DOI:10.12441/spyswjs.20230215007 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0033-10

阿魏酸酯酶和木聚糖酶在大肠杆菌中共表达高效制备阿魏酸

兰佳鑫[1,2,3] 李诚昊[1,2,3] 姬淑洁[1,2,3] 李晓敏[1,2,3*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现阿魏酸酯酶(feruloyl esterases,Fae)和木聚糖酶(xylanase,Xyn)在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)中的高效分泌表达。【方法】从7种信号肽中筛选出适于中国荷斯坦奶牛瘤胃宏基因组来源的Fae和骆驼瘤胃宏基因组来源的β-1,4-内切木聚糖酶在大肠杆菌中分泌表达的信号肽,并构建相应的大肠杆菌工程菌,通过对发酵条件的优化实现2种酶的高效分泌表达。进一步以脱淀粉麦麸(de-starched wheat bran, DSWB)为底物发酵制备阿魏酸,确定了最佳发酵工程菌及最佳发酵条件。【结果】摇瓶发酵48 h,阿魏酸产量和释放率分别达314.1 mg/L和90.0%。【结论】以共表达Fae与Xyn的大肠杆菌工程菌发酵制备阿魏酸,为提高阿魏酸的快速高效生产提供了依据。

关键词:阿魏酸酯酶;木聚糖酶;分泌表达;信号肽;阿魏酸

Efficient Production of Ferulic Acid by Co-expression of Feruloyl Esterase and Xylanase in *Escherichia coli*

LAN Jiaxin[1,2,3] *LI Chenghao*[1,2,3] *JI Shujie*[1,2,3] *LI Xiaomin*[1,2,3*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to develop an efficiently secretory expression system for feruloyl esterase (Fae) and xylanase (Xyn) in *Escherichia coli* (*E. coli*). [**Method**] The optimal signal peptides for the secretory expression of Fae and β-1,4-endoxylanase in *E. coli* were screened out from 7 signal peptides. The genes *fae* and *xyn* were from the rumen metagenomes of China Holstein cow and camel, respectively. *E. coli* strains expressing Fae and Xyn were constructed, and their fermentation conditions were optimized for efficient expression and secretion of the two enzymes. Furthermore, ferulic acid was prepared by fermentation with de-starched wheat bran (DSWB) as the substrate. The best performed strain and the optimal production process were then determined. [**Result**] The yield and release rate of ferulic acid reached 314.1 mg/L and 90.0%, respectively, after shake flask fermentation for 48 h. [**Conclusion**] The engineered *E. coli* strain co-expressing Fae and Xyn was constructed for ferulic acid production, establishing a theoretical foundation to achieve rapid and high-efficiency biosynthesis of this compound.

Keywords: feruloyl esterase; xylanase; secretory expression; signal peptide; ferulic acid

---

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31701730);云南省烟草化学重点实验室开放课题(2019539200340162)。

通信作者:李晓敏(1984—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品微生物、食品安全与控制研究。E-mail:xiaomin@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-02-15 **修回日期:**2023-04-12

阿魏酸具有优异的抗氧化性能[1]，可保护DNA及细胞膜免受损害，同时阿魏酸还具有抗菌、抗炎、抗衰老、抗糖尿病及神经保护作用[2]。目前，阿魏酸作为防晒剂、抗氧化剂和食品防腐剂广泛应用于化妆品、医药产品及食品的生产过程[3]。阿魏酸广泛存在于谷物、水果、蔬菜等农作物及其加工过程产生的副产物中[4]，如小麦麦麸中阿魏酸质量分数为4~6 mg/g[5]，是可持续生产阿魏酸的天然经济原料。在植物细胞壁中，阿魏酸主要以结合态形式存在于木质纤维素基质中，即通过酯键与多糖交联形成复杂的“网格结构”[6]。

目前，通常采用碱解法及生物酶解法从木质纤维素基质中获得阿魏酸。碱解法首先在强碱作用下破坏酯键以释放阿魏酸，再经过酸化及乙醇提取获得阿魏酸，整个过程往往造成环境污染并易导致阿魏酸结构破坏[7]，因此酶解法制备阿魏酸已经成为主要的研究方向。Fae可水解阿魏酸和多糖之间的酯键，可用于从农业副产物（如DSWB[8]、玉米秸秆[9]、甘蔗渣[10]等）中提取阿魏酸。然而，由于木质纤维素结构复杂，Fae单独使用时作用较小。研究表明，Xyn可裂解木聚糖主链生成阿魏酰低聚木糖，使Fae更易与之结合并释放阿魏酸；同时Fae释放阿魏酸可降低木聚糖交联度，使其更易被Xyn水解[11]。因此，利用Fae和Xyn的协同效应可显著提高水解农业副产物制备阿魏酸的效率[9,12]。通过重组表达Fae和Xyn的工程菌来发酵农业副产物的微生物转化法，可减少酶的纯化过程，在提高生产效率的同时降低成本，具有很大的应用潜力。

