物的木聚糖成分和植物残留物作为生物聚合物资源的实际应用^[102, 103]。

半纤维素作为光合作用产物的主要存在形式，是木质纤维素生物质（如秸秆、木材加工残渣等）的核心组分，其高效利用对生物质能源开发具有战略意义。植物通过光合作用固定的碳元素中，约 30% 以半纤维素形式储存于细胞壁结构^[104]。利用阿魏酸酯酶（FAE）与木聚糖酶的协同酶解体系，可将这类可再生资源转化为高附加值产物（如低聚木糖、酚类化合物等），在实现经济价值的同时促进农林废弃物的资源化利用^[105]。工业实践表明，在制浆造纸工艺中引入 FAE 催化体系，可显著提升酚类物质的释放效率，并通过优化结构半纤维素与木质素的分离度，使碱煮工段化学试剂用量减少^[106]。这种生物-化学协同处理模式不仅降低了生产成本，更有效缓解了传统工艺的环境污染问题。很明显，FAE 在许多生化过程中起着至关重要的作用，因此它是工业和医学应用中的重要材料。然而，发现新型 FAE 并阐明其性质对工业发展至关重要。而 FAE 大部分原始菌株的酶活力很低，通常低于 1 U/mL^[35]大大限制了 XYL 在纤维素中的降解能力。因此需要通过分子改造、发酵优化等手段去提高 FAE 酶活力，从而增加 FAE 在农业废弃物中的应用能力。

1.4.2 主要研究内容

（1）为提高阿魏酸酯酶的异源表达量和应用属性，将土曲霉阿魏酸酯酶编码基因与与瘤胃真菌木聚糖酶编码基因在毕赤酵母 GS115 中进行融合表达，同时对重组酶进行纯化和酶学性质研究。

（2）为提高重组菌发酵效率，分别在摇瓶和 15 L 发酵罐中对重组菌的发酵培养基和发酵控制工艺进行优化。

（3）以市售木聚糖酶为对照，研究融合表达产物 rNpXYL-rAtFAE 在麸皮阿魏酸制备和黄芪多糖提取中的应用效果，以评价研究中获得融合表达产物 rNpXYL-rAtFAE 在作用木质纤维素类原料制备目的产物时的使用效果。

1.4.3 技术路线

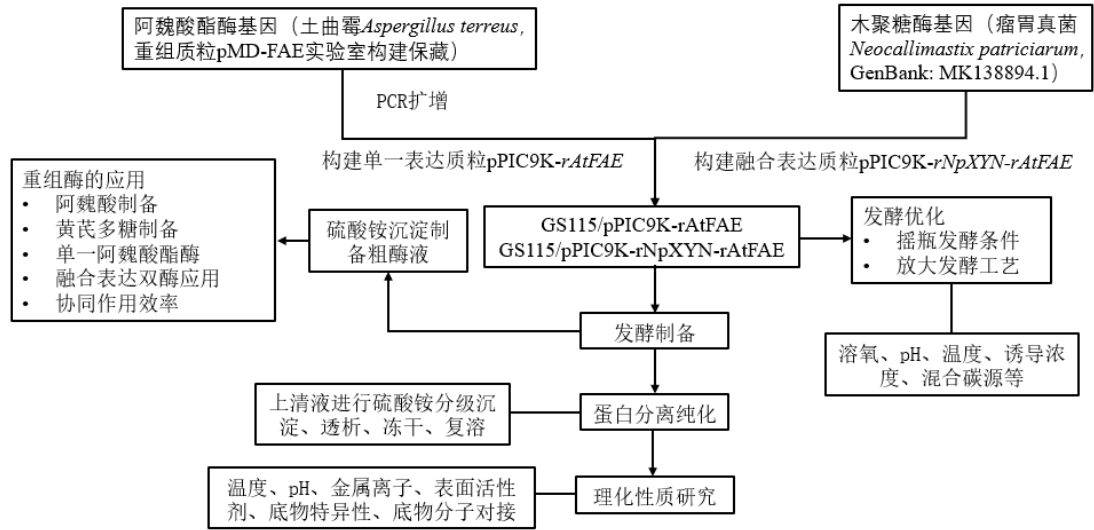


图 1-6 技术路线

Fig.1-6 Technical route

第二章 土曲霉阿魏酸酯酶的重组表达、纯化及酶学性质研究

2.1 引言

XYL可以水解植物细胞壁中的半纤维素，同时有一定量的FA通过酯键与多糖和蛋白质结合的交联体和游离的FA被释放出来，而加入FAE可以水解FA交联体中的酯键，以少量的混合酶就可以达到单一酶高使用量的效果。近年来，微生物来源的FAE因其高效性和稳定性成为研究热点^[107, 108]。土曲霉（*Aspergillus terreus*）作为一种丝状真菌，其分泌的酶系在木质纤维素降解中表现突出，但针对其FAE的系统研究仍较为有限。传统发酵法获取天然阿魏酸酯酶存在产酶周期长、纯度低等问题，而基因重组技术为高效表达和规模化制备提供了新途径。已有研究表明^[68]，通过异源表达系统（如大肠杆菌、毕赤酵母）可实现FAE的高效生产，但不同宿主对酶活性、折叠及翻译后修饰的影响仍需深入探索。此外，FAE的底物特异性、耐温性及催化动力学特性与其工业应用潜力密切相关。

本研究主要内容是将土曲霉阿魏酸酯酶（AtFAE）的重组表达与功能解析，拟通过以下策略突破技术瓶颈：首先，基于基因数据将AtFAE基因与rNpXYL基因与pPIC9K质粒载体连接，构建毕赤酵母GS115重组表达系统，将重组菌（GS115/pPIC9K-rNpXYL-rAtFAE）通过15 L发酵罐高密度发酵条件以提高可溶性蛋白产量；其次，对上清液中粗蛋白采用硫酸铵沉淀、His Trap HP亲和层析实现酶蛋白的高效纯化，并通过SDS-PAGE与质谱鉴定其分子特性；最后，系统评价AtFAE的最适反应条件（pH、温度）、底物特异性及金属离子效应。本研究不仅可为FAE与XYL的融合表达提供技术参考，还将为开发高效生物催化剂、推动农林废弃物资源化利用提供理论支撑。

2.2 实验材料

2.2.1 菌种与质粒

大肠杆菌 JM109，巴斯德毕赤酵母 GS115，重组酵母 GS115/rAtFAE，重组质粒 pMD-AtFAE，质粒 pPIC9K 为实验室保藏，含有融合基因的重组质粒 pUC57-rNpXYL-rAtFAE 委托南京金斯瑞生物科技有限公司构建。

2.2.2 主要仪器设备

本研究使用的主要仪器设备如表 2-1 所示：

表 2-1 实验使用的主要仪器与设备

Table 2-1 The main instruments and equipment used in the experiment

仪器	厂家
LC-2030 高效液相色谱仪	株式会社岛津制作所
LDZX-50KBS 高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
15 L 发酵罐	迪必尔 15 L 不锈钢发酵罐
SW-CJ-2D 超净工作台	上海苏净实业有限公司
DHG-9070 恒温干燥箱	成都晟杰科技有限公司
BHS-2 恒温水浴锅	金坛区西域新瑞仪器厂
L3 可见分光光度计	上海仪电集团有限公司
HZK-FA110S 电子天平	华志电子科技有限公司
H1650-W 台式离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
RE-52AA 旋转蒸发器	上海亚荣生化仪器厂
SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵	上海秋佐科学仪器有限公司
GHP-9080N 隔水式恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司
ZQZY-78BN 双层震荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
UV-5500PC 紫外可见分光光度计	上海元析仪器有限公司
FE-20 pH 计	梅特勒-多利多有限公司
1-14 Sigma 离心机	北京华威中仪科技有限公司
FA1004 精密电子天平	天津天马衡基仪器有限公司

2.2.3 主要试剂

本研究使用的主要试剂如表 2-2 所示：

表 2-2 实验使用的主要试剂

Table 2-2 The main reagents used in the experiment

试剂	生产厂家	级别
葡萄糖	国药集团化学试剂有限公司	AR
蛋白胨	国药集团化学试剂有限公司	AR
酵母粉	国药集团化学试剂有限公司	AR

续表 2-2

试剂	生产厂家	级别
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
木聚糖	华中海威（北京）基因科技有限公司	98%
阿魏酸（FA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
阿魏酸甲酯（MFA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
咖啡酸甲酯（MCA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
香豆酸甲酯（MpCA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
芥子酸甲酯（MSA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
甘油	上海麦克林生化科技有限公司	98%
磷酸氢二钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
磷酸二氢钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	AR

2.2.4 主要培养基

YPD 培养基：1%酵母粉，2%蛋白胨，2%葡萄糖，自然 pH。

MD 培养基：0.34% YNB（酵母氮基），1% 硫酸铵，2% 葡糖糖，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ ，自然 pH。

MM 筛选培养基：0.34% YNB（酵母氮基），1% 硫酸铵，0.5%（v/v）甲醇，0.5 mM 硫酸铜，生物素 $4 \times 10^{-5}\%$ ，1.5% 阿魏酸乙酯（使用二甲亚砜溶液配置 10% 浓度）自然 pH。

BSM 培养基：毕赤酵母高密度发酵培养基按文献配置^[109]，pH 6.0，121℃灭菌 20 min。

2.3 实验方法

2.3.1 阿魏酸酯酶与木聚糖酶融合表达设计及重组菌构建

提取制备重组质粒 pUC57-*rNpXYL-rAtFAE* 并利用 EcoR I 和 Not I 双酶切后与同样双酶切处理的 pPIC9K 质粒连接，获得重组质粒 pPIC9K-*rNpXYL-rAtFAE*，用 *Sac* I 线性化后利用电转化方法导入毕赤酵母 GS115 中，利用 MD 平板筛选得

到重组菌，再利用 MM 筛选培养基得到具有 FAE 活性表达的重组酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE。

2.3.2 GS115/rNpXYL-rAtFAE 与 GS115/rAtFAE 发酵

对重组毕赤酵母(GS115/rNpXYL-rAtFAE)和重组毕赤酵母(GS115/rAtFAE)使用相同的方法分别于 MD 平板活化 3-5 天后观察菌落形态，挑选圆润饱满单菌落于 30 mL/250 mL YPD 液体培养基中放入 30℃、200 rpm 恒温摇床中复壮。按照 1%接种量接入 50 mL/250 mL MD 液体培养基中于 30℃、200 rpm 恒温摇床中摇瓶培养至 OD₆₀₀=2-6 区间，按照 10%接种量接入 9 L/15 L 发酵罐中进行高密度发酵，发酵罐中使用的 BSM 无机盐培养基按照 2.2.3 配置。发酵过程条件参数为：温度 30℃、pH 6.0、进气量（1: 1.66 v/v）、500 rpm 并采用 DO-start 法^[110]控制甲醇流加速度将溶解氧（DO）浓度控制在 10%-40%范围内，运行 96 h 后结束发酵，收集发酵液用于 rAtFAE 的分离纯化，同时测定发酵液中的 rAtFAE 与 rNpXYL 活力单位。

2.3.3 重组阿魏酸酯酶的分离纯化

将重组毕赤酵母（GS115/rAtFAE）含有粗蛋白的发酵液在室温条件下离心（8000 r/min，10 min）收集发酵上清液，取 0.5 L 上清液并加入固体硫酸铵至饱和度为 20%，4℃静置 2 h 之后，于 8000 r/min 离心 30 min，弃杂质留上清液，并继续向上清液中加入固体硫酸铵，使其饱和度达到 80%，4℃静置 2 h 后，于 8000 r/min 离心 30 min。弃上清，使用 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM，pH 6.0）悬浮蛋白沉淀，装入透析袋 MD44（截留分子量：3500）中并利用 10 倍体积的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM，pH 6.0）于 4℃透析 24 h，期间每隔 8 h 更换一次透析缓冲液。透析结束后离心（8000 r/min，10 min）取上清并使用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。透析液使用 His Trap HP 亲和柱^[111]进行纯化。纯化条件为：平衡液（0.5 M NaCl、25 mM imidazole），流速为 1 mL/min，冲洗（除杂）缓冲液为（0.5 M NaCl、25 mM imidazole），洗脱缓冲液为（0.5 M NaCl、250 mM imidazole）。收集洗脱峰并进行 rAtFAE 活力检测、蛋白质定量^[38]和 SDS-PAGE 分析。纯化酶液经透析后使用真空冷冻干燥法获得酶粉。

2.3.4 重组阿魏酸酯酶酶学性质研究

2.3.4.1 最适反应温度及温度稳定性

最适反应温度的测定：将 rAtFAE 活力测定条件中的温度分别设定为 30、35、40、45、50、55、60、65 和 70℃，在 pH 6.0（Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液；25 mM）条件下测定 rAtFAE 活力并计算相对酶活，以不同温度测定条件下所获得的最高酶活力为 100%，计算其余温度下的相对酶活力，以确定 rAtFAE 最适反应温度。

温度稳定性测定：使用 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM，pH 6.0）溶解酶粉，配置酶液（100 U/mL），分别在 40、45、50、55、60、65、70℃ 分别保温 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 后立即取出后置于冰水中放置 30 min 并使用相同缓冲液（50℃，预热 5 min）稀释 10 倍后测定剩余酶活力，以未经保温的初始酶活为 100% 计算相对酶活，计算其余保温下的相对酶活力，以确定 rAtFAE 在不同温度条件下的热稳定性。酶热失活半衰期（ $t_{1/2}$ ）利用公式 $t_{1/2} = \ln 2 / kd$ 计算，其中 kd 为一级动力学常数^[112]。

2.3.4.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性

最适反应 pH 测定：在 50℃ 条件下，分别在 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM）中测定酶活力，以最高酶活力为 100% 计算，以确定 rAtFAE 的最适反应 pH。

pH 值稳定性的测定：使用 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM，pH 6.0）溶解酶粉并配置酶液（100 U/mL），在 50℃ 分别保温 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 后立即取出，在冰上放置 30 min 并使用相同缓冲液（50℃，预热 5 min）稀释 10 倍后测定剩余酶活力，以未经保温的初始酶活为 100% 计算相对酶活，以确定 rAtFAE 的 pH 稳定性。

2.3.4.3 米氏常数的测定

分别使用不同浓度（0.2-15 mM）的不同底物（MFA，MCA，MpCA，MSA），在标准酶活力测定条件下测定 rAtFAE 活力，并依据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算酶对不同底物的米氏常数 K_m 和 V_{max} 。

2.3.4.4 金属离子对酶催化活力的影响

将 0.9 mL Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液（25 mM，pH 6.0）分别与 1 mL 各金属离子（5 mM）混匀，于 50℃ 预热 5 min 后加入 0.1 mL 稀释的酶液，混匀后反应 15

min, 以未添加金属离子的酶活力为 100%, 以相对酶活力表示金属离子对酶催化活力的影响。

2.3.4.5 表面活性剂对酶催化活力的影响

使用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 (25 mM, pH 6.0) 分别配置浓度为 5、10、20 mM EDTA, 0.01%、0.02%、0.04% Tween-80 以及 5、10、20 mM Triton X-100。分别取 1 mL 表面活性剂溶液与 0.9 mL 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 (25 mM, pH 6.0) 混匀, 于 50℃ 预热 5 min 后加入 0.1 mL 酶液混匀反应 15 min, 以未添加表面活性剂的酶活力为 100%, 以相对酶活力表示表面活性剂对酶催化活力的影响。

2.3.5 重组木聚糖酶学性质研究

将重组酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 发酵后含有 rNpXYL-rAtFAE 粗蛋白发酵液在室温条件下离心 (8000 r/min, 10 min) 收集发酵上清液, 取 0.5 L 上清液并加入固体硫酸铵至饱和度为 20%, 4℃ 静置 2 h 之后, 于 8000 r/min 离心 30 min, 弃杂质留上清液, 并继续向上清液中加入固体硫酸铵, 使其饱和度达到 80%, 4℃ 静置 2 h 后, 于 8000 r/min 离心 30 min。弃上清, 使用乙酸-乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 5.5) 悬浮蛋白沉淀, 装入透析袋 MD44 (截留分子量: 3500) 中并利用 10 倍体积的乙酸-乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 5.5) 于 4℃ 透析 24 h, 期间每隔 8 h 更换一次透析缓冲液。透析结束后离心 (8000 r/min, 10 min) 取上清并使用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得到 rNpXYL-rAtFAE 融合重组蛋白。将 rNpXYL-rAtFAE 使用国标法^[113]进行 rNpXYL 酶学性质研究。

2.3.5.1 木聚糖酶最适温度及温度稳定性

最适反应温度的测定: 将 rNpXYL 活力测定条件中的温度分别设定 35、40、45、50、55、60、65、70 和 75℃, 在 pH 5.5 (乙酸-乙酸钠缓冲液; 100 mM) 条件下测定 rNpXYL 活力并计算相对酶活, 以不同温度测定条件下所获得的最高酶活力为 100%, 计算其余温度下的相对酶活力, 以确定 rNpXYL 最适反应温度。

温度稳定性测定: 使用乙酸-乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 5.5) 溶解酶粉, 配置酶液 (100 U/mL), 分别在 40、45、50、55、60、65、70℃ 分别保温 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 后立即取出后置于冰水中放置 30 min 并使用相同缓冲液 (37℃, 预热 5 min) 稀释 10 倍后测定剩余酶活力, 以未经保温的初始酶活为 100% 计算

相对酶活，计算其余保温下的相对酶活力，以确定 rNpXYL 在不同温度条件下的热稳定性。

2.3.5.2 木聚糖酶最适 pH 及 pH 稳定性

最适反应 pH 测定：在 37℃ 条件下，分别在 pH 值为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5 的缓冲液中测定酶活力；pH 3-7 使用乙酸-乙酸钠缓冲液（100 mM），pH 7-10 使用 Gly-NaOH（100 mM）缓冲液。以最高酶活力为 100% 计算，以确定 rNpXYL 的最适反应 pH。

pH 值稳定性的测定：使用对应 pH 范围的缓冲液溶解酶粉并配置酶液（100 U/mL），在 50℃ 分别保温 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 后立即取出，在冰上放置 30 min 并使用相同缓冲液（37℃，预热 5 min）稀释 10 倍后测定剩余酶活力，以未经保温的初始酶活为 100% 计算相对酶活，以确定 rNpXYL 的 pH 稳定性。

2.3.6 阿魏酸酯酶酶活力的测定

2.3.6.1 阿魏酸酯酶酶活力测定步骤

将 0.9 mL Na₂HPO₄-柠檬酸（25 mM，pH 6.0）缓冲液与 1 mL 2 mM 阿魏酸甲酯底物（使用 25 mM，pH 6.0 Na₂HPO₄-缓冲液配置）于 50℃ 预热 5 min 后加入 0.1 mL 经适当稀释的酶液，混匀反应 15 min 后加入 2 mL 30% 乙酸终止反应，反应中释放的 FA 采用 HPLC 法测定^[114]。色谱条件：DOC-18 色谱柱、检测波长 254 nm、柱温 35℃，流动相为甲醇：水：冰乙酸=70：29：1（V/V），流速 1 mL/min，进样量为 10 μL。

2.3.6.2 阿魏酸标准曲线

使用分析天平精密称取 5.0 mg FA 标准品，乙醇溶解后使用容量瓶定容至 25 mL，得到 200 mg/LFA 标准液，使用乙醇稀释后得到 5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 的梯度样品，过 0.22 μm 膜。浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

2.3.6.3 酶活力计算公式

$$U = \frac{C \times 0.004 \times 1000 \times n}{194.19 \times t \times m}$$

式中：U 为 FAE 酶活力，U/mL；C 为通过标准曲线算得的 FA 浓度，mg/L；0.004 为反应总体积，L；10000 为 mg 与 μg 的转换系数；n 为样品的稀释倍数；194.19 为 FA 的摩尔系数，g/mol；t 为反应时间，min；m 为样品的量，mL。

2.3.6.4 酶活力定义

在上述反应条件下，1 min 降解阿魏酸甲酯生成 1 μmol 阿魏酸（FA）所需的阿魏酸酯酶（FAE）酶量定义为 1 个酶活力单位（U）。

2.3.7 木聚糖酶酶活力测定

参照国标 GB/T 23874-2009《饲料添加木聚糖酶活力的测定 分光光度法》。

2.3.8 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定采用 Bardford 法，具体步骤如下：

（1）使用分析天平精确称取考马斯亮蓝 G₂₅₀ 100 mg 并加入 50 mL 95%乙醇使其溶解后加入 100 mL 85%磷酸，定容至 1 L 后储存于棕色瓶中避光保存。

（2）蛋白浓度标准曲线：称取牛血清蛋白（BSA）100 mg，使用 0.9% NaCl 定容至 100 mL，稀释后分别配置浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、80 $\mu\text{g/L}$ 梯度样品。

（3）蛋白质含量测定：取 1 mL 释当稀释后的酶蛋白溶液，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G₂₅₀ 溶液，使用漩涡震荡仪混匀 3-5 s 后于 595 nm 处所测得的吸光值为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。