大肠杆菌培养简单、操作方便，且不存在阿魏酸代谢途径，是以农业副产物为底物生产阿魏酸的理想菌株。由于大分子木质纤维素不易穿过细胞壁与胞内酶结合进行深度水解，重组Fae和Xyn的分泌表达对于改善底物中木质纤维素的可及性、提高阿魏酸的释放率均有显著优势。但由于大肠杆菌存在双层膜结构，重组蛋白往往在细胞内积累而难以分泌到细胞外。信号肽对分泌蛋白质的有效表达和细胞定位有重要作用，且每个重组蛋白均需筛选其最适的信号肽[13]。中国荷斯坦奶牛瘤胃宏基因组来源的基因*fae*编码的Fae具有较高的热稳定性和pH稳定性[14]；在骆驼瘤胃宏基因组来源的多功能Xyn中，基因*xylCM5*编码的β-1，4-内切木聚糖酶XylC对燕麦木聚糖具有显著的催化活性，该酶包含木聚糖酶结构域、多糖结合模块（CBM）和碳水化合物酯酶结构域（CE）[15]。Wu等[16]基于黑曲霉BE-2来源的Xyn与Fae的协同作用，从DSWB中最高释放70%的阿魏酸。Deng等[17]从发酵粘液乳杆菌JN248中克隆出6种Fae，其中LFFae1432联合Xyn可使DSWB释放出67.2%的阿魏酸。Wang等[18]构建的分泌Xyn/Fae双功能酶的工程大肠杆菌，可从200 mg DSWB中最多释放474 μg阿魏酸（产量为2.37 mg/g）。作者选择*fae*、*xyn*这2个基因构建重组菌，并从7种信号肽中分别筛选出其在大肠杆菌细胞中高效分泌的最适信号肽。旨在构建可高效降解麦麸释放阿魏酸的工程菌，为阿魏酸的快速高效生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用的信号肽、质粒和菌株信息见表1，所用引物见表2。利用*E. coli* JM109和*E. coli* BL21（DE3）进行常规的基因克隆和基因表达。基因*fae*来源于中国荷斯坦奶牛瘤胃宏基因组（GenBank：HQ338149.1），基因*xyn*来源于骆驼瘤胃宏基因组的*xylCM5*（GenBank：KX644152.1）第82~1 311位碱基序列（编码Xyn与CBM的结构域）。密码子优化后的*fae*、*xyn*基因及引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

限制性内切酶、T4 DNA连接酶：大连TaKaRa公司；2×KeyPo Master Mix、2×Rapid Taq Master Mix、质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷（IPTG）、氨苄青霉素（Amp）：上海生工生物工程股份有限公司；阿魏酸标准品、阿魏酸甲酯标准品、小麦阿拉伯木聚糖：美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 载体构建

通过密码子优化合成*fae*、*xyn*基因，分别以引物F-*Eco*R I-*fae*、R-*Hin*d III-*fae*及F-*Eco*R I-*xyn*、R-*Hin*d III-*xyn*对*fae*、*xyn*进行PCR扩增。扩增产物经*Eco*R I、*Hin*d III双酶切后用T4 DNA连接酶

表1　信号肽、质粒和菌株

Table 1　Signal peptides, plasmids and strains

	信号肽/质粒/菌株	特征	来源
信号肽	SP1	MEGNTREDNFKHLLGNDNVK	碱性纤维素酶，*Bacillus* sp.[19]
	SP2	MSRITIERDGLTLVGDREEP	Fae，*Lactobacillus amylovorus*[20]
	SP3	MSRVTIERDGLTLVGDREEP	Fae，*Lactobacillus crispatus*[21]
	SP4	MSRITIERDSLTLVGDREEP	Fae，*Lactobacillus helveticus*[20]
	SP5	MEITIKRDGLKLYGLLEGT	Fae，*Lactobacillus reuteri*[20]
	pelB	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	pET22b(+)
	OsmY	GeneBank：CP060121.1	*E. coli* BL21[22]
质粒	pET22b(+)	Amp^r	作者所在实验室
	pETDuet-1	Amp^r	作者所在实验室
	pET22b-pelB-*fae*	Amp^r，携带pelB和*fae*的pET22b(+)质粒	本研究
	pETDuet-SP1-*fae*	Amp^r，携带SP1和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP2-*fae*	Amp^r，携带SP2和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP3-*fae*	Amp^r，携带SP3和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP4-*fae*	Amp^r，携带SP4和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP5-*fae*	Amp^r，携带SP5和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-*osmY*-*fae*	Amp^r，携带*osmY*和*fae*的pETDuet质粒	本研究
	pET22b-pelB-*xyn*	Amp^r，携带pelB和*xyn*的pET22b(+)质粒	本研究
	pETDuet-SP1-*xyn*	Amp^r，携带SP1和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP2-*xyn*	Amp^r，携带SP2和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP3-*xyn*	Amp^r，携带SP3和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP4-*xyn*	Amp^r，携带SP4和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP5-*xyn*	Amp^r，携带SP5和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-*osmY*-*xyn*	Amp^r，携带*osmY*和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
	pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*	Amp^r，携带SP1、*fae*、SP4和*xyn*的pETDuet质粒	本研究
菌株	JM109	*E. coli*，基因克隆	作者所在实验室
	BL21(DE3)	*E. coli*，基因表达	作者所在实验室
	E. coli pelB-F	含有pET22b-pelB-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP1-F	含有pETDuet-SP1-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP2-F	含有pETDuet-SP2-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP3-F	含有pETDuet-SP3-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP4-F	含有pETDuet-SP4-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP5-F	含有pETDuet-SP5-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli OsmY-F	含有pETDuet-*osmY*-*fae*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli pelB-X	含有pET22b-pelB-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP1-X	含有pETDuet-SP1-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP2-X	含有pETDuet-SP2-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP3-X	含有pETDuet-SP3-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP4-X	含有pETDuet-SP4-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP5-X	含有pETDuet-SP5-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli OsmY-X	含有pETDuet-*osmY*-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究
	E. coli SP1-F-SP4-X	含有pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*的*E. coli* BL21(DE3)	本研究

分别连接至pET22b(+)载体，获得重组质粒pET22b-pelB-*fae*和pET22b-pelB-*xyn*。以pET22b-pelB-*fae*为模板，通过融合PCR在*fae*基因5′端添加信号肽。PCR产物经*Nde* I、*Xho* I双酶切后构建至pETDuet-1载体，获得重组质粒pETDuet-SP1-*fae*、pETDuet-SP2-*fae*、pETDuet-SP3-*fae*、pETDuet-

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

引物名称	引物序列（5′—3′）
F-*Eco*R I-*fae*	CATGAATTCGGCTCGTCTGCAG
R-*Hin*d III-*fae*	GCTAAGCTTTTAACCGAACATCC
F- *Eco*R I-*xyn*	CACGAATTCGGCTACCACCATCACCGAAAAC
R-*Hin*d III-*xyn*	GCTAAGCTTACCAGAGTTAGAACCAGCACCAG
F1-*Bgl* II-*fae*	GGTAACGACAACGTTAAAAGATCTGCTCGTCTGCAG
F1-2	GAAGACAACTTCAAACACCTGCTGGGTAACGACAAC
F1-*Nde* I	GCTCATATGGAAGGTAACACCCGTGAAGACAACTTC
F2-*Bgl* II-*fae*	GGTGACCGTGAAGAACCGAGATCTGCTCGTCTGCAG
F2-2	GAACGTGACGGTCTGACCCTGGTTGGTGACCGTGAAG
F2-*Nde* I	GCTCATATGTCTCGTATCACCATCGAACGTGACGGTC
F3-*Nde* I	GCTCATATGTCTCGTGTTACCATCGAACGTGACGGTC
F4-2	GAACGTGACTCTCTGACCCTGGTTGGTGACCGTGAAG
F4-*Nde* I	GCTCATATGTCTCGTATCACCATCGAACGTGACTCTC
F5-*Bgl* II-*fae*	GTCTGCTGGAAGGTACCAGATCTGCTCGTCTGCAG
F5-2	ACGTGACGGTCTGAAACTGTACGGTCTGCTGGAAGG
F5-*Nde* I	GCTCATATGGAAATCACCATCAAACGTGACGGTCTG
R-*Xho* I-*fae*	CATCTCGAGACCGAACATCCATTCAACAACTTTAGC
F-*Bgl* II-*xyn*	CACAGATCTGCTACCACCATCACCGAAAAC
R-*Xho* I-*xyn*	CATCTCGAGACCAGAGTTAGAACCAGCACCAG
F-*Nde* I-*osmY*	GCTCATATGACTATGACAAGACTGAAGATTTCG
R-*osmY*-3GS	AGAACCAGAACCAGAACCCTTAGTTTTCAGATCA
F-3GS-*fae*	GGTTCTGGTTCTGGTTCTGCTCGTCTGCAGATC
F-3GS-*xyn*	GGTTCTGGTTCTGGTTCTGCTACCACCATCACCG
F1-*Nco* I	CATCCATGGAAGGTAACACCCG
R-*Eco*R I-*fae*	GCTGAATTCTTAACCGAACATCC