2.4 结果与讨论

2.4.1 标准曲线

2.4.1.1 阿魏酸标准曲线

利用 HPLC 法测定阿魏酸含量，所得阿魏酸浓度与峰面积关系如图 2-1 所示，其中拟合系数 $R^2=0.9997$ ，表明拟合度较好，可以用作 FA 含量的定量分析和计算使用。

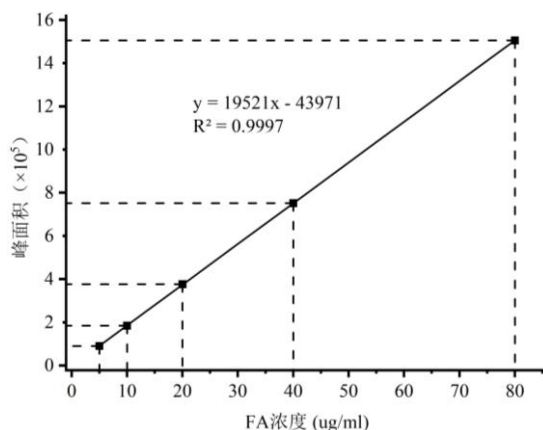
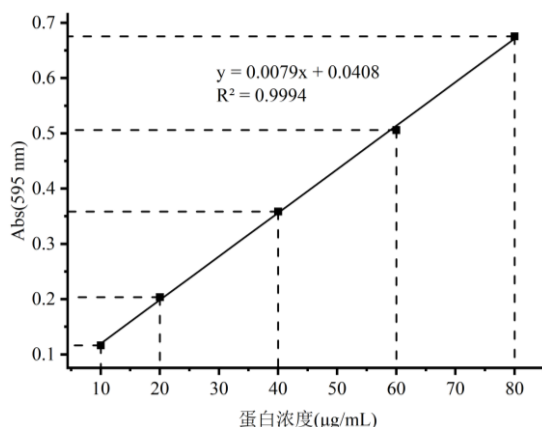


图 2-1 阿魏酸标准曲线 ($\mu\text{g/ml}$)

Fig.2-1 Standard curve of ferulic acid ($\mu\text{g/ml}$)

2.4.1.2 蛋白标准曲线

利用分光光度法测定蛋白质含量，所得蛋白质浓度与吸光值关系如图 2-2 所示，其中拟合系数 $R^2=0.9994$ ，表明拟合度较好，可以用作蛋白质含量的定量分析和计算使用。

图 2-2 蛋白标准曲线 ($\mu\text{g/mL}$)Fig.2-2 Protein standard curve ($\mu\text{g/mL}$)

2.4.2 土曲霉阿魏酸酯酶 (AtFAE) 聚类分析

测序结果表明，AtFAE 编码基因长 846 bp，共编码 281 个氨基酸残基，其 N-端前 21 个氨基酸残基为信号肽序列；成熟肽含有 260 个氨基酸残基，等电点 (pI) 为 4.38，利用软件 NetNGlyc 1.0 分析发现其内部含有一个 N-糖基化位点 (第 79 位氨基酸残基)。通过在线数据库 Blast/blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 对 AtFAE 完整序列 (包含信号肽) 进行比对，选择同源性较高的序列进行 ClustalW 多重比对 (重复计算 1000 次)，并进一步使用 MEGA 6.0 软件通过 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统发育树，结果如图 2-3 所示，发现 AtFAE 与黑曲霉 (*A. niger*)、宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) 和百岁兰曲霉 (*Aspergillus welwitschiae*) 等曲霉属来源的 A 型 FAE 聚为一类 (两两比对相似率 >96%)，其次与产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、亚冬凌青霉 (*Penicillium subrubescens*)、齿孢青霉 (*Penicillium daleae*) 等青霉属来源的 A 型 FAE 也具有较高的相似率 (两两比对相似率 >75%)。此外，通过比对发现 AtFAE 与米曲霉 (*A. oryzae*)、同心青霉 (*Penicillium concentricum*)、嗜粪青霉 (*Penicillium fimorum*) 等来源的脂肪酶 (Lipase class 3)

具有较高的相似度(>80%)。因此,根据上述与 A 型 FAE 和脂肪酶具有高度相似的序列比对结果,可以将 AtFAE 归类为 A 型 FAE^[115]。

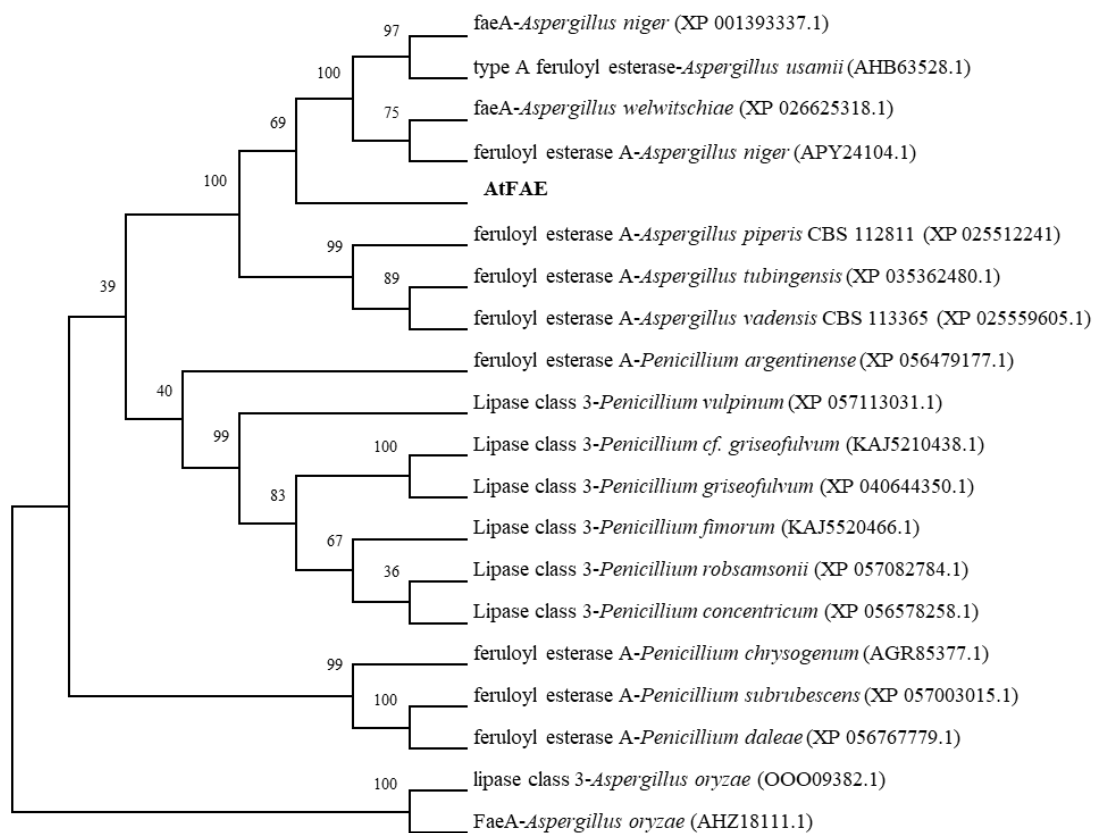


图 2-3 AtFAE 系统发育分析

Fig.2-3 Phylogenetic analysis for rAtFAE

2.4.3 重组表达载体 pPIC9K-rNpXYL-rAtFAE 及重组毕赤酵母的构建

*Eco*RI 和 *Not*I 双酶切,将融合基因 *rNpXYL-rAtFAE* 连接入同样进行双酶切处理的质粒 pPIC9K 中,得到重组质粒 pPIC9K-rNpXYL-rAtFAE 如图 2-4 (A)。

其中,在基因克隆设计时于 *rNpXYL*、*rAtFAE* 基因之间加入了 Linker 基因片段,序列为 GGGGSGGGGSKREAEA,其中 KREAEA 为毕赤酵母内源蛋白 Kex2 和 Ste13 的切割位点,以确保融合蛋白表达后能被切割成有生物活性的形式。并且为便于土曲霉 W2 阿魏酸酯酶重组蛋白(rAtFAE)的分离纯化,在 AtFAE 的羧基端引入了 His-tag 序列(His×6),从而得到其重组蛋白 rAtFAE,如图 2-4 (B)所示。

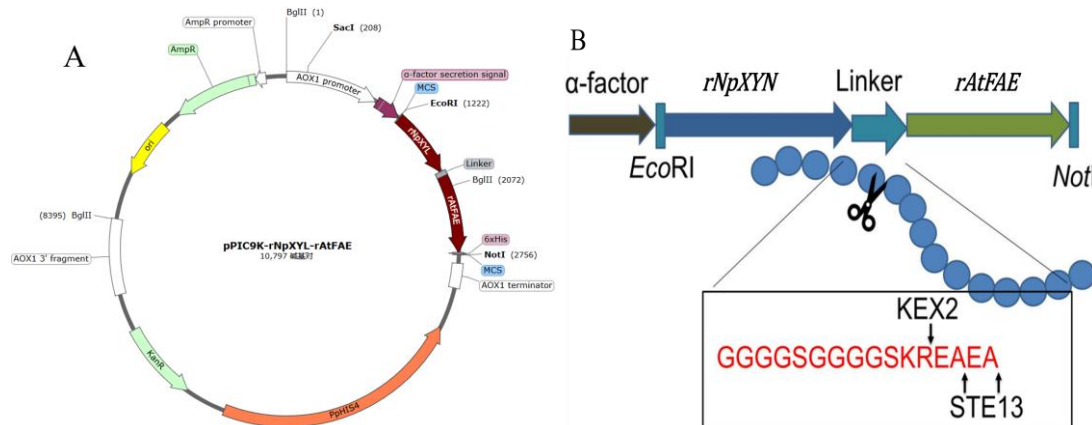


图 2-4 重组 pPIC9K-*rNpXYL-rAtFAE* 质粒图谱 (A) 及 Linker 切割位点示意图 (B)
Fig.2-4 Plasmid map of recombinant pPIC9K-*rNpXYL-rAtFAE* (A) and Linker cleavage site (B)

重组质粒 pPIC9K-*rNpXYL-rAtFAE* 经测序无误后导入毕赤酵母中得到重组菌 GS115/*rNpXYL-rAtFAE*，重组菌点种含阿魏酸乙酯的 MM 筛选培养基，培养 3 d 后出现明显的透明圈，如图 2-5 所示，表明阿魏酸酯酶在重组毕赤酵母中成功获得活性表达。



图 2-5 MM 平板筛选 GS115/*rNpXYL-rAtFAE*
Fig.2-5 MM Plate screening GS115/*rNpXYL-rAtFAE*

2.4.4 重组菌 GS115/*rNpXYL-rAtFAE* 发酵

重组菌 GS115/*rNpXYL-rAtFAE* 经 15 L 发酵罐发酵 108 h 后，发酵液中 *rAtFAE* 酶活单位为 17.38 ± 0.34 U/mL、*rNpXYL* 酶活单位为 952.01 ± 20.7 U/mL。发酵液中目标蛋白经 SDS-PAGE 检验，*rAtFAE* 分子量约为 39 kDa，*rNpXYL* 分

子量约为 25 kDa。随着发酵时间的延长,出现了一些低分子量的蛋白质条带,可能是由于高密度环境下细胞自溶后释放内源性蛋白酶(如溶菌酶),导致原有目标蛋白被降解为小分子片段,如图 2-6 所示。

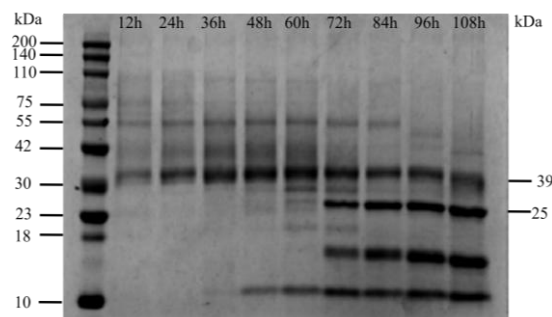


图 2-6 GS115/rNpXYL-rAtFAE 上清液 SDS-PAGE 验证

Fig. 2-6 SDS-PAGE verification of GS115/rNpXYL-rAtFAE supernatant

2.4.5 rAtFAE 发酵制备及纯化

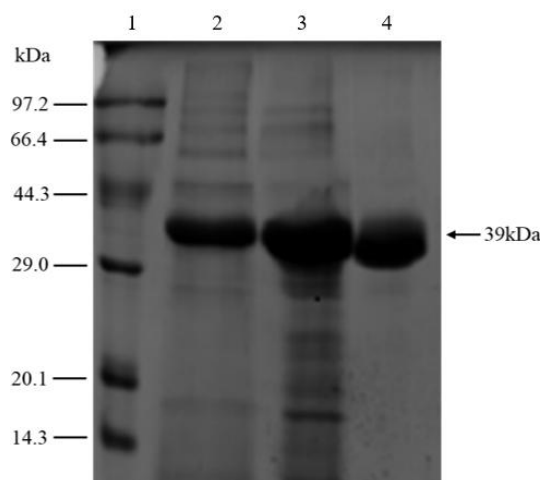
重组菌 GS115/rAtFAE 经 15 L 发酵罐发酵 96 h 结束, rAtFAE 粗蛋白表达量为 8.47 ± 0.16 U/mL。发酵液中 rAtFAE 经硫酸铵沉淀后比酶活由 14.6 U/mg 提高到 22.11 U/mg, 纯化倍数为 1.51、回收率为 76.65%。经 His Trap HP 纯化后, 比酶活由 22.11 U/mg 提高到 29.41 U/mg, 纯化倍数为 2.01、回收率为 52.47%, 比酶活力和纯化倍数分别提高了约 2 倍, 如表 2-3。

表 2-3 rAtFAE 的纯化步骤及结果

Table 2-3 Purification steps and results of rAtFAE

纯化步骤	总酶活 (U)	总蛋白 (mg)	比 酶 活 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
粗酶液	3570.23	244.43	14.6	1	100
硫酸铵沉淀	2736.54	123.73	22.11	1.51	76.65
His Trap HP	1873.52	63.69	29.41	2.01	52.47

经 SDS-PAGE 检验, rAtFAE 分子量约为 39 kDa (如图 2-7 所示), 约比基于氨基酸序列预测的分子量 (29 kDa) 大 10 kDa, 可能是由于糖基化修饰所致。



1: 标准蛋白 maker; 2: 重组菌 GS115/rAtFAE 发酵液; 3: 经过 80%盐析沉淀的粗蛋白; 4: 经过 His Trap HP 亲和柱纯化的目标蛋白。

图 2-7 rAtFAE 纯化结果 SDS-PAGE 验证

Fig.2-7 rAtFAE purification results were verified by SDS-PAGE

2.4.6 rAtFAE 最适反应温度及温度稳定性

最适反应温度测定结果显示, rAtFAE 的相对催化活力在 50℃时最高。当温度高于 50℃时, 酶的活力急剧下降, 在 35-50℃内具有较高的催化活力, 约保留了 80%以上的催化活性, 如图 2-8 (A) 所示。温度稳定性研究表明, rAtFAE 在 30-50℃具有良好的热稳定性, 经过 3 h 保温之后, 酶活仍保留了 80%以上, 但当温度高于 50℃时, 其热稳定性则急剧下降, 在 70℃下保温 2.5 h 之后酶完全失活, 如图 2-8 (B) 所示。其中, 将 55℃的酶活力与时间带入公式 $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$ 可以得到 rAtFAE 在该条件下的半衰期为 57.83 min。

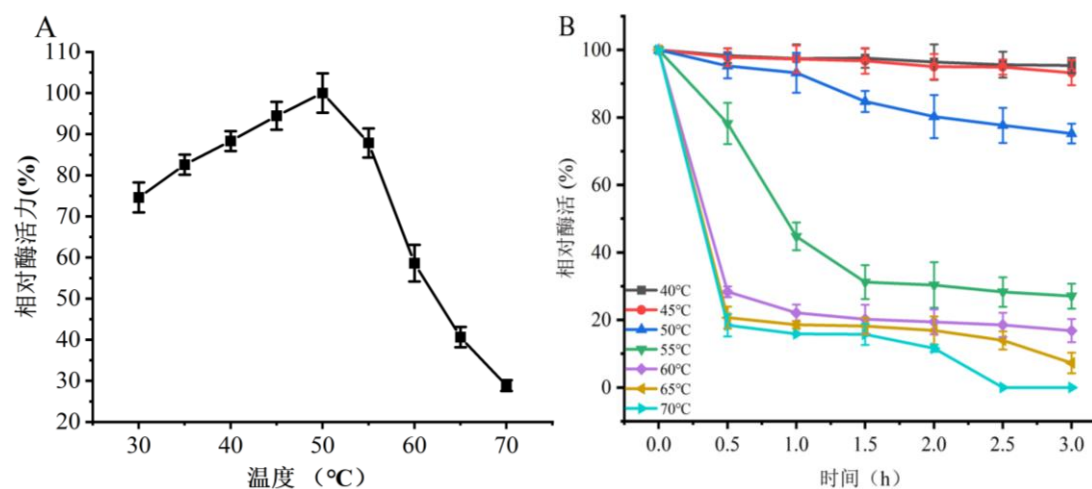


图 2-8 温度对 rAtFAE 催化活性 (A) 及稳定性的影响 (B)
Fig.2-8 Effect of Temperature on Catalytic Activity (A) and Stability of rAtFAE (B)

2.4.7 rAtFAE 最适 pH 值及 pH 值稳定性

测定结果表明 rAtFAE 在 pH 4.5-6.0 范围内催化活力较高,最适 pH 值为 6.0,而当低于 4.5 或高于 6.0 时 rAtFAE 的催化活性急剧下降,例如当 pH 值为 4.0 和 7.5 时酶活力仅约为最高活力的 25%和 10%,如图 2-9 (A) 所示。pH 值稳定性研究结果显示 rAtFAE 在 pH 5.5-6.5 范围内具有较好的稳定性,在 50℃保温 3 h 后残留酶活力在 70%以上;当 pH 低于 5.0 时残留酶活力急剧下降,表明该酶酸性条件下稳定性较差,如图 2-9 (B) 所示。

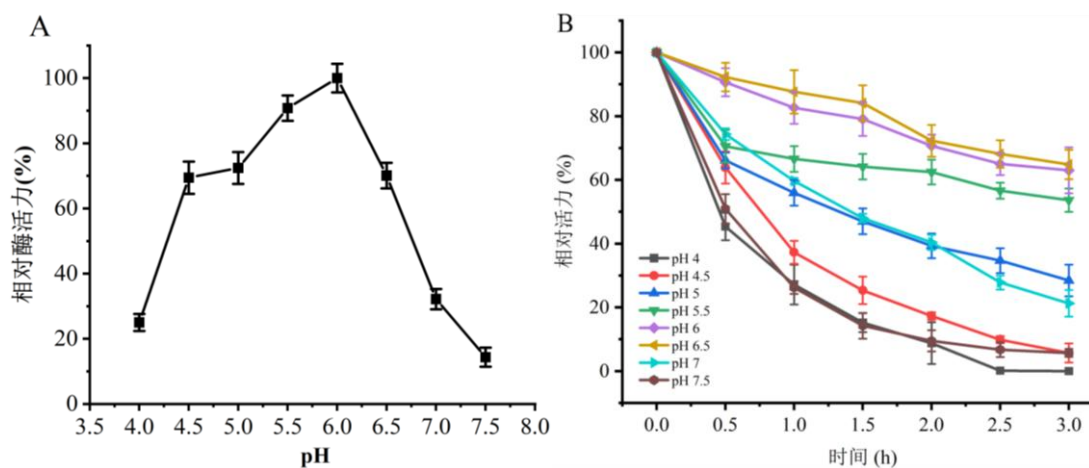


图 2-9 pH 对 rAtFAE 催化活性 (A) 及稳定性的影响 (B)
Fig.2-9 Effect of pH on catalytic activity (A) and stability of rAtFAE (B)

2.4.8 金属离子对 rAtFAE 酶活力的影响

金属离子 (终浓度 2.5 mM) 对 rAtFAE 活力的影响研究表明 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对该酶具有显著的抑制作用 (如表 2-4 所示), Fe^{2+} 对该酶具有显著的促进作用,其他所测试的二价或一价盐离子对 rAtFAE 酶活力没有显著影响。

表 2-4 金属离子对 rAtFAE 酶活力的影响
Table 2-4 Effect of metal ions on rAtFAE enzyme activity

续表 2-4

金属离子 (2.5 mM)	相对酶活力 (%)
对照	100±2.81 ^c
Zn ²⁺	95±4.01 ^{cd}
Mn ²⁺	91±7.52 ^d
Mg ²⁺	97±3.42 ^{cd}
Na ⁺	101±4.0 ^{bc}
K ²⁺	103±3.69 ^c
Ca ²⁺	77±4.58 ^f
Cu ²⁺	104±4.68 ^b
Fe ²⁺	130±3.06 ^a
Co ²⁺	94±7.03 ^{cd}