注：下划线为酶切位点。

SP4-*fae*、pETDuet-SP5-*fae*。以 pET22b-pelB-*xyn* 为模板，利用引物 F-*Bgl* II-*xyn*、R-*Xho* I-*xyn* 进行 PCR 扩增，扩增产物经 *Bgl* II、*Xho* I 双酶切后分别构建至 pETDuet-SP1-*fae*、pETDuet-SP2-*fae*、pETDuet-SP3-*fae*、pETDuet-SP4-*fae*、pETDuet-SP5-*fae* 载体，获得 5′端添加信号肽的重组质粒 pETDuet-SP1-*xyn*、pETDuet-SP2-*xyn*、pETDuet-SP3-*xyn*、pETDuet-SP4-*xyn*、pETDuet-SP5-*xyn*。

通过引物 F-*Nde* I-*osmY*、R-*osmY*-3GS 从 *E. coli* BL21（DE3）基因组扩增 *osmY* 基因，分别与引物 F-3GS-*fae*、R-*Xho* I-*fae* 扩增的 *fae* 片段及 F-3GS-*xyn*、R-*Xho* I-*xyn* 扩增的 *xyn* 片段进行融合 PCR。PCR 产物经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切后连入 pETDuet-1 载体，获得重组质粒 pETDuet-*osmY*-*fae*、pETDuet-*osmY*-*xyn*，其中 *osmY* 与 *fae*、*xyn* 间通过柔性肽（GSGSGS）序列相连。以 pETDuet-SP1-*fae* 为模板，并利用引物 F1-*Nco* I、R-*Eco*R I-*fae* 扩增含 SP1 信号肽的 *fae* 基因，产物经 *Nco* I、*Eco*R I 双酶切后连入 pETDuet-SP4-*xyn* 载体，获得重组质粒 pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*。将各重组质粒化学转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞，筛选阳性克隆并测序验证。将构建的重组质粒化学转化至 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，筛选阳性克隆后获得重组大肠杆菌。

1.3 信号肽筛选

挑取活化的重组菌株单菌落，接种至含 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基，于 37 ℃、180 r/min 过夜培养得到种子液。按体积分数 1% 将种子液转接至 50 mL 含 Amp 的 LB 培养基，于 37 ℃、180 r/min 振荡培养 3 h 至菌液 OD_{600} 值为

0.6~0.8。加入IPTG使其终浓度为0.20 mmol/L，于30 ℃、150 r/min诱导培养48 h，每隔12 h取样，分别测定发酵上清液中Fae和Xyn相对酶活力，筛选最适信号肽。

1.4 Fae、Xyn分泌表达条件优化

1.4.1 菌体浓度优化

将重组菌株SP1-F、SP4-X分别活化、培养并检测菌体浓度OD_{600}值，待其分别达到0.5、0.8、1.0、1.5、2.0时，添加IPTG至终浓度为0.20 mmol/L，于30 ℃、150 r/min培养12 h，发酵结束后测定上清液中Fae和Xyn酶活力。

1.4.2 诱导剂浓度及诱导温度优化

1）诱导剂浓度优化：将重组菌株SP1-F、SP4-X活化并培养至菌液OD_{600}值为0.8，添加IPTG至终浓度分别为0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mmol/L，于30 ℃、150 r/min培养12 h，发酵结束后测定上清液中Fae和Xyn酶活力。

2）诱导温度优化：将重组菌株SP1-F、SP4-X活化并培养至菌液OD_{600}值为0.8，添加IPTG至终浓度为0.20 mmol/L，分别于不同温度（16、20、25、30、37 ℃）、150 r/min培养12 h，发酵结束后测定上清液中Fae和Xyn酶活力。

1.4.3 甘氨酸质量浓度优化

将重组菌株SP1-F、SP4-X分别活化并培养至菌液OD_{600}值为0.8，添加IPTG至终浓度为0.20 mmol/L，添加甘氨酸使其终质量浓度分别为2、5、10 g/L，于30 ℃、150 r/min培养12 h，发酵结束后测定上清液中Fae和Xyn酶活力。

1.5 阿魏酸的制备及工程菌的发酵培养

1.5.1 阿魏酸的制备

按Xu等[21]的方法制备DSWB，其阿魏酸质量浓度通过碱提取法测定[23]。以DSWB为底物，分别利用构建的大肠杆菌工程菌SP1-F、SP4-X及SP1-F-SP4-X发酵培养制备阿魏酸，并以空白大肠杆菌为对照（CK）。