2.4.9 表面活性剂对 rAtFAE 酶活力的影响

三种常用表面活性剂对 rAtFAE 活力影响如表 2-5 所示,低浓度的 EDTA(终浓度 2.5-5 mM)对 rAtFAE 活力具有促进作用,而高浓度的 EDTA(终浓度 10 mM)则对 rAtFAE 活力具有显著的抑制作用;Tween-80 对 rAtFAE 具有抑制作用,且 Tween-80 浓度越高,其对酶活力的抑制作用越强;与 Tween-80 相似,Triton X-100 对 rAtFAE 活力也具有强烈的抑制作用,且 Triton X-100 浓度越高,其对酶活力的抑制作用越强。

表 2-5 表面活性剂对 rAtFAE 催化活力的影响

Table 2-5 Effect of surfactants on the catalytic activity of rAtFAE

表面活性剂 (终浓度)	相对酶活力 (%)
对照	100±2.37 ^c
EDTA (2.5 mM)	127.65±3.68 ^a
EDTA (5 mM)	113.43±1.34 ^b

EDTA (10 mM)	80.74±1.91 ^d
Tween-80 (0.005%)	97.94±4.27 ^c
Tween-80 (0.01%)	86.85±5.68 ^d
Tween-80 (0.02%)	63.50±4.81 ^e
Triton X-100 (2.5 mM)	69.71±1.98 ^d
Triton X-100 (5 mM)	66.12±1.39 ^{de}
Triton X-100 (10 mM)	55.18±0.39 ^f

2.4.10 rAtFAE 米氏常数的测定

采用双倒数做图^[116]，分别使用 4 种不同底物测定并计算 rAtFAE 的酶促动力学参数，如表 2-6 所示。结果表明，rAtFAE 作用四种不同底物后均可释放 FA，且当使用 MSA 为底物时表现出的比酶活力和最大催化反应速度均为最高。按文献所述^[117]，基于底物特异性和序列相似性对 FAE 进行分类时，能够同时水解 MFA、MpCA 和 MSA，但不能水解 MCA 的 FAE 归类为 A 型，且序列与脂肪酶相似；能够同时水解 MFA、MpCA 和 MCA，但不能水解 MSA 的 FAE 归类为 B 型，其序列与乙酰木聚糖酯酶相似；能够同时水解上述 4 种底物的可以归类为 C 型或 D 型，其中 C 型序列与绿原酸酯酶或鞣酸酶相似，D 型序列与 XYL 相似。这种早期在没有大量 FAE 氨基酸序列作为参考时，仅基于底物特异性进行的 4 种类型分类法具有一定的局限性^[118]，目前基于 FAE 氨基酸序列聚类分析法可以将 FAE 更为科学地分类为 7 种^[119]，甚至 11 种^[118]。因此，本研究中虽然 rAtFAE 能够同时水解 4 种底物且按照底物特异性分类法不能归类为 A 型 FAE，但由于氨基酸序列聚类分析时发现 AtFAE 可以与部分曲霉来源的 A 型 FAE 聚为一类，且序列与脂肪酶相似（如图 2-3 所示），因此我们参考更为细化的序列比对聚类分析法将 AtFAE 归类为 A 型 FAE。

表 2-6 rAtFAE 对不同底物酶促反应常数

Table 2-6 Enzymatic reaction constants of rAtFAE by using four different substrates

续表 2-6

底物	Specific activity/ (U/mg)	K_m (mmol/L)	V_{max} [mmol / (min·mg)]	K_{cat}/K_m [1/ (mmol/L·min)]
MFA	7.41	4.79	84.77	112.64
MSA	10.33	2.54	39.47	96.85
MpCA	9.21	1.73	65.7	237
MCA	7.19	1.21	49.56	255

2.4.11 木聚糖酶最适温度及稳定性

将硫酸铵沉淀后的 rNpXYL-rAtFAE 按照 2.3.7 方法对 rNpXYL 进行温度及温度稳定性测定。最适反应温度测定结果显示, rNpXYL 的相对催化活力在 65℃时最高。当温度高于 65℃时, 酶的活力开始下降, 在 40-55℃内其酶催化活力区间在 50%-80%之间, 而在 60-70℃内具有较高的催化活力, 约保留了 80%以上的催化活性, 如图 2-10 (A) 所示。温度稳定性研究表明, rNpXYL 在 40-45℃具有良好的热稳定性, 经过 3 h 保温之后, 酶活仍保留了 80%以上, 在 45-55℃保温 3 h 后其酶活力保留了 50%以上。但当温度高于 55℃时, 其热稳定性则急剧下降, 在 65-70 摄氏度℃下保温 3 h 之后酶几乎完全失活, 如图 2-10 (B) 所示。

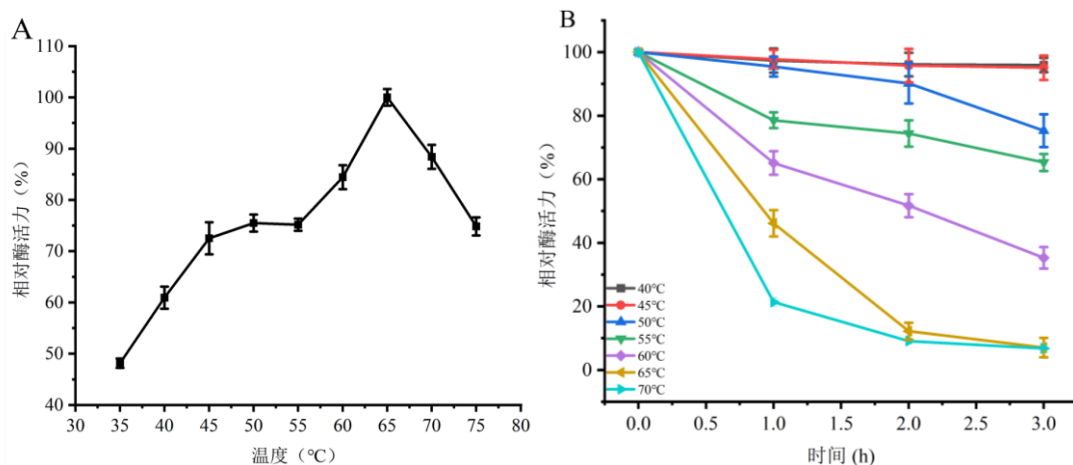


图 2-10 温度对木聚糖酶催化活性 (A) 及稳定性的影响 (B)

Fig.2-10 Effect of temperature on catalytic activity (A) and stability of xylanase (B)

2.4.12 木聚糖酶最适 pH 及 pH 稳定性

将硫酸铵沉淀后的 rNpXYL-rAtFAE 按照 2.3.7 方法对 rNpXYL 进行 pH 及 pH 稳定性测定。测定结果表明 rNpXYL 在 pH 4.5-8.5 范围内催化活力较高, 最适 pH 值为 7.5, 具有较为广泛的 pH 范围, 其酶活力保留了 80% 以上, 如图 2-11 (A) 所示。pH 值稳定性研究结果显示 rNpXYL 在 pH 6.5 时具有较好的稳定性, 但其余 pH 条件下的稳定性较差; 当 pH 低于 5.5 时和高于 6.5 时残留酶活力急剧下降, 如图 2-11 (B) 所示。

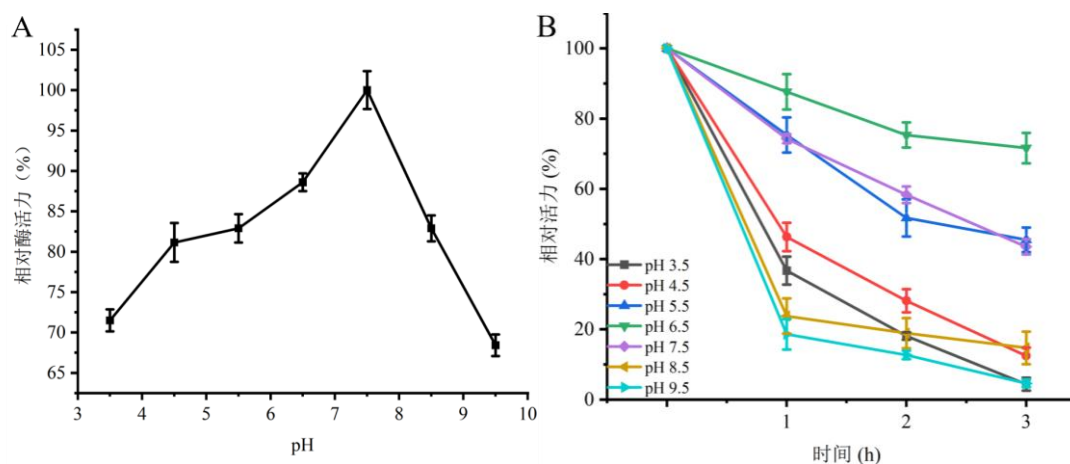


图 2-11 pH 对木聚糖酶催化活性 (A) 及稳定性的影响 (B)

Fig.2-11 Effect of pH on catalytic activity (A) and stability of xylanase (B)

2.6 本章小结

本章将 *rAtFAE* 和 *rNpXYL* 与 pPIC9K 质粒连接并于毕赤酵母中进行了融合表达, 对 *rAtFAE* 进行了聚类分析比对和底物模拟对接确定为 A 型 FAE。将发酵液中目标蛋白纯化后研究了其酶学性质, 具体结论如下:

(1) 将全基因合成的重组质粒 pPIC9K-*rNpXYL-rAtFAE*, 用 *Sac* I 线性化后, 并将其电转化导入巴斯德毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 利用 MD 平板筛选得到重组菌, 再利用含有阿魏酸己酯的 MM 筛选培养基筛选得到具有 FAE 活性表达的重组酵母 GS115/*rNpXYL-rAtFAE*。

(2) 将重组菌 GS115/rAtFAE 进行 15 L 发酵罐高密度发酵后, rAtFAE 粗蛋白表达量为 8.17 ± 0.16 U/mL。发酵液经硫酸铵沉淀、His Trap HP 等步骤纯化后, 比酶活力和纯化倍数分别提高了约 2 倍。经 SDS-PAGE 检验, rAtFAE 分子量约为 39 kDa, 约比基于氨基酸序列预测的分子量 (29 kDa) 大 10 kDa, 利用软件 NetNGlyc 1.0 分析发现其内部含第 79 位氨基酸残基有一个 N-糖基化位点。

(3) 理化性质研究结果显示最适温度为 50℃ 时, 在 50℃ 以下较为稳定; 最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.5-6.5 范围内具稳定性较好; Fe^{2+} (2.5 mM) 对该酶具有显著的促进作用, 而 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 以及 Tween-80 (0.01%) 和 Triton X-100 (2.5 mM) 对该酶具有显著的抑制作用。虽然 AtFAE 可以同时水解 MSA、MpCA、MFA 和 MCA 等 4 种底物, 但由于氨基酸序列聚类分析时发现 AtFAE 可以与部分曲霉来源的 A 型 FAE 聚为一类, 且序列与脂肪酶相似, 因此我们参考更为细化的序列比对聚类分析法将 AtFAE 归类为 A 型 FAE。

(4) 对 rNpXYL 进行了酶学性质研究, rNpXYL 的相对催化活力在 65℃ 时最高。当温度高于 65℃ 时, 酶的活力开始下降, 在 40-55℃ 内其酶催化活力区间在 50%-80% 之间, 而在 60-70℃ 内具有较高的催化活力, 约保留了 80% 以上的催化活性; 在 pH 4.5-8.5 范围内催化活力较高, 最适 pH 值为 7.5, 具有较为广泛的 pH 范围, 其酶活力保留了 80% 以上, pH 值稳定性研究结果显示 rNpXYL 在 pH 6.5 时具有较好的稳定性。

第三章 重组毕赤酵母产阿魏酸酯酶发酵条件优化

3.1 引言

基础培养基的碳氮源比例直接影响菌体生长密度。在毕赤酵母的高密度发酵中，甘油常作为生长期的主要碳源用于快速积累生物量，但其残留可能抑制 AOX1 启动子的激活^[120, 121]；而氮源（如硫酸铵、酵母提取物）的供给则影响细胞内氨基酸池的丰度，进而影响蛋白合成速率。此外，微量元素（如生物素、金属离子）的缺乏可能导致酶蛋白折叠异常或活性中心结构不稳定^[122]。研究表明^[123]，毕赤酵母产酶的最适 pH 通常介于 5.0-6.0，但不同来源 FAE 的酸碱耐受性存在显著差异。同时，溶氧量（DO）的调控对高密度发酵至关重要。

本研究以重组毕赤酵母产 rNpXYL-rAtFAE 的培养基优化为目标，采用均匀实验设计在 BSM 培养基基础上添加蛋白胨、酵母粉、硝酸铵等碳源并添加了 10 种氨基酸作为辅助营养物质进行均匀实验设计 $U^*_{10}(5^9)$ 、 $U^*_{10}(5^{10})$ 。并在诱导阶段添加一定量的山梨醇与甲醇混合诱导，由于山梨醇是非抑制性碳源，添加山梨醇可以减轻甲醇诱导时所带来的毒性^[96]。

3.2 实验材料

3.2.1 主要仪器设备

实验主要仪器同 2.2.2。

3.2.2 主要试剂

本研究使用的主要试剂如表 3-1、表 3-2 及表 3-3。

表 3-1 材料与试剂

Table 3-1 Materials and reagents

试剂	生产厂家	级别
甘氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
缬氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
组氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
苏氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
半胱氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
精氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
色氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR

谷氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
异亮氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
天冬氨酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR

表 3-2 BSM 培养基成分
Table 3-2 BSM medium components

成分	每升培养基用量	说明
85%磷酸	26.7 mL	混合后121℃、灭菌15 min
硫酸钙	0.93 g	
硫酸钾	18.2 g	
七水硫酸镁	14.9 g	
氢氧化钾	4.1 g	
甘油	40 g	
消泡剂	0.2 mL	
微量元素 (PTM ₁)	4.78 mL	过滤灭菌
生物素	0.96 mg	配制0.4 mg/L母液, 过滤灭菌

表 3-3 微量元素 (PTM₁)
Table 3-3 Trace elements (PTM₁)

成分	添加量 (g/L)
五水硫酸铜	6
碘化钠	0.08
一水硫酸锰	3.0
二水钼酸钠	0.2
硼酸	0.02
氯化钴	0.5
氯化锌	20
七水硫酸亚铁	65
硫酸	5 mL
生物素	0.2

其他试剂同 2.2.3。

3.3 实验方法

3.3.1 GS115/rNpXYL-rAtFAE 摇瓶发酵条件

将重组毕赤酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 在 MD 固体培养基中活化 3-5 d 后挑取单菌落接种至 30 mL/250 mL YPD 种子培养基 30℃、200 r/min 培养 24 h，1%接种量到 50 mL/250 mL MD 液体培养基中培养 24 h 之后 8000 r/min 离心 10 min 去上清，同时用灭菌的 BSM 无机盐培养基悬浮细胞，10%接种量，接种后依次加入 0.5% 甲醇、0.4% PTM₁ 微量盐、0.1% 生物素（2 mg/L），于 30℃、200 rpm 恒温摇床中培养，每 24 h 添加一次甲醇（至终浓度为 1%）同时取 500 μL 用于酶活力检测。

3.3.2 摇瓶发酵培养基优化

3.3.2.1 BSM 无机盐组分对酶活力的影响

为了探究在 BSM 无机盐培养基基础上添加额外的碳源，对菌体目标蛋白表达量的影响。在 BSM 无机盐培养基：硫酸钾、硫酸钙、PTM₁、生物素（500×）、七水硫酸镁（氢氧化钾和 28%氨水不参与均匀实验设计）基础上添加酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵四种碳源。使用均匀实验设计出 U*₁₀（5⁹）均匀表，设计 10 组 9 因素五水平均匀实验，如表 3-4 所示，以未添加碳源的 BSM 无机盐培养基为对照。

表 3-4 BSM 无机盐组分 9 因素 5 水平均匀实验设计

Table 3-4 Experimental design of BSM inorganic salt composition 9 factors, and 5 levels uniform

实验号	因素（g/L）								
	K ₂ SO ₄	CaSO ₄	酵母粉	蛋白胨	硫酸铵	硝酸铵	PTM ₁	MgSO ₄ -	生物素
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	(mL)	7H ₂ O	(500×)
N1	5	3	1	3	5	1	4	3	1
	(30)	(10)	(0)	(15)	(2)	(0)	(2)	(15)	(1)
N2	4	5	3	5	2	2	5	1	3
	(25)	(15)	(10)	(25)	(5)	(5)	(6)	(7.5)	(1.5)

续表 3-4

实验号	因素 (g/L)						PTM ₁ (mL)	MgSO ₄ · 7H ₂ O	生物素 (500×)
	K ₂ SO ₄	CaSO ₄	酵母粉	蛋白胨	硫酸铵	硝酸铵			
	X1	X2	X3	X4	X5	X6			
N3	3 (20)	3 (10)	1 (0)	3 (15)	1 (0)	4 (15)	1 (2)	2 (12)	5 (3)
N4	1 (10)	2 (7.5)	2 (5)	4 (20)	3 (10)	5 (20)	5 (6)	4 (18.5)	2 (1.5)
N5	4 (25)	1 (5)	3 (10)	5 (25)	4 (15)	3 (10)	2 (3)	5 (22.5)	5 (3)
N6	2 (15)	1 (5)	4 (15)	2 (10)	1 (0)	1 (0)	3 (4)	3 (15)	2 (1.5)
N7	5 (30)	4 (12.5)	5 (20)	2 (10)	2 (5)	5 (20)	3 (4)	5 (22.5)	3 (2)
N8	2 (15)	4 (12.5)	5 (20)	4 (20)	4 (15)	3 (10)	1 (2)	2 (12)	1 (1)
N9	3 (20)	2 (7.5)	4 (15)	1 (5)	5 (20)	4 (15)	4 (5)	1 (7.5)	4 (2.5)
N10	1 (10)	5 (15)	2 (5)	1 (5)	3 (10)	2 (5)	2 (3)	4 (18.5)	4 (2.5)

3.3.2.2 氨基酸对酶活力的影响

为了探究各种氨基酸之间对菌体目标蛋白的表达量是否有影响,如表 3-5 所示,使用均匀实验设计出 $U^*_{10}(5^{10})$ 均匀表,并且在培养基中添加十种氨基酸,分别为甘氨酸、缬氨酸、组氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、精氨酸、色氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸,并以未添加氨基酸的培养基为对照。

表 3-5 10 因素 5 水平氨基酸均匀实验设计
Table 3-5 Experimental design of amino acid uniformity at 10 factors and 5 levels

实验号	因素 (mM)									
	甘氨酸 X1	缬氨酸 X2	组氨酸 X3	苏氨酸 X4	半胱氨酸 X5	精氨酸 X6	色氨酸 X7	谷氨酸 X8	异亮氨酸 X9	天冬氨酸 X10
N1	3 (10)	1 (0)	4 (15)	3 (10)	1 (0)	5 (20)	4 (15)	5 (20)	1 (0)	3 (10)
N2	1 (0)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	2 (5)	4 (15)	5 (20)	3 (10)	3 (10)	5 (20)
N3	5 (20)	2 (5)	1 (0)	1 (0)	4 (15)	4 (15)	2 (5)	4 (15)	3 (10)	4 (15)
N4	5 (20)	5 (20)	3 (10)	3 (10)	3 (10)	1 (0)	3 (10)	5 (20)	5 (20)	1 (0)
N5	4 (15)	4 (15)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	3 (10)	1 (0)	1 (0)	2 (5)	2 (5)
N6	1 (0)	4 (15)	4 (15)	4 (15)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	4 (15)	2 (5)	4 (15)
N7	2 (5)	2 (5)	2 (5)	5 (20)	1 (0)	2 (5)	1 (0)	3 (10)	4 (15)	2 (5)
N8	4 (15)	3 (10)	5 (20)	5 (20)	3 (10)	5 (20)	3 (10)	2 (5)	5 (20)	5 (20)
N9	3 (10)	3 (10)	1 (0)	4 (15)	4 (15)	1 (0)	5 (20)	1 (0)	1 (0)	3 (10)
N10	2 (5)	1 (0)	3 (10)	1 (0)	5 (20)	3 (10)	4 (15)	2 (5)	4 (15)	1 (0)

3.3.2.3 山梨醇对酶活力的影响

为探究添加山梨醇对酶活力的影响，将 GS115/rNpXYL-rAtFAE 重组毕赤酵母于 MD 平板上活化后于按照 3.3.1 培养方法制备种子液后，10%接种量连同 0.5% 甲醇、0.4% PTM₁ 微量盐、0.1% 生物素（500×）一同加入，同时将山梨醇分别按照 1 mM、10 mM、20 mM、40 mM、80 mM、100 mM 的浓度加入优化后的培养基中进行摇瓶发酵，每 12 h 添加 0.5% 甲醇同时取 500 μ L 用于酶活力检测。

3.3.3 15 L 发酵罐发酵工艺

将重组毕赤酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 在 MD 固体培养基中活化 3-5 d 后挑取单菌落接种至 30 mL/250 mL YPD 种子培养基 30℃、200 r/min 培养 24 h，1%接种量到 150 mL/500 mL MD 培养基中培养 24 h 至 OD₆₀₀=6。优化后的培养基于发酵罐 121℃、20 min 灭菌后使用 28%氨水调节 pH 至 6.0。发酵工艺参数控制：温度 30℃、进气量（1: 1.66 v/v）、罐压 0.05 Mpa、转速 500 rpm，装液量 60%，接种量 10%。待菌体消耗完培养基中的初始的 4%甘油后（溶解氧上升至 100%），流加 50%甘油 400 mL，使菌体湿重为 180-220 g/L 之间。溶解氧回归 100%且饥饿菌体 40 min 后按照 3.6 mL/L/h 流加甲醇，同时开启 DO-star 法（正向设置为 15%）。2-3 h 后调控甲醇流速将溶解氧控制在 10%-40%区间，每 12 h 取样检测菌体湿重、蛋白含量和酶活力。

3.3.4 15 L 发酵罐放大发酵工艺优化

3.3.4.1 温度对重组酶表达量的影响

为探究发酵过程温度对菌体生长及分泌目标蛋白的影响，使用相同的发酵策略对重组菌发酵时的温度进行单因素实验，将发酵过程中的温度设为 26、28、30、32℃四个不同条件，OD₆₀₀=6 左右按照 10%接种量，接种入 9 L/15 L 发酵罐中。每 12 h 取样检测发酵过程中菌体湿重、蛋白质含量及酶活力。

3.3.4.2 高溶解氧（15%-85%）对重组酶表达量的影响

将优化后的培养基运用在 15 L 发酵罐中，优化策略为甲醇诱导时通过控制甲醇流速，使溶解氧维持在 15%-85%区间。每 8 h 取样检测发酵过程中的菌体湿重、蛋白含量及酶活力。

3.3.4.3 低溶解氧（10%-40%）重对组酶表达量的影响

使用相同的优化策略，在甲醇诱导时通过调整甲醇的流加速度控制溶解氧在 10%-40%之间。并每 8 h 取样检测发酵过程中的菌体湿重、蛋白含量及酶活力。

3.4 方法分析

3.4.1 阿魏酸酯酶活力的测定

参照 2.1.1。

3.4.2 木聚糖酶活力测定

参照 2.4.2。

3.4.3 蛋白质含量测定

参照 2.4.3。

3.4.4 菌种湿重检测方法

于 50 mL 离心管中取 20 mL 菌液，5000 rpm、10 min 后去上清，称量重量。计算公式如下：

$$\text{湿重 } G = (G1 - G2) \times n$$

式子中：G 为菌体湿重 g/L；G1 为菌体和离心管总重量；G2 为离心管重量；n 为取样菌液克数与 1000 之间的倍数。

3.5 结果与讨论

3.5.1 GS115/rNpXYL-rAtFAE 摇瓶发酵过程

每 24 h 取样检测 rNpXYL-rAtFAE 中的 rAtFAE 酶活力，结果显示第 6 d 之后酶活力便不再增长，如图 3-1 所示。

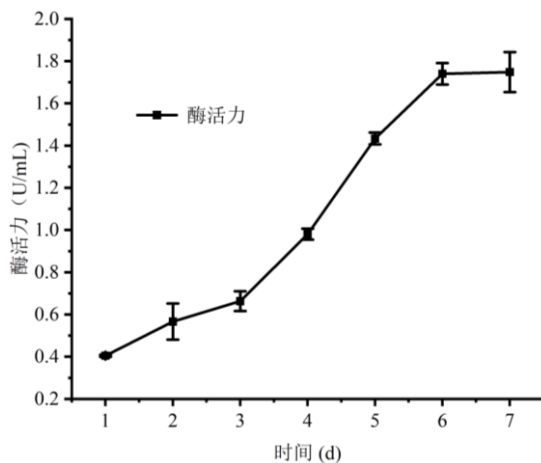


图 3-1 发酵周期内的 rAtFAE 酶活力变化

Fig.3-1 Changes in rAtFAE enzyme activity during the fermentation cycle

3.5.2 摇瓶发酵培养基优化

3.5.2.1 BSM 无机盐组分对酶活力的影响

将重组毕赤酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 使用均匀实验设计出的 10 组不同因素不同水平试验方案进行摇瓶发酵，并检测 rAtFAE 酶活力，结果显示 15 g/L 硫酸钾、5 g/L 硫酸钙、15 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨、4 mL/L PTM₁，15 g/L 七水硫酸镁，1.5 mL/L 生物素（2 mg/L）的 N6 组为组内最高酶活，结果如表 3-6 所示。

表 3-6 BSM 无机盐组分均匀实验设计结果

Table 3-6 Experimental design results of homogeneous components of BSM inorganic salts

实 验 号	因素（g/L）									酶活 Y/ (U/mL)
	K ₂ SO ₄	CaSO ₄	酵母粉	蛋白胨	硫酸铵	硝酸铵	PTM ₁ (mL)	MgSO ₄ - 7H ₂ O	生物素 (500×)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	
N1	5 (30)	3 (10)	1 (0)	3 (15)	5 (2)	1 (0)	4 (2)	3 (15)	1 (1)	0.387±0.07
N2	4 (25)	5 (15)	3 (10)	5 (25)	2 (5)	2 (5)	5 (6)	1 (7.5)	3 (1.5)	1.692±0.16
N3	3 (20)	3 (10)	1 (0)	3 (15)	1 (0)	4 (15)	1 (2)	2 (12)	5 (3)	0.624±0.13
N4	1 (10)	2 (7.5)	2 (5)	4 (20)	3 (10)	5 (20)	5 (6)	4 (18.5)	2 (1.5)	1.252±0.19
N5	4 (25)	1 (5)	3 (10)	5 (25)	4 (15)	3 (10)	2 (3)	5 (22.5)	5 (3)	1.458±0.11
N6	2 (15)	1 (5)	4 (15)	2 (10)	1 (0)	1 (0)	3 (4)	3 (15)	2 (1.5)	2.315±0.23
N7	5 (30)	4 (12.5)	5 (20)	2 (10)	2 (5)	5 (20)	3 (4)	5 (22.5)	3 (2)	1.769±0.15
N8	2 (15)	4 (12.5)	5 (20)	4 (20)	4 (15)	3 (10)	1 (2)	2 (12)	1 (1)	1.864±0.23
N9	3 (20)	2 (7.5)	4 (15)	1 (5)	5 (20)	4 (15)	4 (5)	1 (7.5)	4 (2.5)	1.732±0.06
N10	1 (10)	5 (15)	2 (5)	1 (5)	3 (10)	2 (5)	2 (3)	4 (18.5)	4 (2.5)	1.216±0.09

通过 DPS 9.50 软件对均匀设计实验结果进行二次多项式逐步回归分析，显示 N6 配方组合的 rAtFAE 活力最高，其回归方程为：

$$Y = -0.628062657 + 1.7989911588X_3 - 0.0025045243692X_4 + 0.0023704352449X_1 \\ * X_1 - 0.25272470777X_3 * X_3 - 0.010746002229X_2 * X_8 + 0.011333611946X_3 * X_6 - 0.023 \\ 151486543X_4 * X_7 - 0.04392173320X_5 * X_9。$$

该回归方程相关系数 $R=1$ ，调整后的相关系数 $R_a=1$ ，总体显著性检验值 $F=62499.906$ ，显著水平 $P=0.0031$ ，剩余标准差 $S=0.0004$ ，即方程拟合性良好。根据表 3-7 中的 t 检验值可推出各因素对 rAtFAE 活力的影响大小依次为 $X_3 > X_9 > X_1 > X_4$ ，即酵母粉 > 生物素（500 $\times$ ） > 硫酸钾 > 蛋白胨，并根据回归方程结果显示，硫酸钙和七水硫酸镁、酵母粉和硝酸铵、蛋白胨和 PTM₁ 两两之间有一定的相互交联作用。

表 3-7 培养基组分的均匀实验设计逐步回归分析结果

Table 3-7 Stepwise regression analysis results of homogeneous experimental design of culture medium components

影响因子	偏相关	t 检验值	p-值
r (y, X ₃)	1	1302.524	0.0001
r (y, X ₄)	-0.9981	16.3236	0.0037
r (y, X ₁ *X ₁)	0.9999	97.3008	0.0001
r (y, X ₃ *X ₃)	-1	960.457	0.0001
r (y, X ₂ *X ₈)	-1	361.6351	0.0001
r (y, X ₃ *X ₆)	1	193.1534	0.0001
r (y, X ₄ *X ₇)	-1	420.3985	0.0001
r (y, X ₅ *X ₉)	-1	755.2575	0.0001

通过对回归方程进行非线性规划优化得到最优组合为 K₂SO₄ 25 g/L，CaSO₄ 5.0 g/L，酵母粉 13.4 g/L，蛋白胨 5 g/L，硫酸铵 0 g/L，硝酸铵 20 g/L，PTM₁ 0.2%，七水硫酸镁 7.512 g/L，生物素（500 $\times$ ） 0.1%，此条件下最大的 rAtFAE 酶活力为 2.76 U/mL。而对照组的酶活力为 2.03 U/mL，优化后的酶活力提高了 36%。

3.5.2.2 氨基酸对酶活力的影响

将重组毕赤酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 使用均匀实验设计出的 10 组不同因素不同水平试验方案进行摇瓶发酵，并检测 rAtFAE 酶活力，结果显示甘氨酸 20 mM，缬氨酸 5 mM，半胱氨酸 15 mM，精氨酸 15 mM，色氨酸 5 mM，谷氨酸 15mM、异亮氨酸 10 mM，天冬氨酸 15 mM 的 N3 组酶活最高，实验结果如表 3-8 所示。

表 3-8 10 因素 10 水平氨基酸均匀实验设计结果
Table 3-8 Experimental design results of homogeneous amino acids at 10 factors and 10 levels

实验号	因素 (mM)										酶活 Y/ (U/mL)
	甘氨酸	缬氨酸	组氨酸	苏氨酸	半胱氨酸	精氨酸	色氨酸	谷氨酸	异亮氨酸	天冬氨酸	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	
N1	3 (10)	1 (0)	4 (15)	3 (10)	1 (0)	5 (20)	4 (15)	5 (20)	1 (0)	3 (10)	3.48±0.097
N2	1 (0)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	2 (5)	4 (15)	5 (20)	3 (10)	3 (10)	5 (20)	2.95±0.02
N3	5 (20)	2 (5)	1 (0)	1 (0)	4 (15)	4 (15)	2 (5)	4 (15)	3 (10)	4 (15)	3.54±0.091
N4	5 (20)	5 (20)	3 (10)	3 (10)	3 (10)	1 (0)	3 (10)	5 (20)	5 (20)	1 (0)	3.3±0.053
N5	4 (15)	4 (15)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	3 (10)	1 (0)	1 (0)	2 (5)	2 (5)	2.84±0.006
N6	1 (0)	4 (15)	4 (15)	4 (15)	5 (20)	2 (5)	2 (5)	4 (15)	2 (5)	4 (15)	3.28±0.034
N7	2 (5)	2 (5)	2 (5)	5 (20)	1 (0)	2 (5)	1 (0)	3 (10)	4 (15)	2 (5)	2.64±0.033
N8	4 (15)	3 (10)	5 (20)	5 (20)	3 (10)	5 (20)	3 (10)	2 (5)	5 (20)	5 (20)	2.13±0.008
N9	3 (10)	3 (10)	1 (0)	4 (15)	4 (15)	1 (0)	5 (20)	1 (0)	1 (0)	3 (10)	3.17±0.035
N10	2 (5)	1 (0)	3 (10)	1 (0)	5 (20)	3 (10)	4 (15)	2 (5)	4 (15)	1 (0)	3.03±0.264

通过 DPS 9.50 软件对均匀设计实验结果进行二次多项式逐步回归分析，显示 N3 配方组合的 rAtFAE 活力最高，其回归方程为：

$$Y=3.016391513+0.012714043862X_8^2+0.019780930551X_1X_5+0.000017786379350X_1X_7-0.0026122675136X_2^2X_3-0.0011102708466X_2^2X_5-0.010748901373X_3^2X_6+0.030113774706X_4^2X_8-0.04632287114X_4^2X_9$$

如表 3-9 所示，该回归方程相关系数 $R=1$ ，调整后的相关系数 $R_a=1$ ，总体显著性检验值 $F=62499.91$ ，显著水平 $P=0.0031$ ，剩余标准差 $S=0$ ，即方程拟合性良好。根据表 4 中的 t 检验值可推出各因素对 rAtFAE 活力的影响大小依次为 $X_4^2X_9>X_1X_5>X_3^2X_6>X_4^2X_8>X_8>X_2^2X_3>X_2^2X_5>X_1X_7$ 。从结果中可以看出氨基酸之间具有相互交联作用，且效果远大于单种氨基酸。即苏氨酸*异亮氨酸>甘氨酸*半胱氨酸>组氨酸*精氨酸>苏氨酸*谷氨酸>谷氨酸>缬氨酸*谷氨酸>缬氨酸*半胱氨酸>甘氨酸*色氨酸。

表 3-9 添加氨基酸的均匀实验设计逐步回归分析结果

Table 3-9 Stepwise regression analysis results of homogeneous experimental design with amino acids

影响因子	偏相关	t 检验值	p-值
r (y,X ₈ ² X ₈)	1	14535.02	0.0001
r (y,X ₁ X ₅)	1	19412.55	0.0001
r (y,X ₁ X ₇)	0.9989	21.2682	0.0022
r (y,X ₂ ² X ₃)	-1	3205.001	0.0001
r (y,X ₂ ² X ₅)	-1	1107.858	0.0001
r (y,X ₃ ² X ₆)	-1	19288.19	0.0001
r (y,X ₄ ² X ₈)	1	16794.93	0.0001
r (y,X ₄ ² X ₉)	-1	56157.98	0.0001

通过对回归方程进行非线性规划优化得到最优组合为甘氨酸 20.0 mM，缬氨酸 0 mM，组氨酸 0 mM，苏氨酸 20.0 mM，半胱氨酸 20 mM，精氨酸 0 mM，色氨酸 0.8 mM，谷氨酸 20.0 mM，异亮氨酸 0 mM，天冬氨酸 14.0 mM。此条件下最大的 rAtFAE 酶活力为 4.33 U/mL。相较于对照组的 2.64 U/mL，添加氨基酸后酶活力提高了 64%。

3.5.2.3 山梨醇对酶活力的影响

以未添加山梨醇作为对照组，1、5、10 mM 山梨醇添加量对酶活力有促进作用；当浓度高于 10 mM 时，酶活力开始降低，其最适山梨醇添加量为 10 mM，结果如图 3-2 所示。10 mM 的山梨醇添加量下的 rAtFAE 酶活力为 4.5 ± 0.14 U/mL 相较于未添加山梨醇对照 4.25 ± 0.22 U/mL，酶活力从提高了 5.9%，结果如图 3-2 所示。

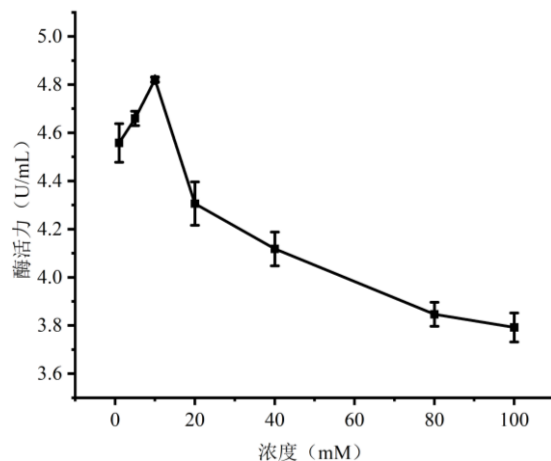


图 3-2 山梨醇浓度对酶活力的影响

Fig. 3-2 Effect of sorbitol concentration on enzyme activity

3.5.3 重组酵母 GS115/rNpXYL-rAtFAE 15 L 发酵罐放大发酵工艺优化

3.5.3.1 高溶解氧（15%-85%）发酵对重组酶表达量的影响

（1）菌体湿重变化

发酵罐中甘油消耗完毕后流加 300 mL 50%甘油阶段，菌体湿重增长速度要高于甲醇诱导时的湿重，诱导前湿重 $G=129.58$ g/L。甲醇诱导后菌体增长缓慢，诱导时控制甲醇流速使溶氧区间在 15%-85%之间，诱导时间持续了约 78 h，最终湿重 G 为 280 g/L。其结果如图 3-3 所示。

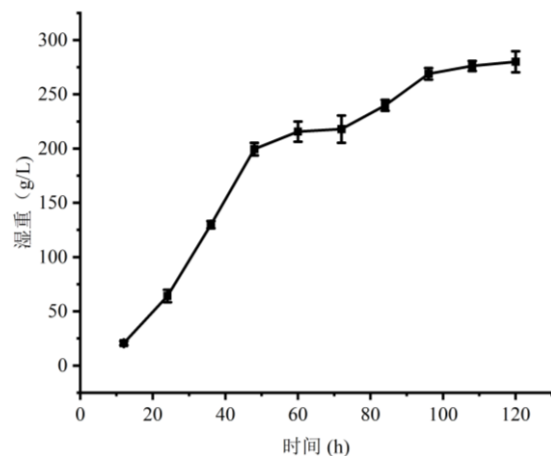
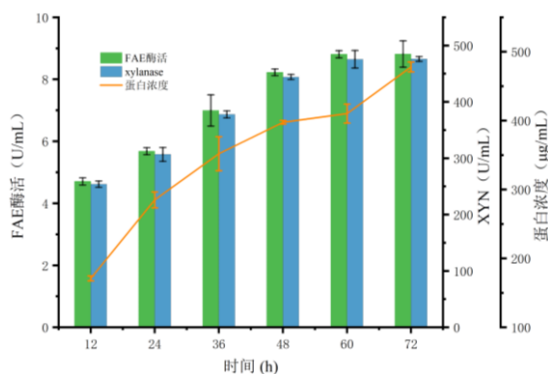


图 3-3 发酵过程湿重变化曲线

Fig. 3-3 Wet weight curve during fermentation

(2) 重组酶活力及蛋白质变化

诱导时菌体湿重 G 为 129.58 g/L ，最高甲醇流速为 7.5 mL/h/L ，直至发酵结束。最终 $r\text{AtFAE}$ 与 $r\text{NpXYL}$ 酶活力分别为 $8.05 \pm 0.2 \text{ U/mL}$ 、 $436.32 \pm 7.11 \text{ U/mL}$ ，蛋白浓度为 $477.97 \pm 7.11 \text{ } \mu\text{g/g}$ ，结果如图 3-4 所示。

图 3-4 发酵过程中 $r\text{AtFAE}$ 与 $r\text{NpXYL}$ 酶活力及蛋白含量变化曲线Fig.3-4 Enzyme activity and protein content curves of $r\text{AtFAE}$ and $r\text{NpXYL}$ during fermentation

3.5.3.2 低溶解氧（10%-40%）发酵对蛋白表达量的影响结果

(1) 菌体湿重变化

重组菌消耗培养基内甘油阶段菌体快速增长，在流加 300 mL 50% 甘油阶段菌体迅速增长至湿重 $G=209.15 \text{ g/L}$ 。甲醇诱导后的菌体湿重开始缓慢增长。诱导时间持续了约 121 h ，发酵结束时湿重 $G=311.26 \text{ g/L}$ ，结果如图 3-5 所示。

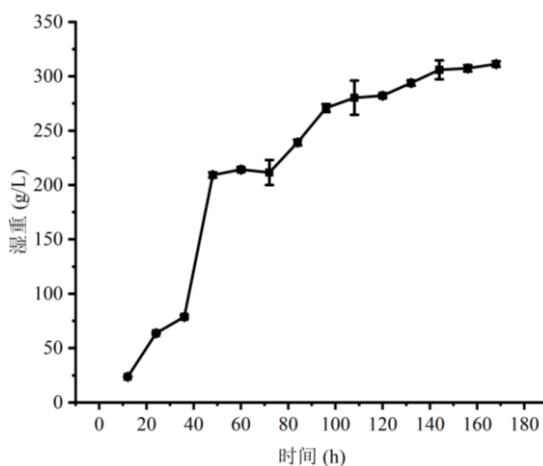


图 3-5 发酵过程中的菌体湿变化情况

Fig.3-5 Wet changes in the bacteria during fermentation

(2) 重组酶活力与总蛋白含量变化

诱导时间持续了约 121 h，发酵结束时其 rAtFAE 与 rNpXYL 酶活力最高，分别为 17.38 ± 0.34 U/mL、 952.01 ± 20.7 U/mL，蛋白浓度为 $653.42 \mu\text{g/mL}$ ，其发酵诱导过程中的 rAtFAE 与 rNpXYL 酶活力与总蛋白含量变化如图 3-6 所示。