1.5.2 工程菌的发酵培养

1）按1.3的方法活化菌株，按体积分数1%接种至含质量分数4% DSWB的LB培养基中，于37 ℃、180 r/min培养。

2）按1.4优化的结果，工程菌SP1-F按照Fae的最佳诱导条件培养，即培养至菌液OD_{600}值为2.0时，添加终浓度0.20 mmol/L IPTG和10 g/L甘氨酸，于30 ℃、150 r/min发酵48 h。工程菌SP4-X按照Xyn的最佳诱导条件培养，即培养至菌液OD_{600}值为1.0时，添加终浓度0.50 mmol/L IPTG和10 g/L甘氨酸，并于37 ℃、150 r/min发酵48 h。工程菌SP1-F、SP4-X分别培养至菌液OD_{600}值为2.0时，等体积混合（SP1-F+SP4-X），然后添加终浓度0.20 mmol/L IPTG和10 g/L甘氨酸，于30 ℃、150 r/min发酵48 h。工程菌SP1-F-SP4-X分2批分别按照Fae和Xyn的最佳诱导条件培养（分别为SP1-F-SP4-X1和SP1-F-SP4-X2），含空载体pETDuet1的大肠杆菌BL21（DE3）发酵液作为空白对照（CK），每隔24 h取样测定发酵上清液中阿魏酸和还原糖质量浓度。

1.6 酶活力测定

参照Zhang等[24]的方法测定Fae酶活力。定义37 ℃下1 mg固体酶（或1 mL液体酶）每分钟释放1 μmol/L阿魏酸所需的酶量为1个酶活力单位（U/mg或U/mL）。

采用3,5-二硝基水杨酸（DNS）法[18]测定Xyn酶活力。定义40 ℃下1 mg固体酶（或1 mL液体酶）每分钟释放1 μmol/L还原糖所需的酶量为1个酶活力单位（U/mg或U/mL）。

1.7 阿魏酸质量浓度测定

样品于12 000 *g*离心10 min，收集上清液并与等体积甲醇混匀，经0.22 μm滤膜过滤后进行HPLC分析。参照Duan等[25]的方法，在Agilent1260高效液相色谱仪上，使用ZORBAX Eclipse XDB-C18色谱柱（4.6 mm×150 mm×5 μm）和PDA检测器，建立阿魏酸标准曲线，并计算样品中阿魏酸质量浓度。

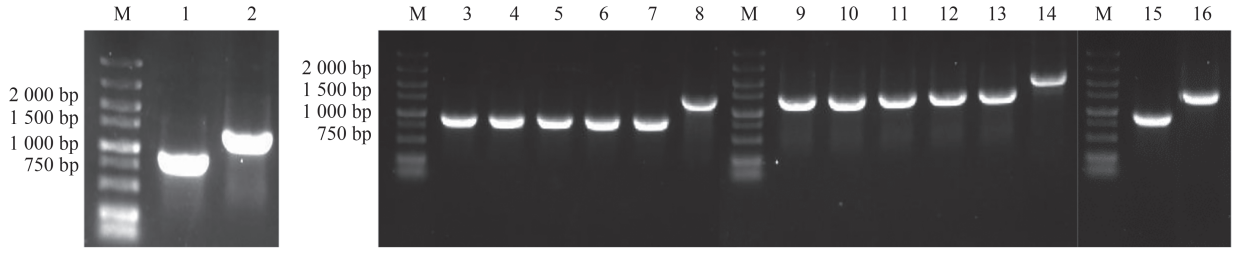
2 结果与讨论

2.1 表达载体构建结果

本研究中的*fae*基因大小为789 bp，*xyn*基因大小为1 230 bp，SP1~SP5信号肽编码序列约60 bp，周质伴侣蛋白基因*osmY*约606 bp。构建了7种SPs-*fae*、7种SPs-*xyn*表达载体和一种双酶表达载体pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*，含有各载体的重组菌株菌落PCR验证结果见图1。可以看出，各PCR产物大小与预期一致。提取各质粒进行测序鉴定，结果表明所有载体均构建成功。

2.2 信号肽筛选结果

为筛选Fae、Xyn分泌表达的最适信号肽，将



M—DNA marker；1—构建于pET22b(+)的*fae*片段；2—构建于pET22b(+)的*xyn*片段。

(a) 构建于PET22b(+)的基因片段

M—DNA marker；3~8—分别为含不同信号肽的*fae*片段，即SP1-*fae*、SP2-*fae*、SP3-*fae*、SP4-*fae*、SP5-*fae*、*osmY-fae*；9~14—分别为含不同信号肽的*xyn*片段，即SP1-*xyn*、SP2-*xyn*、SP3-*xyn*、SP4-*xyn*、SP5-*xyn*、*osmY-xyn*；15—双酶表达载体pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*的SP1-*fae*片段；16—双酶表达载体pETDuet-SP1-*fae*-SP4-*xyn*的SP4-*xyn*片段。