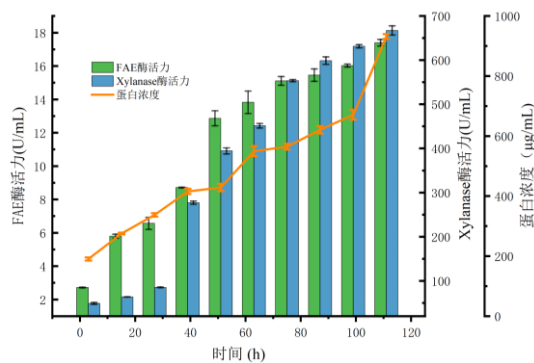


图 3-6 发酵过程中 rAtFAE 与 rNpXYL 酶活力及蛋白含量变化曲线

Fig.3-6 Enzyme activity and protein content curves of rAtFAE and rNpXYL during fermentation

3.5.3.3 温度对重组酵母生长的影响

使用相同的发酵策略对重组菌发酵时的温度进行单因素实验，将发酵过程中的温度设为 26、28、30、32℃ 四个不同条件，每 12 h 取样检测发酵过程中的菌体湿重、蛋白含量及酶活力。

(1) 温度对重组酵母生长影响

结果显示甲醇诱导前菌体湿重增长迅速，50 mL 50%甘油流加之后开始甲醇诱导。诱导前 26、28、30、32℃ 下的最高菌体湿重分别 103.4、156.8、210.6、186.3 g/L。如图 3-7 所示，结果表明最适发酵温度为 30℃。在 26、28、30、32℃ 下的最高菌体湿重分别 179.2、239.7、266.6、209.3 g/L。

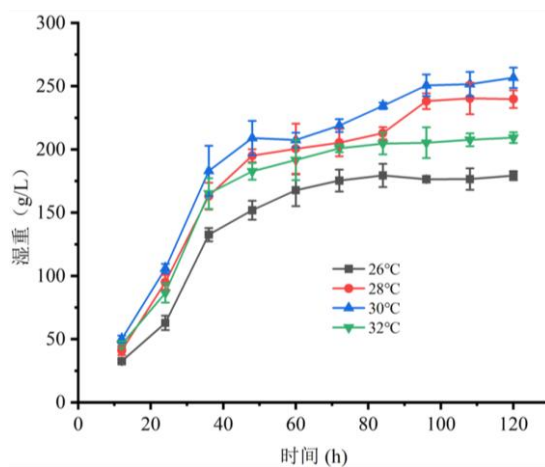


图 3-7 不同温度条件下的菌体湿重

Fig.3-7 Wet weight of bacteria at different temperatures

(2) 温度对重组酶表达量的影响

结果显示在 26、28、30、32℃ 条件下的酶活力和蛋白质含量在 30℃ 条件下为最大值。在 26℃、28℃ 和 30℃ 条件下的 rAtFAE 发酵单位 (U/mL) 最大值分别为: 17.10、26.20、28.98、25.2, 如图 3-8 (A) 所示; rNpXYL 发酵单位 (U/mL) 最大值分别为: 923.40、1414.8、1594.42、1348.2 U/mL, 如图 3-8 (B) 所示。结果表明, 在 30℃ 发酵条件下的 rAtFAE 和 rNpXYL 的发酵单位均为最高。

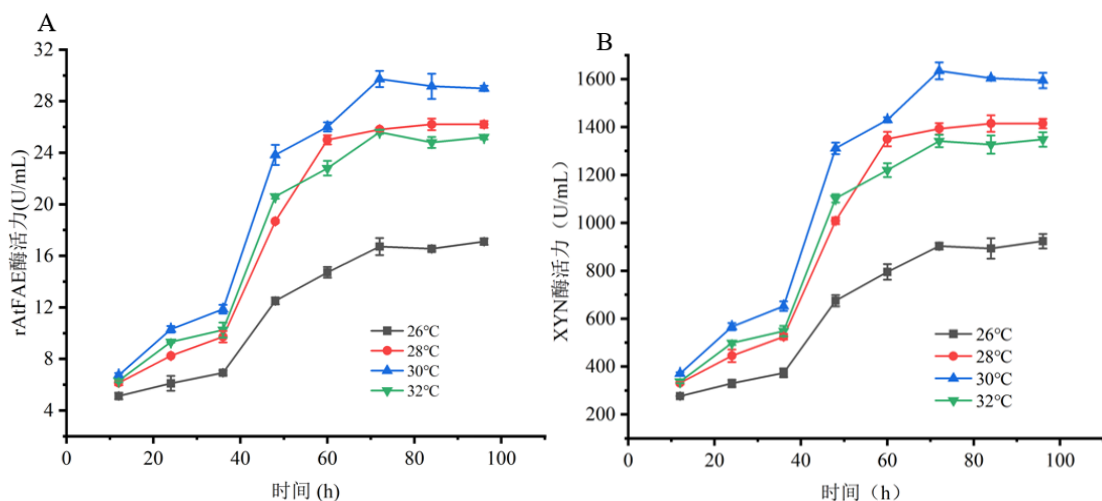


图 3-8 不同发酵温度下的 rAtFAE 酶活力 (A) 和 rNpXYL 酶活力 (B)

Fig. 3-8 rAtFAE enzyme activity (A) and rNpXYL enzyme activity (B) at different fermentation temperatures

3.6 本章小结

本章以发酵优化为主, 主要使用摇瓶对发酵培养基组分进行优化, 使用 15 L 发酵罐对重组菌的发酵条件进行了优化, 将摇瓶的最优培养基参应用于 15 L 发酵罐中进行了高密度发酵, 主要结论如下:

(1) 在 BSM 培养基基础上添加了酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵作为氮源, 均匀实验结果显示硫酸铵对目标蛋白分泌表达没有作用, 根据均匀实验最优试剂比例下的最大的 rAtFAE 酶活力为 2.76 U/mL, 而 10 种氨基酸中只有甘氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、谷氨酸和天冬氨酸 5 种氨基酸对目标蛋白分泌表达有作用, 最大 rAtFAE 酶活力为 4.33 U/mL。

(2) 15 L 发酵罐放大工艺优化采用的溶解氧控制策略中, 在高溶解氧 (15%-85%) 控制条件下, 诱导前湿重为 129.58 g/L。诱导时间持续了约 96 h, 最终湿

重为 228.0 g/L。而在高低溶解氧（10%-40%）控制条件下，诱导前湿重为 209.15 g/L，诱导时间持续了约 121 h，最终湿重为 311.26 g/L，且 rAtFAE 和 rNpXYL 酶活力 17.38 ± 0.34 U/mL、 952.01 ± 20.7 U/mL，两种酶的表达量都远高于高溶解氧控制条件所得（rAtFAE， 8.05 ± 0.2 U/mL；rNpXYL， 477.97 ± 7.11 U/mL），因此将溶解氧浓度控制在较低范围内（10%-40%）更利于 rNpXYL 和 rAtFAE 的共表达。

（3）将摇瓶优化的培养基组分应用到 15 L 发酵罐中，并对其温度进行了优化。结果显示其最适发酵温度为 30℃，而 26、28、30、32℃条件下的酶活力 rAtFAE 酶活力最大值分别为：17.10、26.20、28.98、25.2 U/mL；rNpXYL 酶活力最大值分别为：923.40、1414.8、1594.42、1348.2 U/mL；

第四章 重组阿魏酸酯酶在阿魏酸制备中的应用

4.1 引言

阿魏酸 (FA) 是一种广泛分布于植物细胞壁中的羟基肉桂酸衍生物, 尤其在谷物麸皮 (如小麦、大麦、玉米) 中含量丰富^[124]。其分子结构中的酚羟基和丙烯酸基团赋予其强大的抗氧化活性, 使其在食品防腐^[125]、医药抗炎^[126]、化妆品抗衰老^[127]及功能材料合成等领域展现出重要价值。然而, 自然界中约 90% 的 FA 以酯化形式与阿拉伯木聚糖^[128] (Arabinoxylan, AX) 等半纤维素共价结合, 形成复杂的细胞壁交联网络^[129, 130]。麸皮作为小麦加工的主要副产物, 全球年产量超过 1.5 亿吨, 其中富含阿拉伯木聚糖 (占干重 20-30%) 和 FA (约 3-5 mg/g)。然而, 其致密的细胞壁结构由纤维素、半纤维素和木质素通过共价键 (如酯键、醚键) 和非共价键 (如氢键、疏水作用) 交联形成, 构成天然物理屏障^[120, 131, 132]。

生物酶解法因其高效性、专一性和环境友好性, 被认为是替代传统化学法的理想策略。在这一技术路径中, XYL 与 FAE 的协同作用被广泛认为是释放结合态 FA 的核心机制^[133]。木聚糖酶通过水解阿拉伯木聚糖主链的 β -1,4-木糖苷键, 破坏半纤维素骨架的连续性, 从而增加底物的孔隙率和酶可及表面积; FAE 则特异性切割 FA 与阿拉伯糖之间的酯键, 释放游离态 FA^[134]。

而本章实验内容对麸皮中 FA 的制备进行研究, 分别采用 rAtFAE 与 XYL 商品酶协同作用制备麸皮中 FA, 和 rAtFAE 与 rNpXYL 融合表达蛋白协同作用制备麸皮 FA, 并对反应过程中的温度、pH、料液比三个因素对麸皮 FA 制备条件进行了中心组合实验设计。

4.2 实验材料

4.2.1 主要仪器设备

主要仪器同 2.2.2。

4.2.2 主要试剂

重组酶 rAtFAE (8.17 U/mL) 的制备参考第二章; 重组酶 rNpXYL-rAtFAE (rAtFAE 17.38 U/mL, rNpXY 952.01 U/mL) 的制备参考第三章; 麸皮于市场中直接购买; 木聚糖酶 (10 万 U/g) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, AR 分析级; 其余主要实验试剂同 2.2.3。

4.3 实验方法

4.3.1 麸皮的制备

称取适量市售麸皮，过 20 目筛去杂，按 1:30 (v/v) 加水，煮沸 2 h，冷却至室温后抽滤，使用去离子水淘洗 4-5 遍后按 1:10 (v/v) 加水混匀。加入中温淀粉酶（至终浓度为 25 U/mL）和中性蛋白酶（至终浓度为 50 U/mL），调 pH 至 6.5。55℃恒温水浴搅拌反应 4 h，抽滤并使用去离子水漂洗 4-6 次，挤压脱水，于 50℃干燥后粉碎（50-80 目）。

4.3.2 重组酶 rAtFAE 在阿魏酸制备中的应用

4.3.2.1 反应时间对 FA 释放量的影响

称取 1.0 g 干燥粉碎后的麸皮，反应条件为 50℃、pH 5.5（Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液，25 mM）、料液比 1 g/25 mL。在上述反应体系中添加 rAtFAE（50 U）、XYL 商品酶（300 U）及两种混合酶。以高温灭酶样本为对照，每 1 h 取样并煮沸灭酶 10 min，经离心后适当稀释，利用 HPLC 法测定 FA 浓度，以确定最适反应时间。

4.3.2.2 酶的添加量对 FA 释放量的影响

以高温灭活酶液作为对照，取 1.0 g 麸皮，反应条件为 50℃、pH 5.5（Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液，25 mM）、料液比 1 g/25 mL。在上述反应体系中分别添加 rAtFAE（5 U、50 U），XYL 商品酶（20 U、200 U、300 U）以及两种酶的不同组合，4 h，以研究两种酶分别作用或协同作用对麸皮 FA 释放量的影响。

4.3.2.3 中心组合实验

利用软件 Design-Expert 13 对温度（45、50、55）、pH（4.5、5.5、6.5）和料液比（1/15、1/25、1/35）3 个因素进行中心组合设计实验，以优化酶促反应条件对麸皮 FA 释放量的影响。

4.3.3 重组酶 rNpXYL-rAtFAE 在阿魏酸制备中的应用

4.3.3.1 反应时间对 FA 释放量的影响

称取 1.0 g 麸皮，反应条件为 50℃、pH 5.5（Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液，25 mM）、料液比 1 g/25 mL。在上述反应体系中分别添加融合表达蛋白 rNpXYL-rAtFAE（rAtFAE 50 U，rNpXYL 2750.12 U）。在上述条件下进行反应，以高温

灭酶样本为对照, 每 1 h 取样并煮沸灭酶 10 min, 经离心后适当稀释, 利用 HPLC 法测定 FA 浓度, 以确定反应时间对麸皮 FA 释放量的影响。

4.3.3.2 酶的添加量对 FA 释放量的影响

以高温灭活酶液作为对照, 取 1.0 g 麸皮, 反应条件为 50°C、pH 5.5 (Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液, 25 mM)、料液比 1 g/25 mL。在上述反应体系中分别梯度添加融合表达蛋白 rNpXYL-rAtFAE (rAtFAE: 1、5、10、20、50、100 U; 对应的 rNpXYL 为 54.2、276.5、563.5、1115.9、2846.8、5482.1 U), 反应 4 h, 以探究融合表达蛋白对麸皮 FA 释放量的影响。

4.3.3.3 中心组合实验

利用软件 Design-Expert 13 对温度 (45、50、55)、pH (4.5、5.5、6.5) 和料液比 (1/15、1/25、1/35) 3 个因素进行中心组合设计实验, 以优化融合表达蛋白 rNpXYL-rAtFAE 对麸皮 FA 释放量的影响。

4.4 分析方法

4.4.1 FA 含量的测定

同 2.4.1

4.4.2 木聚糖酶活力的测定

同 2.4.2

4.5 结果与讨论

4.5.1 重组酶 rAtFAE 在阿魏酸制备中的影响

4.5.1.1 反应时间对 FA 释放量的影响

实验结果显示在分别利用 rAtFAE、XYL 商品酶以及两种酶的组合实验中, FA 的释放量均随着时间的延长而增加, 且均于 4 h 后达到最大值 (如图 4-1 所示)。而单独使用 XYL 商品酶的 FA 释放率为 753.59 μg/g 麸皮, 单独使用 rAtFAE 的 FA 释放率为 515.27 μg/g 麸皮, 而在两种酶的组合实验中 FA 的释放量最高为 1105.81 μg/g 麸皮。结果表明在酶解麸皮释放 FA 的过程中, 两种酶具有较好的协同作用效果。

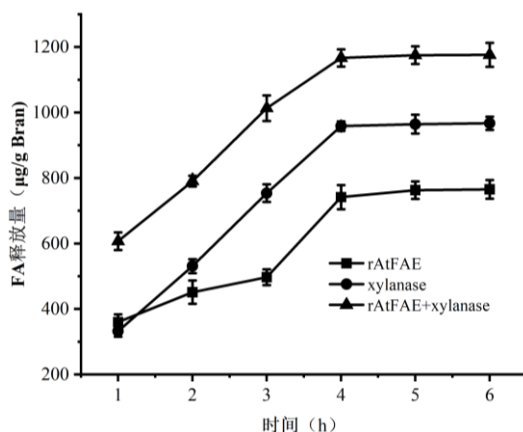


图 4-1 FA 释放量随着时间的变化

Fig.4-1 Changes in FA release over time

4.5.1.2 酶的添加量对 FA 释放量的影响

结果显示 rAtFAE 与 XYL 商品酶协同作用实验中,随着浓度的增加,FA 释放量也在增加,且 rAtFAE (50 U)、XYL 商品酶 (300 U) 协同作用下的 FA 释放量达到 1105.81 μg/g 麸皮,如表 4-1 所示。结果表明 FA 的释放量与酶的添加量呈正相关,且在两种酶的不同组合比例中 FA 的释放量均优于单一酶种,进一步证明了两种酶之间具有较好的协同作用。

表 4-1 不同浓度木聚糖酶和 rAtFAE 对 FA 释放量的影响

Table 4-1 Effects of different concentrations of xylanase and rAtFAE on FA release

酶活力	FA 释放量 (μg/g 麸皮)
XYL 商品酶 (100 U)	423.67±24.91 ^g
XYL 商品酶 (200 U)	658.02±18.5 ^e
XYL 商品酶 (300 U)	776.35±30.03 ^d
rAtFAE (5 U)	348.09±25.1 ^h
rAtFAE (50 U)	515.27±18.64 ^f
XYL 商品酶 (100 U) + rAtFAE (5 U)	551.91±26.89 ^f
XYL 商品酶 (100 U) + rAtFAE (50 U)	681.45±34.7 ^e
XYL 商品酶 (200 U) + rAtFAE (5 U)	865.65±24.82 ^c
XYL 商品酶 (200 U) + rAtFAE (50 U)	985.50±39.41 ^b
XYL 商品酶 (300 U) + rAtFAE (5 U)	965.65±24.6 ^b
XYL 商品酶 (300 U) + rAtFAE (50 U)	1105.81±28.47 ^a

4.5.1.3 中心组合实验对 FA 释放量影响

当 XYL 商品酶添加量为 300 U/g 麸皮, rAtFAE 添加量为 50 U/g 麸皮, 然后选取温度、pH 和料液比 3 个因素并利用 Design-Expert 13 进行中心组合设计, 以优化 FA 的酶催化制备工艺。以 FA 释放量为响应值进行优化, 各因素的实验组及结果见表 4-2。

表 4-2 响应面优化 FA 释放量试验设计与结果

Table 4-2 Experimental design and results of FA release optimization on response surface

实验序号	A: 温度 (°C)	B: pH	C: 固液比 (g:mL)	FA 释放量/ (μg/g 麸皮)
1	45	5.5	25	1670.99
2	40	6.5	35	1798.17
3	40	4.5	35	1826.79
4	40	6.5	15	1408.75
5	53.4	5.5	25	1781.68
6	45	7.2	25	1611.15
7	50	6.5	35	1814.2
8	50	4.5	35	1805.21
9	36.6	5.5	25	1656.49
10	45	5.5	41.8	1840.92
11	45	3.8	25	1557.25
12	45	5.5	25	1740.92
13	45	5.5	25	1724.36
14	50	4.5	15	1418.63
15	45	5.5	8.2	1326.67
16	50	6.5	15	1495.73
17	45	5.5	25	1754.62
18	40	4.5	15	1384.13
19	45	5.5	25	1748.36
20	45	5.5	25	1722.86

对表 4-2 中 FA 的释放量使用 Design-Expert 13 进行方差分析与回归模型建立, 结果发现固液比对 FA 的释放量影响最大, 其次是温度、pH, 结果分析如表 4-3 所示。

表 4-3 回归模型的方差分析

Table 4-3 Variance analysis of regression model

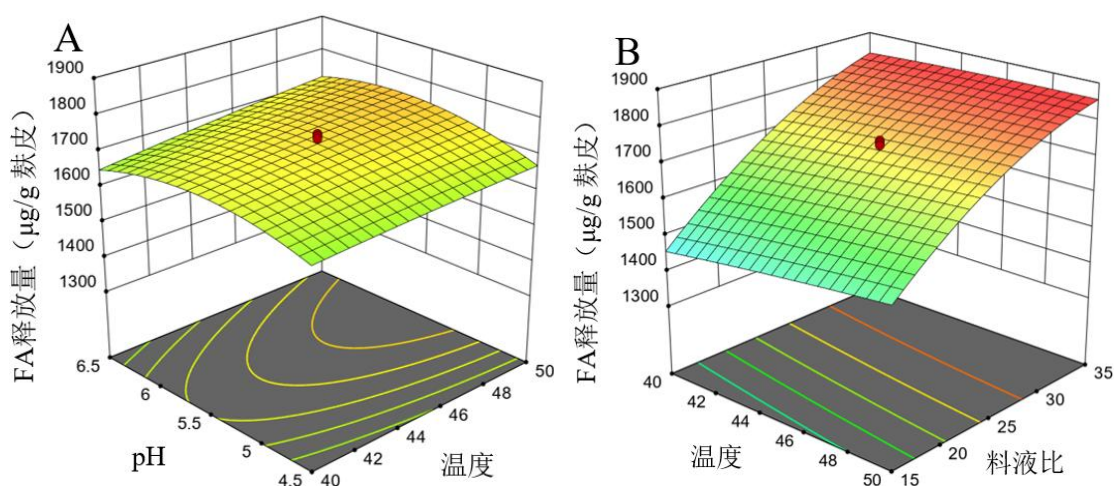
方差来源	平方和	自由度	均方差	F-Value	P-Value
Model	5.072E+05	9	56351.31	48.65	< 0.0001**

续表 4-3

方差来源	平方和	自由度	均方差	F-Value	P-Value
A-温度	7804.51	1	7804.51	6.74	0.0267*
B-pH	2184.88	1	2184.88	1.89	0.1996
C-固液比	4.225E+05	1	4.225E+05	364.70	< 0.0001**
AB	1014.53	1	1014.53	0.8758	0.3714
AC	2017.08	1	2017.08	1.74	0.2164
BC	1840.73	1	1840.73	1.59	0.2361
A ²	194.81	1	194.81	0.1682	0.6904
B ²	38023.25	1	38023.25	32.82	0.0002**
C ²	38235.53	1	38235.53	33.01	0.0002**
Residual	11584.02	10	1158.40		
Lack of Fit	7009.91	5	1401.98	1.53	0.3254
Pure Error	4574.11	5	914.82		
Cor Total	5.187E+05	19			