(b) 含不同信号肽的基因片段或载体

图 1　表达载体 PCR 验证

Fig. 1　Identification of expression plasmids by PCR

构建的 14 株大肠杆菌工程菌进行诱导培养，并测定重组蛋白的相对酶活力变化，见图 2。SP1-F 经 IPTG 诱导 12 h 时，上清液中 Fae 相对酶活力最高；而融合了其他信号肽的重组 Fae 在诱导表达 12 h 时相对酶活力较低。尽管在表达 24 h 时检测到 SP4-F、SP5-F 和 PelB-F 相对酶活力峰值，但仍明显低于 SP1-F，表明 SP1 是 Fae 分泌表达的最适信号肽。此外，在所有信号肽对应的重组菌中，Fae 相对酶活力均随诱导时间的延长而降低，这可能与胞外蛋白质的稳定性有关。

如图 2(b)所示，除 OsmY-X 外，其他信号肽的重组 Xyn 相对酶活力均随诱导时间的延长而升高(除 SP5-X 在 48 h 比 36 h 稍有下降)。其中 SP4-X 在诱导 48 h 时相对酶活力达到峰值。尽管 SP5-X 比 SP4-X 更快达到相对酶活力峰值，但由于其在 12 h 的相对酶活力仅为 49.3%，而同期 SP4-X 的相对酶活力为 61.1%。因此，作者选择 SP4 作为 Xyn 分泌表达的最适信号肽，以满足阿魏酸快速生产的需求。

采用 SDS-PAGE 对诱导 12 h 的 Fae 工程菌以及诱导 48 h 的 Xyn 工程菌上清液中的可溶性蛋白质进行检测，结果见图 3。在 Fae 工程菌上清液中均检测到相对分子质量约 33 000 的蛋白质条带，与目的蛋白质的理论相对分子质量一致，其中 SP1-F 条带最深，进一步证明 SP1 是该酶分泌表达的最适信号肽。在 Xyn 工程菌上清液中均检测到相对分子质量约 45 000 的蛋白质条带，其中 SP4-X、SP5-X 条带较深，与其相对酶活力较高的结果一致。综合考虑 12 h 时 SP4-X 相对酶活力更高，选择 SP4 作为 Xyn 分泌表达的最适信号肽。

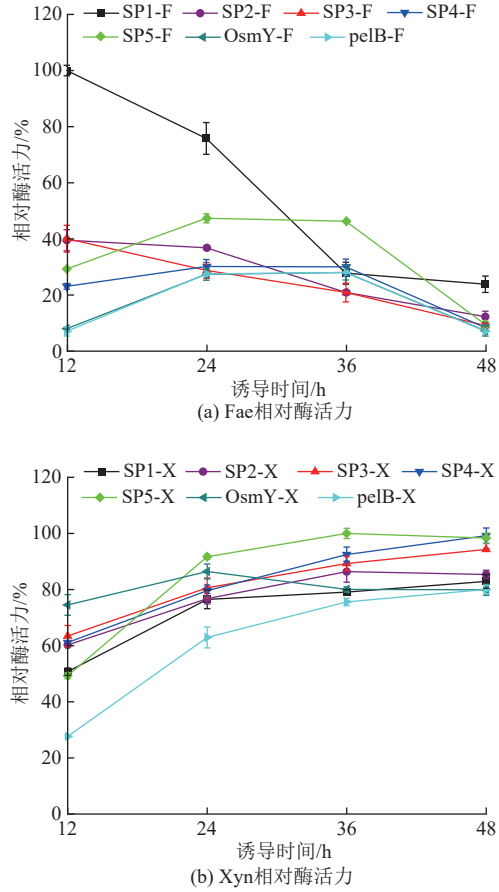
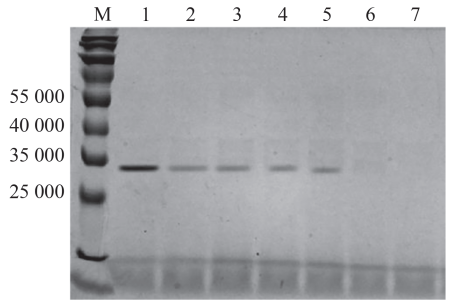


图 2　信号肽对 Xyn、Fae 相对酶活力的影响

Fig. 2　Effects of signal peptides on relative enzyme activities of Xyn and Fae

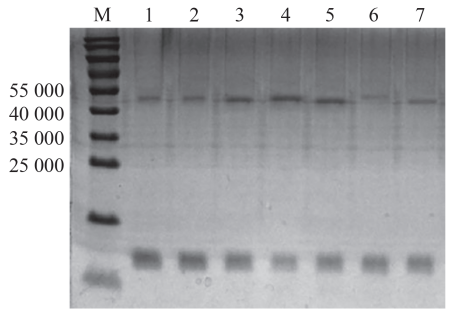
2.3　Fae、Xyn 分泌表达条件优化

尽管信号肽可实现重组 Fae、Xyn 在大肠杆菌中的分泌表达，但其相对酶活力仍处于较低水平。



M—标准蛋白质；1—SP1-F；2—SP2-F；3—SP3-F；4—SP4-F；5—SP5-F；6—OsmY-F；7—pelB-F。

(a) Fae表达菌株分泌情况



M—标准蛋白质；1—SP1-X；2—SP2-X；3—SP3-X；4—SP4-X；5—SP5-X；6—OsmY-X；7—pelB-X。

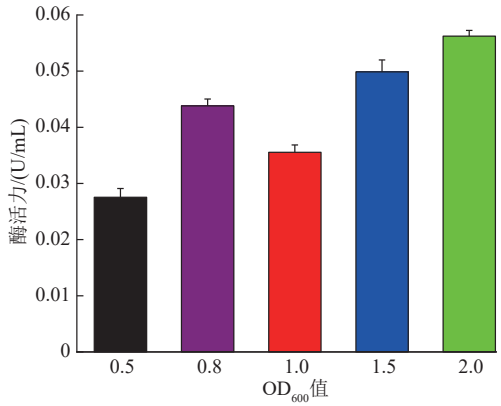
(b) Xyn表达菌株分泌情况

图 3　SDS-PAGE 分析重组蛋白的分泌表达

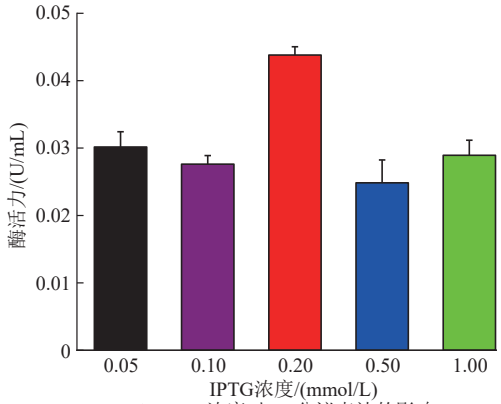
Fig. 3　SDS-PAGE results of secretory expression of recombinant protein

为进一步提高Fae与Xyn的胞外表达水平，通过单因素试验分别对SP1-F、SP4-X的诱导条件（起始菌体浓度、诱导剂IPTG浓度、诱导温度、甘氨酸质量浓度）进行优化，见图4~5。甘氨酸质量浓度对Fae、Xyn分泌表达均有明显促进作用，温度与IPTG浓度也可影响Fae的表达，其他条件对重组蛋白的分泌表达影响较小。研究表明，甘氨酸可破坏大肠杆菌外膜完整性并改善细胞膜通透性，增强胞外蛋白质的释放效率[26]。

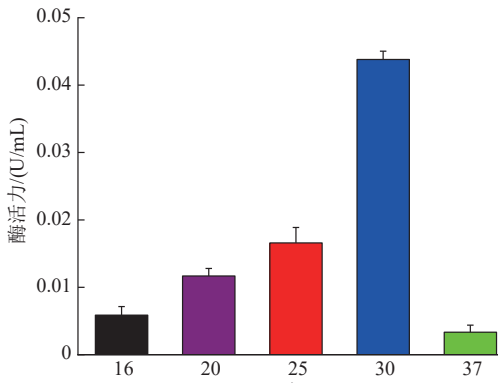
最终确定SP1-F的最佳诱导条件为：诱导起始菌液OD_{600}值2.0、IPTG浓度0.20 mmol/L、甘氨酸质量浓度10 g/L、诱导温度30 ℃。在此条件下，SP1-F胞外Fae酶活力达0.840 U/mL，是优化前（0.043 U/mL）的19.5倍。SP4-X的最佳诱导条件为：起始菌液OD_{600}值1.0、IPTG浓度0.50 mmol/L、甘氨酸质量浓度10 g/L、诱导温度37 ℃。在此条件下，SP4-X胞外Xyn酶活力达0.620 U/mL，是优