注: “***”表示极显著, “*”表示显著

该模型 $r^2=97.77\%$, $P<0.01$, 失拟项 $P>0.05$, 说明该模型较为可靠, 通过软件拟合, 得到响应值与试验因素的二次回归方程: $Y=1727.15+23.91\times A-12.65\times B+175.88\times C-11.26\times AB-15.88\times AC-15.17\times BC-3.68\times A^2-51.37\times B^2-51.51\times C^2$, 其中 Y 为 FA 释放量/ ($\mu\text{g/g}$ 麸皮), A 为温度 ($^{\circ}\text{C}$), B 为 (pH), C 为料液比 (g:mL)。由 Design-Expert 13 软件对试验结果进行响应面图的绘制, 结果如图 4-2 所示。



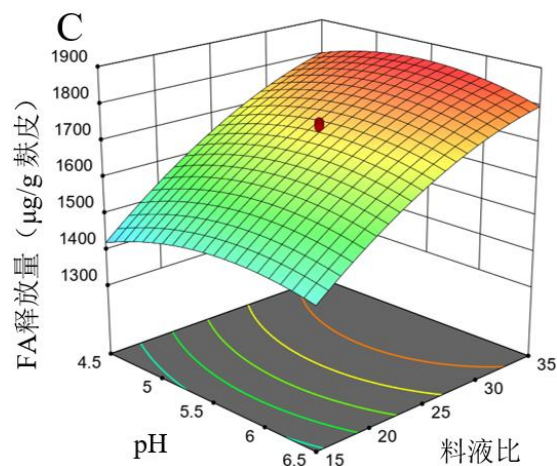


图 4-2 响应面图

Fig. 4-2 Response surface plots

通过 Design-Expert 13 软件分析对实验进行优化预测，得出单位 FA 释放量最高条件为：温度 46.8℃、pH 为 5.7、料液比为 1 g/34.7 mL，最优条件下预测单位 FA 释放量为 $1850.81 \pm 34.75 \mu\text{g/g}$ 麸皮。在最优条件下进行 5 次平行验证，获得 FA 释放量为 $1831.15 \pm 26.05 \mu\text{g/g}$ 麸皮，是预测值的 98.93%，与预测值接近，说明该模型精准度高，预测结果可靠。

4.5.2 重组酶 rNpXYL-rAtFAE 在阿魏酸制备中的影响

4.5.2.1 反应时间对 FA 释放量的影响

使用 HPLC 对反应过程释放的 FA 进行检测。结果如图 4-3 所示，前 4 h 内 FA 的释放率上升比较迅速，而融合表达蛋白在 4 h 之后对麸皮 FA 的释放没有效果。

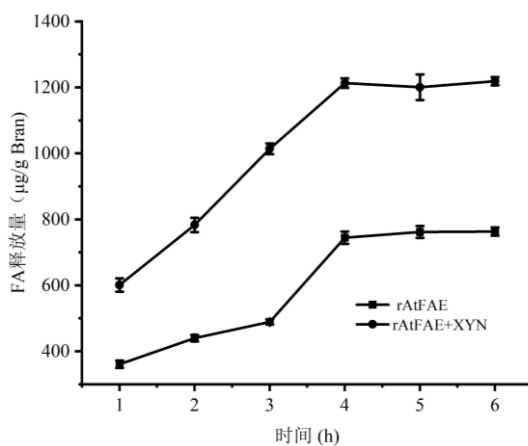


图 4-3 反应时间对 FA 释放率的影响

Fig.4-3 FA Effect of reaction time on FA release rate

4.5.2.2 酶的添加量对 FA 释放量的影响

结果显示当 1 U 的融合表达蛋白加入之后, FA 释放量较少, 当 rAtFAE 酶活力提升到 5 U/g 麸皮时 (rNpXYL, 273.5U/g 麸皮), FA 释放率大大提升。当 rAtFAE 酶活从 5 U 增加到 100 U 时, 麸皮 FA 释放量增长缓慢。最适 rNpXYL-rAtFAE 的酶活力添加量 50 U 条件下, 最终麸皮 FA 释放量为 1193.27 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 结果如表 4-4 所示。

表 4-4 不同浓度融合表达蛋白对 FA 释放量的影响

Table 4-4 Effect of different concentrations of fused proteins on FA release

rNpXYL-rAtFAE (U, 以阿魏酸酯酶活力计)	FA 释放量 ($\mu\text{g/g}$ 麸皮)
1	467.77 $\pm$ 26.13 ^e
5	811.36 $\pm$ 18.5 ^d
10	976.35 $\pm$ 30.03 ^c
20	1148.09 $\pm$ 25.1 ^b
50	1193.27 $\pm$ 18.64 ^{ab}
100	1198.91 $\pm$ 26.89 ^a

4.5.2.3 中心组合实验对 FA 释放量的影响

将上述实验中的最优 rNpXYL-rAtFAE 酶活力添加量 (rAtFAE 50 U/g 麸皮, rNPXYL 2750.12 U/g 麸皮), 按照中心组合实验中的温度、pH、料液比三个因素进行实验, 以优化 FA 的酶催化制备工艺。以 FA 释放量为响应值进行优化, 各因素的实验组及结果见表 4-5。

表 4-5 响应面优化 FA 释放量试验设计与结果

Table 4-5 Experimental design and results of FA release with optimized response surface

实验序号	A: 温度 ($^{\circ}\text{C}$)	B: pH	C: 固液比 (g:mL)	FA 释放量/ ($\mu\text{g/g}$ 麸皮)
1	53.4	5.5	25	1767.36
2	36.5	5.5	25	1657.3
3	40	4.5	35	1825.52
4	45	5.5	25	1724.26
5	50	4.5	35	1867.46
6	50	4.5	15	1476.11
7	40	6.5	35	1757.48

续表 4-5

实验序号	A: 温度 (°C)	B: pH	C: 固液比 (g:mL)	FA 释放量/ ($\mu\text{g/g}$ 麸皮)
8	45	5.5	41.8	1893.57
9	45	5.5	25	1721.66
10	45	5.5	8.2	1373.1
11	50	6.5	15	1550.71
12	45	5.5	25	1712.6
13	40	6.5	15	1373.26
14	45	5.5	25	1736.28
15	45	5.5	25	1728.34
16	40	4.5	15	1397.66
17	45	3.8	25	1501.49
18	50	6.5	35	1843.81
19	45	7.2	25	1497.55
20	45	5.5	25	1749.21

对表 4-5 中 FA 的释放量使用 Design-Expert 13 进行方差分析与回归模型建立, 结果发现固液比对 FA 的释放量影响最大, 其次是温度、pH, 结果分析如表 4-6 所示。

表 4-6 回归模型的方差分析

Table 4-6 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F-Value	P-Value
Model	5.314E+05	9	59049.91	73.48	< 0.0001**
A-温度	23729.20	1	23729.20	29.53	0.0003**
B-pH	169.52	1	169.52	0.2110	0.6558
C-固液比	4.119E+05	1	4.119E+05	512.59	< 0.0001**
AB	2570.09	1	2570.09	3.20	0.1040
AC	2036.18	1	2036.18	2.53	0.1425
BC	2516.60	1	2516.60	3.13	0.1072
A ²	0.4812	1	0.4812	0.0006	0.9810
B ²	81186.69	1	81186.69	101.03	< 0.0001**
C ²	11094.57	1	11094.57	13.81	0.0040**
Residual	8036.20	10	803.62		
Lack of Fit	7229.47	5	1445.89	8.96	0.0155*
Pure Error	806.73	5	161.35		
Cor Total	5.395E+05	19			

注: “**”表示极显著, “*”表示显著

该模型 $r^2=98.51\%$, $P<0.01$, 失拟项 $P>0.05$, 说明该模型较为可靠, 通过软件拟合, 得到响应值与试验因素的二次回归方程: $Y=1727.81+41.68\times A-3.52\times B+173.67\times C+17.92\times AB-15.95\times AC-17.74\times BC+0.1827\times A^2-75.06\times B^2-27.75\times C^2$ 其中 A 为温度 ($^{\circ}\text{C}$), B 为 (pH), C 为料液比 ($\text{g}:\text{mL}$)。由 Design-Expert 13 软件对试验结果进行响应面图的绘制, 结果如图 4-4 所示。

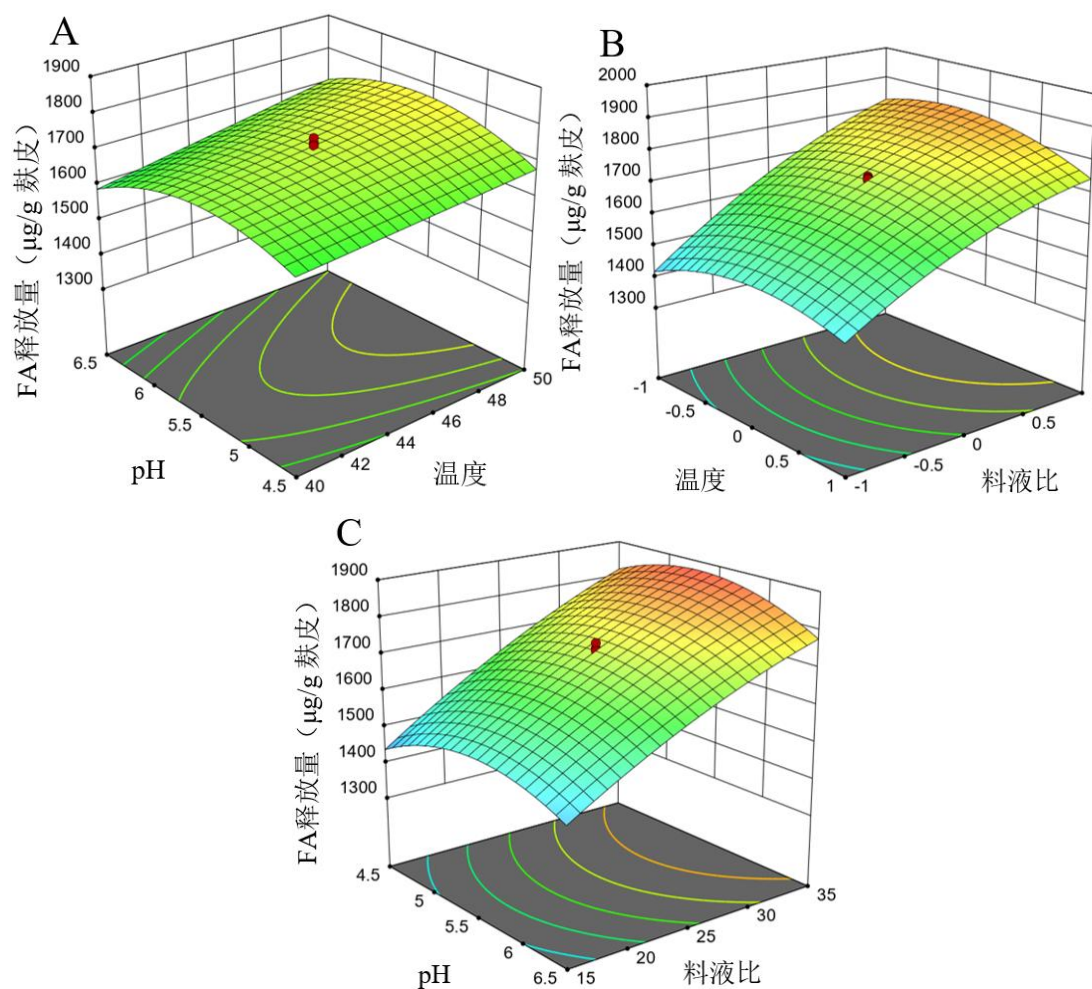


图 4-4 响应面

Figure 4-4 Response surface

通过 Design-Expert 13 软件分析对实验进行优化预测, 得出单位 FA 释放量最高条件为: 温度 49.1°C 、 pH 为 5.5、料液比为 $1\text{ g}/35.0\text{ mL}$, 最优条件下预测单位 FA 释放量为 $1895.09\pm 18.4\text{ }\mu\text{g/g}$ 麸皮。在最优条件下进行 5 次平行验证, 获得 FA 释放量为 $1875.67\pm 28.39\text{ }\mu\text{g/g}$ 麸皮, 是预测值的 98.97%, 与预测值接近, 说明该模型精准度高, 预测结果可靠。

4.6 本章小结

本章以麸皮为原料，采用中心组合实验方法，优化酶促反应过程中料液比、温度、pH 等反应条件。结果表明，利用融合表达产物 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 和商品 XYL 共同作用制备麸皮 FA 的效果。表明在利用 rNpXYL-rAtFAE 制备麸皮 FA 时不用再额外添加 XYL 商品酶，具体结论如下：

（1）在阿魏酸（FA）释放效率的比较中，混合酶系统展现出显著优势。相较于单一酶处理条件（XYL 商品酶 300 U， $776.35 \pm 30.03 \mu\text{g/g}$ 麸皮；rAtFAE 50 U， $515.27 \pm 18.64 \mu\text{g/g}$ 麸皮），混合酶体系的 FA 释放量（ $1875.67 \pm 28.39 \mu\text{g/g}$ 麸皮）显著提高。

（2）在相同反应条件下，添加 rNpXYL-rAtFAE 融合表达蛋白时，麸皮中 FA 的释放量达到 $1875.67 \pm 28.39 \mu\text{g/g}$ 。与之对比，rAtFAE 与 XYL 商品酶协同作用时，FA 释放量为 $1831.15 \pm 26.05 \mu\text{g/g}$ 。通过对比这两组数据可知，在麸皮 FA 制备中，利用 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶组合所得到的作用效果。

第五章 重组阿魏酸酯酶在黄芪多糖提取中的应用

5.1 引言

黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 作为传统药用植物, 其活性成分黄芪多糖 (APS) 因免疫调节、抗氧化及抗肿瘤等功效备受关注^[135]。然而, 传统热水浸提法存在提取效率低、耗能高、易破坏多糖结构等问题, 而化学法可能引入有机溶剂残留, 限制其临床应用^[136]。近年来, 基于生物酶解技术的绿色提取方法成为研究热点, 其通过靶向降解植物细胞壁组分, 实现活性成分的高效释放。然而, 黄芪细胞壁的复杂结构 (如纤维素-半纤维素-木质素网络及 FA 交联) 对单一酶解效率形成显著屏障, 需开发多酶协同作用体系以突破技术瓶颈。

纤维素微纤丝通过氢键形成刚性骨架, 半纤维素 (如木聚糖) 通过 FA 酯键与木质素交联, 构成致密的疏水网络^[137]。单一酶 (如纤维素酶) 仅能部分解构纤维素骨架, 但对 FA 交联的半纤维素-木质素复合体作用有限, 导致多糖释放率不足^[138]。研究表明^[139], FAE 可特异性水解半纤维素与木质素间的 FA 酯键, 解除交联结构, 为木聚糖酶 (XYL) 和纤维素酶 (CEL) 提供底物可及性, 而漆酶 (LAC) 通过氧化木质素单体破坏其聚合结构, 形成多酶协同的"解交联-脱木素-多糖降解"级联反应^[140]。

5.2 实验材料

5.2.1 主要仪器设备

同 2.2.2

5.2.2 主要材料

黄芪切片, 购自北京同仁堂健康药业 (宁夏) 有限公司; 其余主要实验试剂同 2.2.3。

5.3 实验方法

5.3.1 黄芪多糖的酶法辅助提取

5.3.1.1 酶法提取黄芪多糖工艺

将市售中的黄芪切片, 使用粉碎机粉碎后过 40 目筛得黄芪粉末后置于 60℃ 恒温干燥箱中 2 d, 直至黄芪粉恒重。将 pH 5.5 的去离子水 50℃ 预热后加

入黄芪粉与按照料液比（1 g: 15mL）与酶液混匀后置于 50℃ 水浴锅中反应 2 h 后升温至 85℃ 并反应 4 h，冷却至室温，8000 rpm、10 min 离心取上清，并加入 4 倍体积的 95%乙醇沉淀过夜。8000 rpm、10 min 离心得到的沉淀即为总黄芪多糖。同时以水提黄芪多糖作为对照，计算酶法提取黄芪多糖得率。

5.3.1.2 纤维素酶对黄芪多糖提取影响

为解析纤维素酶在黄芪多糖提取中的影响，通过不同浓度纤维素酶（0、5、10、20、50、100、200、400、500 U/g 黄芪粉）来探究对黄芪多糖提取率的影响，实验在标准反应条件下进行酶解处理，每组进行三次重复，以未添加纤维素酶作为对照，评估酶量对多糖提取的影响结果。

5.3.1.3 木聚糖酶对黄芪多糖提取影响

为探究 XYL 商品酶在多酶协同提取体系中的影响，在添加适量纤维素酶（100 U/g 黄芪粉）的反应体系中，继续添加不同浓度的 XYL 商品酶（10、50、100、200、300、500 U/g 黄芪粉）。将未添加木聚糖酶作为对照，评估木聚糖酶量对黄芪多糖提取率的影响结果。

5.3.1.4 漆酶对黄芪多糖提取影响

为找到漆酶在多酶协同提取黄芪多糖中的影响，本实验在固定酶组分（纤维素酶 100 U/g 黄芪粉、木聚糖酶 100 U/g 黄芪粉）的条件下，添加不同浓度的漆酶（0.5、1、5、10、20、30 U/g 黄芪粉）。实验在标准反应条件下进行，每组实验进行三次重复。以未添加漆酶作为对照，评估漆酶添加量对黄芪多糖提取率的影响结果。

5.3.1.4 重组酶 rAtFAE 对黄芪多糖提取影响

为明确重组酶 rAtFAE 在黄芪多糖协同提取中的作用，在基础酶体系：纤维素酶（100 U/g 黄芪粉）、XYL 商品酶（100 U/g 黄芪粉）及漆酶（5 U/g 黄芪粉）基础上，添加重组 rAtFAE（0、1、5、10、20、50、100 U/g 黄芪粉）。实验在标准条件下进行，每组实验进行三次重复。以未添加 rAtFAE 为对照。

5.3.1.5 重组酶 rNpXYL-rAtFAE 对黄芪多糖提取影响

为评估重组酶 rNpXYL-rAtFAE 的添加量对黄芪多糖提取率的影响，对重组酶 rNpXYL-rAtFAE 添加酶量研究。实验体系包含固定剂量的纤维素酶（100 U/g 黄芪粉）与漆酶（5 U/g 黄芪粉），梯度添加基于 rAtFAE 酶活力的重组酶 rNpXYL-

rAtFAE（1、5、10、20、50、100 U/g 黄芪粉）。实验在标准化条件下进行，每组实验进行三次重复。

5.4 分析方法

5.4.1 总糖的测定

苯酚-硫酸法：配制 0.1 mg/mL 葡萄糖标准液，梯度稀释为 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度。各取 1 mL 标准液，加入 6% 苯酚溶液 1 mL，加入 5 mL 浓硫酸，使用漩涡震荡仪混匀后室温静置 30 分钟。于紫外分光光度计 490 nm 吸光值下测得的数值绘制成线性回归方程，总糖的计算公式如下：

$$X = \frac{[(A_1 - A_2) \times K + C]}{M \times t} \times 1000$$

式中：X：稀释酶液中木聚糖酶的活力，U/mL； A_1 ：酶反应液的吸光度； A_2 ：酶空白的吸光值；K：标准曲线的斜率；C：标准曲线的截距；M：木糖的摩尔质量，150.2 g/mol；t：酶解反应时间，min；1000：转化因子；1 mmol=1000 μmol 。

5.4.2 总糖得率计算方法

490 nm 下的吸光值带入标曲中得到浓度 $\mu\text{g/mL}$ ，乘稀释倍数，除以 1000 得到 mg/mL，乘反应体积，除以反应中的黄芪渣重量（g）。

$$W = \frac{C \times N \times V}{1000 \times M} \times 100\%$$

式中：W 表示黄芪多糖浓度 mg/mL；C 为通过标准曲线算得的总糖浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；V 表示提取液体积，mL；N 表示稀释倍数；M 表示称量的黄芪粉末质量：g，1000 为 μg 与 mg 之间的转化倍数。

5.5 结果与讨论

5.5.1 总糖标准曲线

利用分光光度法测定蛋白质含量，所得蛋白质浓度与吸光值关系如图 5-1 所示，其中拟合系数 $R^2=0.9998$ ，表明拟合度较好，可以用作蛋白质含量的定量分析和计算使用。

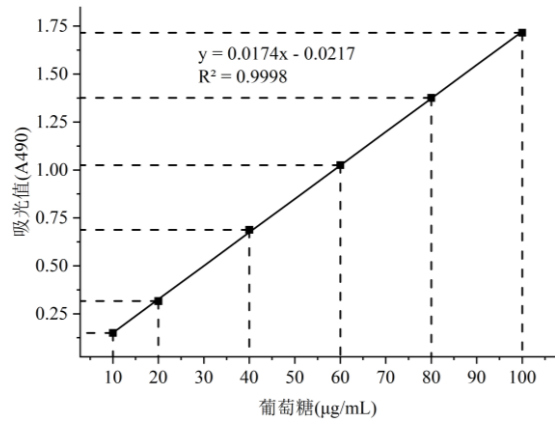


图 5-1 葡萄糖标准曲线 (μg/mL)
Fig.5-1 Glucose standard curve (μg/mL)

5.5.2 纤维素酶对黄芪多糖提取影响

结果显示当纤维素酶剂量从 10 U 提升至 100 U 时，总多糖得率呈线性增长趋势。结果如表 5-1 所示，当酶活力添加至 100 U，可溶性多糖得率从未添加重组酶对照组的 2.44±0.07%提升至 4.15±0.11%，不可溶性多糖同步从 4.26±0.10%增加至 7.1±0.16%，总得率达 11.16±0.22%。添加量超过 100 U 之后，对黄芪多糖的提取没有效果。结果显示，添加纤维素酶可显著提高黄芪多糖的提取率。

表 5-1 纤维素酶添加量对黄芪多糖提取率的影响

Table 5-1 Effect of cellulase addition on the extraction rate of Astragalus polysaccharides		
纤维素酶 (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶性多糖及杂质 (%)
0	2.44±0.028 ^f	4.26±0.08 ^e
5	2.66±0.067 ^e	4.72±0.11 ^d
10	3.14±0.07 ^d	5.34±0.09 ^c
20	3.58±0.067 ^c	6.75±0.18 ^b
50	3.92±0.036 ^b	6.92±0.12 ^{ab}
100	4.15±0.012 ^a	7.01±0.06 ^{ab}
200	4.13±0.088 ^a	7.09±0.26 ^a
400	4.19±0.052 ^a	7.05±0.18 ^a

5.5.3 木聚糖酶对黄芪多糖提取影响

结果显示当 XYL 商品酶剂量达到 50 U 时效果最好, 如表 5-2 所示, 与对照组相比, 可溶性多糖提取率从 $4.56\pm0.10\%$ 提升至 $5.19\pm0.12\%$, 不可溶性多糖同步从 $6.92\pm0.16\%$ 增加至 $7.56\pm0.18\%$, 总多糖得率为 $12.7\pm0.22\%$ 。添加量超过 50 U 之后, 对黄芪多糖的提取没有效果。

表 5-2 木聚糖酶的添加对黄芪多糖提取率的影响

Table 5-2 Effect of xylanase addition on the extraction rate of Astragalus polysaccharides

XYL 商品酶 (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶多糖及杂质 (%)
0	4.11 ± 0.13^c	7.26 ± 0.11^b
10	4.36 ± 0.09^{bc}	7.72 ± 0.25^a
50	4.54 ± 0.07^{ab}	7.94 ± 0.29^a
100	4.68 ± 0.16^a	8.02 ± 0.18^a
200	4.62 ± 0.08^{ab}	7.96 ± 0.12^a
500	4.65 ± 0.15^a	8.01 ± 0.06^a

5.5.4 漆酶对黄芪多糖提取影响

添加固定酶组分 (纤维素酶 100 U、木聚糖酶 100 U) 的同时在黄芪粉中添加不同浓度的漆酶 (0.5、1、5、10、20、30 U)。结果如表 5-3 所示, 当漆酶添加量提升至 5 U 时可溶性多糖提取率接近最高值。与对照组相比, 可溶性多糖提取率从 $5.27\pm0.11\%$ 提升至 $6.01\pm0.13\%$, 不可溶性多糖同步从 $7.34\pm0.17\%$ 增加至 $8.24\pm0.19\%$, 总多糖得率达 $14.34\pm0.25\%$ 。添加量超过 5 U 之后, 对黄芪多糖的提取没有效果。

表 5-3 漆酶的添加对黄芪多糖提取率的影响

Table 5-3 Effect of laccase addition on the extraction rate of polysaccharides from Astragalus membranaceus

漆酶 (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶性多糖及杂质 (%)
0	4.67 ± 0.09^b	7.99 ± 0.24^b
0.5	4.7 ± 0.13^b	8.25 ± 0.18^b
1	4.83 ± 0.14^b	8.41 ± 0.35^b
5	5.32 ± 0.19^a	8.97 ± 0.22^a
10	5.32 ± 0.27^a	9.02 ± 0.27^a

续表 5-3

漆酶 (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶性多糖及杂质 (%)
20	5.38±0.18 ^a	8.99±0.21 ^a
30	5.35±0.12 ^a	8.96±0.21 ^a

5.5.5 重组酶 rAtFAE 对黄芪多糖提取率的影响

结果显示添加固定酶量的纤维素酶 (100 U)、XYL 商品酶 (100 U) 及漆酶 (5 U)，并按浓度添加重组 rAtFAE (0、1、5、10、20、50、100 U)。结果如表 5-4 所示,当 rAtFAE 添加量从 0 U 增至 5 U 时,可溶性多糖提取率由 5.41±0.13% 提高至 6.12±0.15%, 不可溶性多糖同步从 8.92±0.21% 增加至 9.73±0.18%, 总多糖得率达 16.16±0.27%。当 rAtFAE 剂量超过 5 U 后,对黄芪多糖的提取便并不在有帮助。

表 5-4 rAtFAE 的添加对黄芪多糖提取率的影响

Table 5-4 Effect of rAtFAE on the extraction rate of Astragalus polysaccharides

rAtFAE (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶性多糖及杂质 (%)
0 U	5.4±0.13 ^b	8.85±0.18 ^b
1 U	5.56±0.14 ^b	9.02±0.27 ^b
5 U	6.12±0.19 ^a	9.73±0.16 ^a
10 U	6.34±0.27 ^a	9.82±0.27 ^a
20U	6.38±0.18 ^a	9.79±0.21 ^a
50 U	6.35±0.22 ^a	9.76±0.21 ^a
100 U	6.35±0.16 ^a	9.85±0.21 ^a

5.5.6 重组酶 rNpXYL-rAtFAE 对黄芪多糖提取率的影响

结果显示当融合蛋白添加量从 1 U 增至 5 U 时,可溶性多糖提取率由 3.12±0.09% 提升至 5.47±0.15%, 不可溶性多糖从 7.25±0.18% 增加至 9.03±0.21%。在 10 U 剂量时达到峰值,可溶性组分与不可溶性组分的提取效率分别为 6.58±0.17% 和 10.16±0.24%, 总多糖得率达 16.69±0.31%, 结果如表 5-5 所示。

表 5-5 融合表达蛋白提取黄芪多糖

Table 5-5 Fusion expression protein extraction of Astragalus polysaccharides

rNpXYL-rAtFAE (U)	可溶性多糖 (%)	不可溶性多糖及杂质 (%)
1 U	4.86±0.24 ^c	8.52±0.17 ^c
5 U	5.92±0.19 ^b	9.33±0.36 ^b
10 U	6.53±0.35 ^a	10.16±0.21 ^a
20U	6.58±0.28 ^a	10.19±0.19 ^a
50 U	6.45±0.17 ^a	10.08±0.27 ^a
100 U	6.55±0.23 ^a	10.13±0.26 ^a

5.6 本章小结

本章主要研究了 rAtFAE 与 XYL-rAtFAE 融合表达蛋白应用于黄芪多糖的提取主要结论如下：

为评估重组酶对黄芪多糖提取效率的影响，本研究采用 GS115/rAtFAE 工程菌株分泌的重组阿魏酸酯酶(rAtFAE)与商品化木聚糖酶(XYL)进行协同作用，并结合纤维素酶与漆酶进行协同实验。酶促反应体系包含的四种酶组分：纤维素酶（100 U）、商品 XYL（100 U）、漆酶（5 U）及重组 rAtFAE（5 U）。实验在优化反应条件下进行，通过三组重复实验验证提取效率。实验结果表明，复合酶协同体系使黄芪多糖总提取率达到 16.16±0.23%，其中可溶性多糖组分占比 6.34%±0.11%，不可溶性组分占比 9.82±0.15%。相较于对照组的总提取率 6.7±0.18%（可溶性多糖 2.44±0.07%及不可溶性多糖 4.26±0.09%），酶法策略使提取效率显著提升 2.41 倍。而 rNpXYL-rAtFAE 融合表达蛋白（rAtFAE 10 U，XYL 553.9 U）条件下协同纤维素酶(100 U)、漆酶(5 U)作用下的总多糖提取率为 16.69±0.31%（可溶性多糖 6.58±0.17%，不可溶性多糖 10.16±0.24%）。结果表明利用 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶组合所得到的作用效果，rNpXYL-rAtFAE 在黄芪多糖提取中可以不用额外添加 XYL。

第六章 结论与展望

6.1 结论

(1)对重组菌 GS115/rAtFAE 发酵分泌的目标蛋白 rAtFAE 进行了酶学性质研究,并参考更为细化的序列比对聚类分析法将 rAtFAE 归类为 A 型 FAE。并将 *rAtFAE* 与 *rNpXYL* 基因与 pPIC9K 质粒通过全基因合成后在毕赤酵母中进行了融合表达。

(2)对重组菌 GS115/rNpXYL-rAtFAE 使用摇瓶对发酵培养基组分进行优化,并将摇瓶的最优培养基参数应用于 15 L 发酵罐中,通过控制甲醇的流速控制工艺进行了优化,结果显示低溶解氧(10%-40)工艺下的酶活力要高于高溶解氧(15%-85)条件下的。

(3)在 rAtFAE 应用方面协同纤维素酶、漆酶、XYL 商品酶应用于麸皮中制备 FA、黄芪多糖提取的应用。其效果显著,在同样的反应条件下加入 rNpXYL-rAtFAE,结果均显示 rNpXYL-rAtFAE 完全可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶组合所得到的作用效果,表明在利用 rNPXYL-rAtFAE 制备黄芪多糖时不用再额外添加 XYL 商品酶。

6.2 本文创新点

(1)将 rNpXYL 作为前导肽与 rAtFAE 进行融合后成功表达,在提高目标蛋白表达量的同时,也拓宽了酶的用途。

(2)在应用方面将 rNpXYL-rAtFAE 融合表达的蛋白与 rAtFAE 与 XYL 商品酶进行对比,其结果表明, rNpXYL-rAtFAE 融合表达的目标蛋白可以达到 rAtFAE 与 XYL 商品酶的协同使用效果,拓宽了生物酶降解植物细胞壁的思路与技术。也为工业生物技术的成本控制与效率提升提供了可行方案。

6.3 展望

本文将 *rAtFAE* 与 *rNpXYL* 于毕赤酵母中进行融合表达,在应用方面采多酶用协同方式,为酶法降解植物细胞壁论证可行性,拓宽了酶法降解植物细胞壁的应用能力,并为酶法降解农业废弃物从中获得高价值附加产品提供了技术与思路的支撑。但本文的研究只是一个开始,后续的主要研究内容如下:

(1) 本研究仅在 15 L 发酵罐中开展了 GS115/rNpXYL-rAtFAE 发酵控制工艺的研究，后续工作中需要在更大规模，如 100 L、例如 100 L 或 500 L 发酵罐中进行发酵控制工艺研究，以获得更近似于大规模发酵生产的控制工艺；

(2) 在应用方面仅进行了实验室规模的研究，后续可通过在发酵罐进行大规模的放大应用实验，以获得实际应用的技术与参数。

(3) 本研究仅将 rNpXYL 与 rAtFAE 进行融合表达，后续可对毕赤酵母代谢通路进行研究，将漆酶、纤维素酶基因进行融合表达。

参考文献

- [1] ZHANG S S, WANG J P, LIU Y H, et al. Multiple strategies to improve extracellular secretion and activity of feruloyl esterase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269: 132082.
- [2] LI F H, USMAN S, HUANG W K, et al. Effects of inoculating feruloyl esterase-producing *Lactiplantibacillus plantarum* A1 on ensiling characteristics, in vitro ruminal fermentation and microbiota of alfalfa silage [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2023, 14(1): 43.
- [3] SANCHEZ-GONZALEZ M, BLANCO-GAMEZ A, PARRA-SALDIVAR R, et al. Study of new feruloyl esterases to understand lipase evolution: the case of *Bacillus flexus* [J]. Methods in molecular biology, 2012, 861: 53-61.
- [4] LI Y Q, ZHANG Y Z, DONG L Z, et al. Fermentation of *Lactobacillus fermentum* NB02 with feruloyl esterase production increases the phenolic compounds content and antioxidant properties of oat bran [J]. Food Chemistry, 2024, 437(1): 137834.
- [5] TODOKORO T, NEGORO H, KOTAKA A, et al. *Aspergillus oryzae* FaeA is responsible for the release of ferulic acid, a precursor of off-odor 4-vinylguaiaicol in sake brewing [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(2):140-145.
- [6] ZHAO M X, AN X Y, FAN Z Q, et al. A feruloyl esterase/cellulase integrated biological system for high-efficiency and toxic-chemical free isolation of tobacco based cellulose nanofibers [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 313:120885.
- [7] GARBELOTTI C V, BULMER G S, WARD R J, et al. The feruloyl esterase from *Thermobacillus xylanilyticus* shows broad specificity for processing pre-biotic feruloylated xylooligosaccharides at high temperatures [J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134939.
- [8] DONAGHY J, KELLY P F, MCKAY A M. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2): 257-260.
- [9] MACKENZIE C R, BILOUS D, SCHNEIDER H, et al. Induction of Cellulolytic and Xylanolytic Enzyme Systems in *Streptomyces* spp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(12): 2835-9.
- [10] MARMUSE L, ASTHER M, FABRE E, et al. New chromogenic substrates for feruloyl esterases[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008, 6(7):1208-14.
- [11] ARENTSHORST M, REIJNGOUD J, VAN TOL D J C, et al. Utilization of ferulic acid in *Aspergillus niger* requires the transcription factor FarA and a newly identified Far-like protein (FarD) that lacks the canonical Zn(II)2Cys6 domain [J]. Frontiers in Fungal Biology, 2022, 8;3: 978845.
- [12] YOU Y, XU X, LIU H, et al. Locust Pathogen *Aspergillus oryzae* XJ1 Is Different from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus flavus* Based on Genomics Comparisons [J]. Microorganisms, 2024, 4;12(12): 2501.
- [13] THAKUR R, SHISHODIA S K, SHARMA A, et al. Accelerating the understanding of *Aspergillus terreus*: Epidemiology, physiology, immunology and advances [J]. Current Research in Microbial Sciences, 2024, 6: 100220.
- [14] ZENG X, SONG J, TANG S, et al. Transcriptomic Approach Reveals Contrasting Patterns of Differential Gene Expression during Tannin Biodegradation by *Aspergillus tubingensis* in Liquid and Solid Cultures [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 30;25(19): 10547.

- [15] KADOOKA C, OKA T. Construction of a Cosmid-Based Ultraefficient Genomic Library System for Filamentous Fungi of the Genus *Aspergillus* [J]. *Journal of Fungi*, 2024, 29;10(3):188.
- [16] CREPIN V F, FAULDS C B, CONNERTON I F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 12-09.
- [17] ZHANG Y, JIANG Z, LI Y, et al. The Combined Cultivation of Feruloyl Esterase-Producing Strains with CMCase and Xylanase-Producing Strains Increases the Release of Ferulic Acid [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 1889.
- [18] GIANNAKOPOULOU A, TSAPARA G, TROGANIS A N, et al. Development of a Multi-Enzymatic Approach for the Modification of Biopolymers with Ferulic Acid [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 992.
- [19] KUNNUMMAL S P, SORI N, KHAN M A, et al. Plant-Based Nutraceutical Formulation Modulates the Human Gut Microbiota and Ferulic Acid Esterase Activity During In Vitro Fermentation [J]. *Current Microbiology*, 2023, 81(1): 3.
- [20] TISHLER Y, SAMACH A, ROGACHEV I, et al. Analysis of Wheat Straw Biodiversity for Use as a Feedstock for Biofuel Production [J]. *Bioenergy Research*, 2015, 8(4): 1831-1839.
- [21] PHIENLUPHON A, KONDO K, MIKAMI B, et al. Structural insights into the molecular mechanisms of substrate recognition and hydrolysis by feruloyl esterase from *Aspergillus sydowii* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253:127188.
- [22] OMORI K K, DRUCKER C T, OKUMURA T L S, et al. The structure of a *Lactobacillus helveticus* chlorogenic acid esterase and the dynamics of its insertion domain provide insights into substrate binding [J]. *FEBS Letters*, 2023, 597(23): 2946-2962.
- [23] WANG R N, ZHANG Y, LIU L, et al. Discovery of a bifunctional xylanolytic enzyme with arabinoxylan arabinofuranohydrolase-d3 and endo-xylanase activities and its application in the hydrolysis of cereal arabinoxylans [J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(7): 1536-1547.
- [24] FINGERHUT M A, HENRICH L, LAUBER C, et al. Characterization of a GDS(L)-like hydrolase from *Pleurotus sapidus* with an unusual SGNH motif [J]. *Amb Express*, 2024, 14(1): 98.
- [25] 王丽, 孙钦栋, 王贺祥. 阿魏酸酯酶的研究与应用进展 [J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*. 2016, 47(04): 628-635.
- [26] OLIVEIRA D M, MOTA T R, OLIVA B, et al. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 278:408-423.
- [27] OHLHOFF C W, KIRBY B M, VAN ZYL L, et al. An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2015, 118: 79-88.
- [28] MATHEW S, ABRAHAM T E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications [J]. *Critical reviews in biotechnology*, 2004, 24(2-3): 59-83.
- [29] FAULDS C B, WILLIAMSON G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes* [J]. *Journal of general microbiology*, 1991, 137(10): 2339-2345.
- [30] RALET M C, FAULDS C B, WILLIAMSON G, et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *aspergillus-niger* [J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 263(2): 257-269.

- [31] FERREIRA L M, WOOD T M, WILLIAMSON G, et al. A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain [J]. *The Biochemical journal*, 1993, 294: 349-355.
- [32] PRADEEP P, KOLIPAKALA R S, NAGARAJAN D. The genome of *Aspergillus niger* strain *melanoliber* [J]. *Microbiology resource announcements*, 2025, 14(3): e0080924.
- [33] ALWADAI A S, AL WAHIBI M S, ALSAYED M F, et al. Molecular characterization of plant growth-promoting *Trichoderma* from Saudi Arabia [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 23236.
- [34] ZHANG S Y, FU G N, DU L H, et al. Continuous flow biocatalysis: synthesis of purine nucleoside esters catalyzed by lipase TL IM from *Thermomyces lanuginosus* [J]. *Rsc Advances*, 2024, 14(16): 10953-10961.
- [35] NIETER A, KELLE S, LINKE D, et al. A *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* with a pronounced chlorogenic acid esterase activity [J]. *New Biotechnology*, 2017, 37: 153-161.
- [36] YANG J J, ZHONG B, YANG L, et al. Ulp1 Regulates Cell Proliferation Through INO1 in *Pichia pastoris* [J]. *Genes*, 2024, 15(11): 1459.
- [37] MUNIRAH M, HARDIANTO D, MARTIUS E, et al. Insulin production in *Pichia pastoris*: Mini-review of biotechnological advancements and process optimization [J]. *Process Biochemistry*, 2025, 149: 277-287.
- [38] ARJMAND S. Promoters in *Pichia pastoris*: A Toolbox for Fine-Tuned Gene Expression [J]. *Methods in molecular biology*, 2024, 2844: 159-178.
- [39] FENG X, MARCHISIO M A. Hybrid Synthetic Promoters in *Saccharomyces cerevisiae* Built on Foreign Promoter Sequences [J]. *Methods in molecular biology*, 2024, 2844: 109-119.
- [40] CHIN J X, CHUNG B K S, LEE D Y. Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2210-2212.
- [41] TAVERA-QUIROZ M J, ROMANO N, MOBILI P, et al. Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 16: 164-173.
- [42] PRATES J A, TARBOURIECH N, CHARNOCK S J, et al. The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition [J]. *Structure (London, England : 1993)*, 2001, 9(12): 1183-1190.
- [43] TSUCHIYAMA M, SAKAMOTO T, TANIMORI S, et al. Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid glycerol esters using type A feruloyl esterase from *Aspergillus niger* [J]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2007, 71(10): 2606-2609.
- [44] HERMOSO J A, SANZ-APARICIO J, MOLINA R, et al. The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family [J]. *Journal of molecular biology*, 2004, 338(3): 495-506.
- [45] FIELD S D, LEE W K, DUTRA J K, et al. Fluorophosphonate-Based Degradation Identifies Degradable Serine Hydrolases by Quantitative Proteomics [J]. *Chembiochem*, 2020, 21(20): 2916-2920.
- [46] HEYMANN E, ALT J. Proceedings: On the active center of a bacterial amidase/esterase behaving both as a serine hydrolase and as a thiol enzyme [J]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 1974, 355(10): 1205-1206.
- [47] THUMA K, KLUSZYNSKI I, JOHNSON R J. Screening for serine hydrolase activity in *E. coli* against fluorogenic ester substrates [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(3): S130-S130.

- [48] ARNDT J W, SCHWARZENBACHER R, PAGE R, et al. Crystal structure of an alpha/beta serine hydrolase (YDR428C) from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution [J]. *Proteins*, 2005, 58(3): 755-758.
- [49] LIU Y, JIANG S, LI Q, et al. Advances of Kunitz-type serine protease inhibitors [J]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 2021, 37(11): 3988-4000.
- [50] HARISH B S, UPPULURI K B. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1373-1387.
- [51] 刘元元, 徐泽平. 阿魏酸酯酶活性的分光光度法测定及影响因素研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(13): 284-288.
- [52] DU G M, WANG Y L, ZHANG Y B, et al. Structural insights into the oligomeric effects on catalytic activity of a decameric feruloyl esterase and its application in ferulic acid production [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 126540.
- [53] RUDJITO R C, MATUTE A C, JIMÉNEZ-QUERO A, et al. Integration of subcritical water extraction and treatment with xylanases and feruloyl esterases maximises release of feruloylated arabinoxylans from wheat bran [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130387.
- [54] ZHAO G H, ZHANG R F, DONG L H, et al. The effects of different enzymes on the liberation of bound phenolics from rice bran dietary fibre and their antioxidant activities [J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103449.
- [55] ZHANG Y, YE Q, LIU B, et al. Fermenting Distiller's Grains by the Domesticated Microbial Consortium To Release Ferulic Acid [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(16): 9259-9267.
- [56] LI F H, ZHANG B B, ZHANG Y X, et al. Probiotic effect of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus plantarum* inoculated alfalfa silage on digestion, antioxidant, and immunity status of lactating dairy goats (vol 11,pg 38, 2022) [J]. *Animal Nutrition*, 2024, 18: 464-464.
- [57] DING J W, KUA G K B, NG K H, et al. Immobilization of a Recombinant Cholesterol Esterase from *Mustela putorius furo* for the Hydrolysis of γ -Oryzanol [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(10):6018-6029.
- [58] ZHANG X Y, LEI X W, OUYANG K H, et al. Characteristics of a Recombinant *Lentinula edodes* Ferulic Acid Esterase and Its Adverse Effects on In Vitro Fermentation of Wheat Straw [J]. *Fermentation-Basel*, 2023, 9(7): 683.
- [59] KHAYRANI A C, HIDAYATULLAH I M, SATYAWAN I L, et al. Techno-Economic Assessment of Ferulic Acid Bioproduction from Agro-industrial Waste Using *Aspergillus niger* [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2024, 15(10): 5755-5769.
- [60] ZHANG J Q, TANG H Z, YU X, et al. Co-production of ferulic acid and p-coumaric acid from distiller grain by a putative feruloyl esterase discovered in metagenome assembled genomes [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 439: 140814.
- [61] BENTO-SILVA A, PATTO M C V, BRONZE M D. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls [J]. *Food Chemistry*, 2018, 246: 360-378.
- [62] BUANAFINA M M D, BUANAFINA M F, LAREMORE T, et al. Characterization of feruloyl esterases in maize pollen [J]. *Planta*, 2019, 250(6): 2063-2082.
- [63] LV H J, ZHANG Y, SHAO J, et al. Ferulic acid production by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 1829-1832.
- [64] TERRETT O M, DUPREE P. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 97-104.

- [65] PEZZANA L, MALMSTRÖM E, JOHANSSON M, et al. Multiple approaches to exploit ferulic acid bio-based epoxy monomer for green thermoset [J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 212: 118304.
- [66] LI F Y, WANG Y J, XU L C, et al. Fabrication of Ferulic Acid-Cellulose Nanocrystal Enhanced Stretchable and Antibacterial Hydrogels [J]. *Chemnanomat*, 2025, 11(2): e202400560.
- [67] TRAMONTINA R, ORDONEZ D A R, SILVELLO M A D, et al. Intensification and techno-economic analysis of a biocatalytic process for coniferol production from ferulic acid: An innovative strategy for lignin valorization [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 427: 36.
- [68] BARBOSA B S T, ARAÚJO S C, CORDEIRO Y, et al. Impact of the Covalent Interaction Between Ferulic Acid and Ovalbumin on the Structure and Functional Properties of the Protein [J]. *Food Biophysics*, 2025, 20(1): 28.
- [69] MAIA A M M, PESSOA A, JR., ROBERTO I C. Extraction of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric) from rice straw alkaline black liquor using Pluronic F-127 for potential applications in the cosmetics industry [J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 201: 116914.
- [70] KUMAR R, BHAGIA S, MITTAL A, et al. Effect of cellulose reducing ends and primary hydroxyl groups modifications on cellulose-cellulase interactions and cellulose hydrolysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2024, 121(9): 2793-2807.
- [71] KASSIE B B, DAGET T M, TASSEW D F. Synthesis, functionalization, and commercial application of cellulose-based nanomaterials [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278(4): 134990.
- [72] HUANG C M, WU K C, VERMA K K, et al. Isolation and expression analysis of cellulose synthase 3 (*Ces3*) genes from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2024, 11(1): 71.
- [73] TAO L, ZHANG J W, LAN W F, et al. Neutral oligosaccharides from ginseng (*Panax ginseng*) residues vs. neutral ginseng polysaccharides: A comparative study of structure elucidation and biological activity [J]. *Food Chemistry*, 2025, 464(1): 141674.
- [74] LIU E S, MERCADO M I V, SEGATO F, et al. A green pathway for lignin valorization: Enzymatic lignin depolymerization in biocompatible ionic liquids and deep eutectic solvents [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2024, 174: 110392.
- [75] XIANG X Y, ZHANG Y H, WEI W, et al. Latest advances in research methods for high-yield cellulase production [J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2025, 9: 7.
- [76] NOVAK J K, GARDNER J G. Current models in bacterial hemicellulase-encoding gene regulation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 16-16.
- [77] RATHORE B, ALI MAHDI A, NATH PAUL B, et al. Indian herbal medicines: possible potent therapeutic agents for rheumatoid arthritis [J]. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2007, 41(1): 12-17.
- [78] SCHAUBEDER J B, SPIRK S, FLIRI L, et al. Role of intrinsic and extrinsic xylan in softwood kraft pulp fiber networks [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 323: 121371.
- [79] OLIVEIRA I M, LEITE S P, MESQUITA A R C, et al. Xylan from *Dinizia excelsa*: Chemical characterization and biological activities [J]. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 2024, 96(3): e20240219.
- [80] ZHAO H, PENG L, TAO Y H, et al. Ammonia combined with hydrogen peroxide pretreatment to improve the production of fermentable sugars in reed [J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2025, 17: 24.

- [81] KAHIMBI H, MONGE E S, KICHONGE B, et al. Techno-Economic Evaluation of Synthetic and Natural Antioxidants Used for Enhancing Oxidation Stability of Biodiesel [J]. Energy Science & Engineering, 2025, 13(4): 1622-1637.
- [82] SWAMY S K P, GOVINDASWAMY V. Therapeutical properties of ferulic acid and bioavailability enhancement through feruloyl esterase [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 657-666.
- [83] KAMILA M Z-P, HELENA R. The effectiveness of ferulic acid and microneedling in reducing signs of photoaging: A split-face comparative study [J]. Dermatologic Therapy, 2020, 33(6): e14000.
- [84] ABDIN M, NAEEM M A, ALY-ALDIN M M. Enhancing the bioavailability and antioxidant activity of natamycin E235-ferulic acid loaded polyethylene glycol/carboxy methyl cellulose films as anti-microbial packaging for food application [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266(2): 131249.
- [85] HARARAK B, WIJARANAKUL P, WANMOLEE W, et al. Self-Formation of Lignin Particles Through Melt-Extrusion for Active Biodegradable Food Packaging [J]. Acs Omega, 2024, 9(23): 24346-24355.
- [86] LIU E, MERCADO M I V, SEGATO F, et al. A green pathway for lignin valorization: Enzymatic lignin depolymerization in biocompatible ionic liquids and deep eutectic solvents [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 174: 110392.
- [87] HE Z C, JIANG G Y, GAN L Z, et al. Bacterial valorization of lignin for the sustainable production of value-added bioproducts [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 279:135171.
- [88] RECORD E, ASTHER M, SIGOILLOT C, et al. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(4): 349-355.
- [89] DEBEIRE P, KHOUNE P, JELTSCH J-M, et al. Product patterns of a feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* on large feruloyl-arabino-xylo-oligosaccharides from wheat bran [J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 425-428.
- [90] KWEON M. Effects of xylanase-modified water-extractable arabinoxylans on flour and fresh noodle quality [J]. Korean Journal of Food and Cookery Science, 2024, 40(3): 147-155.
- [91] ABENA T, SIMACHEW A. Production and characterization of acidophilic xylanase from wood degrading white rot fungus by solid-state fermentation of wheat straw [J]. Heliyon, 2024, 10(15): e35496.
- [92] QU J X, TIAN Z J, ZHANG F F, et al. Effect of ultrasound-assisted xylanase pretreatment on the soluble substances of *poplar* wood and its model construction [J]. Advanced Composites and Hybrid Materials, 2024, 7(3):77.
- [93] LIU X Y, ZHANG Y X, QI X Y, et al. Advances of microbial xylanases in the application of flour industries: A comprehensive review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282(5): 137205.
- [94] PHUKON L C, ABEDIN M M, CHOURASIA R, et al. Valorization of agro-wastes by *Bacillus altitudinis* XYL17 through simultaneous production of xylanase, xylooligosaccharides, and antioxidant compounds [J]. Industrial Crops and Products, 2024, 213: 118395.
- [95] YOON J A, PARK E H, YOON Y Y, et al. Isolation of xylanase-producing yeast *Pseudozyma tsukubaensis* from chrysanthemum [J]. Food Science and Biotechnology, 2025, 34: 2217–2224.
- [96] 龚燕燕, 殷欣, 唐存多, 等. 宇佐美曲霉阿魏酸酯酶与木聚糖酶协同作用降解小麸皮皮制备阿魏酸 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(02): 262-266.

- [97] FU Z, ZHU Y, TENG C, et al. Biochemical characterization of a novel feruloyl esterase from *Burkholderia pyrrocinia* B1213 and its application for hydrolyzing wheat bran [J]. 3 Biotech, 2022, 12(1): 24.
- [98] LIU Z, SHI E, MA F, et al. Improved Release of Monosaccharides and Ferulic Acid Using Enzyme Blends From *Aspergillus Niger* and *Eupenicillium Parvum* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 9: 814246.
- [99] 毕于运, 王亚静, 高春雨. 中国主要秸秆资源数量及其区域分布 [J]. 农机化研究, 2010, 32(03): 1-7.
- [100] MURRAY J C, BURCH J A, STREILEIN R D, et al. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation [J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2008, 59(3): 418-425.
- [101] NUNES BEZERRA G S, VICENTE PEREIRA M A, OSTROSKY E A, et al. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2017, 127(2): 1683-1691.
- [102] WANG L. Effects of (1,3)(1,4)-beta-D-glucans of wheat flour of breadmaking [M]. 1997.
- [103] KARAMAC M, KOLEVA L, KANCHEVA V D, et al. The Structure-Antioxidant Activity Relationship of Ferulates [J]. Molecules, 2017, 22(4): 480-485.
- [104] ROHINI B, HEBBAR H U. Sonophotocatalysis for Enhanced Extraction of Corn Cob Xylan and Simultaneous Production of Xylose and Xylooligosaccharides [J]. Waste and Biomass Valorization, 2024, 15(12): 7097-7110.
- [105] 张晨露, 贾文敬, 舒正玉. 阿魏酸酯酶的研究进展 [J]. 生物化工, 2023, 9(01): 192-198.
- [106] DOGARIS I, PYLYPCHUK I, HENRIKSSON G, et al. Polyelectrolyte complexes based on a novel and sustainable hemicellulose-rich lignosulphonate for drug delivery applications [J]. Drug Delivery and Translational Research, 2024, 14(12): 3452-3466.
- [107] MA J H, BASIT R A, YUAN S H, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of recombinant feruloyl esterase BpFae^{T132C-D143C} [J]. Folia Microbiologica, 2024, 70(2): 441-454.
- [108] DE MATTOS P B G, VANDENBERGHE L P D, VALLADARES-DIESTRA K K, et al. Recent developments in xylooligosaccharides: Sustainable production, characterization, beneficial properties and applications [J]. Food Research International, 2024, 197: 115206.
- [109] SHEMESH P, FISHMAN A. Optimal fermentation conditions for growth and recombinant protein production in *Pichia pastoris*: Strain selection, ploidy level and carbon source [J]. Current Research in Food Science, 2024, 9: 100840.
- [110] SINZINGER K, OBST U, GÜNER S, et al. The *Pichia pastoris* enzyme production platform: From combinatorial library screening to bench-top fermentation on residual cyanobacterial biomass [J]. Journal of Bioresources and Bioproducts, 2024, 9(1): 43-57.
- [111] HWANG Y, NOH M H, JUNG G Y. Recent advancements in flavonoid production through engineering microbial systems [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2024, 29(5): 792-805.
- [112] ITAKORODE B O, ITAKORODE D I, TORIMIRO N, et al. Kinetic and thermodynamic investigation of Rhodanese synthesized by enhanced *Klebsiella oxytoca* JCM 1665 strain: a comparative between the free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2024, 54(10): 1275-1284.

- [113]周平发, 崔细鹏, 谢志恒, 等. 饲用木聚糖酶的酶学性质研究 [J]. 广东饲料, 2013, 22(09): 23-25.
- [114]VILLEGAS-AGUILAR M D, SÁNCHEZ-MARZO N, FERNANDEZ-OCHOA A, et al. Evaluation of Bioactive Effects of Five Plant Extracts with Different Phenolic Compositions against Different Therapeutic Targets [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(2):217.
- [115]GUO L, DONG Y X, ZHANG D Y, et al. Mining versatile feruloyl esterases: phylogenetic classification, structural features, and deep learning model [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2025, 12(1): 101.
- [116]WEN N, WAN G Z, SUN K, et al. α -Glucosidase immobilization on the metal-organic framework composite membrane for enzyme inhibitor screening [J]. *New Journal of Chemistry*, 2024, 48(25): 11496-11505.
- [117]SHI Q C, MA J, ABDEL-HAMID A M, et al. Mining of latent feruloyl esterase resources in rumen and insight into dual-functional feruloyl esterase-xylanase from *Pecoramyces ruminantium* F1 [J]. *Bioresource Technology*, 2025, 418: 131854.
- [118]WANG Q Y, LIU X J, HOU Y H, et al. Characterization of heat- and alkali-resistant feruloyl esterase from *Humicola insolens* and application in the production of high-strength kraft straws [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 283: 137742.
- [119]WANG H L, QI X H, GAO S, et al. Characterization of a novel multifunctional 8-glucosidase/xylanase/ feruloyl esterase and its effects on improving the quality of Longjing tea [J]. *Food Chemistry*, 2024, 453: 139637.
- [120]CEASER R, CHIMPHANGO A F A. A strategy for co-extracting hydroxycinnamic acids with hemicellulose, cellulose and lignin from wheat residues in an integrated biorefinery [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 290: 138925.
- [121]FAJARDO J, NELSON R, MITCHELL-LAWSON G, et al. Interactions between *Fusarium graminearum* and hydroxycinnamic acids from cereal crops [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2024, 11(9): 27.
- [122]KLEMANSKA A, DWYER K, WALSH G. Truncation of a novel C-terminal domain of a β -glucanase improves its thermal stability and specific activity [J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(8): e2400245.
- [123]GONG X L, YE K X, XU M Q, et al. Heavy chain variants affect light and heavy chains assembly of monoclonal antibody expressed by *Pichia pastoris* [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2025, 7(2): 128.
- [124]SEARS I B, O'CONNOR J, ROSSANESE O W, et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* [J]. *Yeast* (Chichester, England), 1998, 14(8): 783-790.
- [125]SARETT L H, PATCHETT A A, STEELMAN S L. The effects of structural alteration on the anti-inflammatory properties of hydrocortisone [J]. *Fortschritte der Arzneimittelforschung Progress in drug research Progres des recherches pharmaceutiques*, 1963, 5: 11-153.
- [126]YANG L, YAN S L, ZHANG Y H, et al. Novel enzyme formulations for improved pharmacokinetic properties and anti-inflammatory efficacies [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 537(1-2): 268-277.
- [127]MATTALIA G, MARCHETTI E. 2-Aminoalkyl-4,5-diphenyloxazoles with anti-inflammatory and analgesic activities [J]. *Il Farmaco; edizione scientifica*, 1971, 26(6): 512-519.

- [128]HERNÁNDEZ-ESPINOZA A B, PIÑÓN-MUÑOZ M I, RASCÓN-CHU A, et al. Lycopene/Arabinoxylan Gels: Rheological and Controlled Release Characteristics [J]. *Molecules*, 2012, 17(3): 2428-2436.
- [129]ZHANG B, XIE X, ZHU H, et al. Solid-state fermentation by *S. cerevisiae* with high resistance to ferulic acid improves the physicochemical properties of wheat bran and quality of bran-rich Chinese steamed bread [J]. *Journal of Food Science*, 2024, 89(2): 954-965.
- [130]NISHITSUJI Y, WHITNEY K, HAYAKAWA K, et al. Dynamic changes in ferulic acid and diferulic acids in wheat flour doughs during the breadmaking process [J]. *Food Chemistry*, 2024, 443: 138524.
- [131]BILAL M, LI D, XIE C, et al. Recent advances of wheat bran arabinoxylan exploitation as the functional dough additive [J]. *Food Chemistry*, 2025, 463:141146.
- [132]RUDJITO R C, MATUTE A C, JIMENEZ-QUERO A, et al. Integration of subcritical water extraction and treatment with xylanases and feruloyl esterases maximises release of feruloylated arabinoxylans from wheat bran [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395:130387.
- [133]LIU S-C, XIN X, HE Z-J, et al. Biological conversion of lignin-derived ferulic acid from wheat bran into vanillin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 281(3): 56.
- [134]FRANCO D G, DE ALMEIDA A P, GALEANO R M S, et al. Exploring the potential of a new thermotolerant xylanase from *Rasamsonia composticola* (XylRc): production using agro-residues, biochemical studies, and application to sugarcane bagasse saccharification [J]. *3 Biotech*, 2024, 14: 3.
- [135]曾雯, 周胜强, 黄佳, 等. 黄芪免疫调节活性成分及其药理作用进展[J]. *上海中医药杂志*, 2025, 59(01): 80-88.
- [136]韩基红. 黄芪多糖的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*. 2017, 17(20): 93+97.
- [137]李树颖, 秦雪梅, 李科. 黄芪多糖免疫调节作用及其机制研究进展 [J]. *山西医科大学学报*. 2019, 50(05): 685-689.
- [138]王玥, 杨志国, 王艳华, 等. 黄芪多糖与人参多糖免疫调节作用的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(03): 891-897.
- [139]杨志霞, 王琦. 黄芪多糖免疫作用的基础与临床研究进展 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(07): 833-836.
- [140]周悦芳, 范培红. 中药免疫调节作用研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(01): 204-207.

攻读学位期间发表的学术论文目录

- [1]韩红祥, 郭成城, 魏胜华等. 土曲霉阿魏酸酯酶异源表达、酶学性质及在阿魏酸制备中的应用[J]. 食品科学 (已录用)

致谢

首先,非常感谢李老师这三年来对我的悉心教导和照顾。无论是学业还是生活,李老师都给予了我莫大的关心,也正是因为如此,我在这三年收获了很多。在能力培养和人生观的塑造方面,我有了很大的进步。

其次我也非常感谢我的父母,正是他们,我才能够没有后顾之忧地读研,不用操心经济上的问题。尽管我有时候很叛逆,我们也曾闹过矛盾,但随着年龄的增长,我也渐渐意识到了父母的不易,他们已经在能力范围内给了我最好的,所以我非常感谢父母这些年来对我的付出。

我也想感谢我的师姐和师弟们,在我的读研生活中,正是有了你们的帮助,我的课题才能够顺利地进行下去,并且在生活中也给了我很多关心。感谢我的师弟郭成城和高碧云师妹以及我的室友孙佳成、吴坤伟、孙武,在我遭遇挫折的时候,给予我关心和帮助。我们共同度过了许多难忘的时光,在探讨学术问题、交流研究心得的过程中,我们相互启发、共同进步。正是你们的陪伴和支持让我在研究的道路上不再孤单。在研究过程中,我也遇到了不少挑战和困难。有时实验数据不尽如人意,有时研究思路陷入困境。但正是这些挑战让我学会了如何面对困难、克服困难。

再次感谢所有给予我帮助和支持的人。你们是我人生道路上的重要伙伴,也是我学术生涯中的宝贵财富。我会将这份感激之情铭记于心,继续前行。