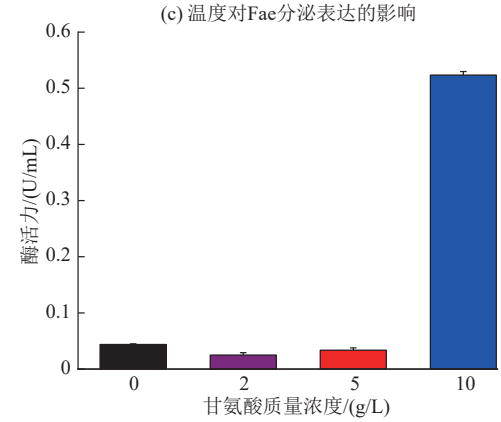
(a) 诱导起始菌体浓度对Fae分泌表达的影响



(b) IPTG浓度对Fae分泌表达的影响



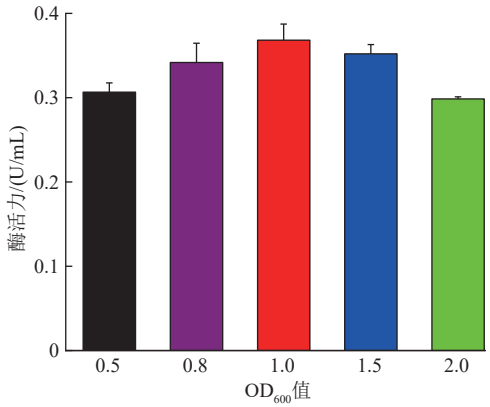
(c) 温度对Fae分泌表达的影响



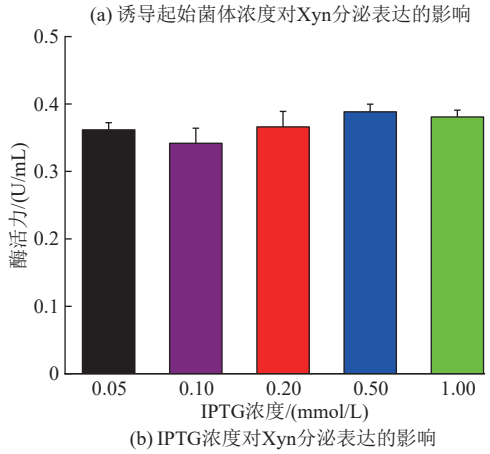
甘氨酸质量浓度对Fae分泌表达的影响

图 4　各因素对Fae分泌表达的影响

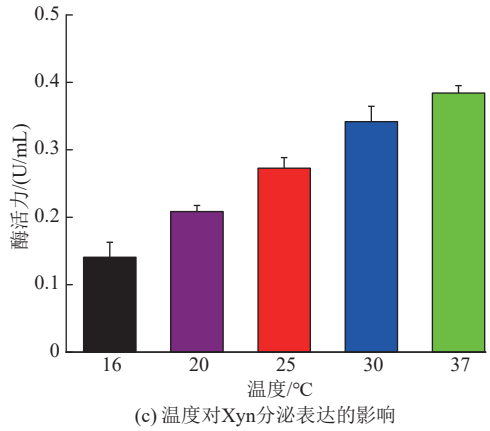
Fig. 4　Effects of factors on Fae secretion and expression



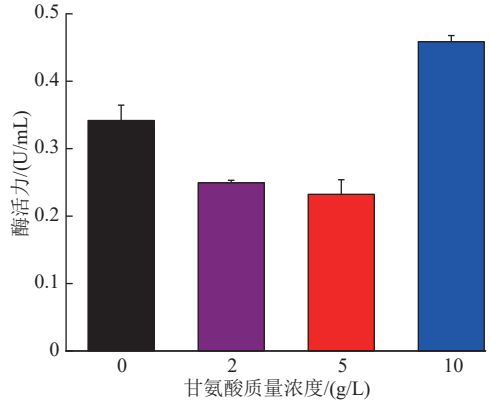
(a) 诱导起始菌体浓度对Xyn分泌表达的影响



(b) IPTG浓度对Xyn分泌表达的影响



(c) 温度对Xyn分泌表达的影响



甘氨酸质量浓度对Xyn分泌表达的影响

图 5　各因素对 Xyn 分泌表达的影响

Fig. 5　Effects of factors on Xyn secretion and expression

化前（0.340 U/mL）的 1.8 倍。尽管 SP4-X 的优化效果弱于 SP1-F，但根据 SP4-X 表达规律推测，随发酵时间的延长，胞外 Xyn 可以进一步积累，发酵液中 Xyn 酶活力可以得到进一步提升。

2.4　大肠杆菌工程菌利用 DSWB 制备阿魏酸

作者制备的 DSWB 中阿魏酸质量分数为 3.49 mg/g。将其以质量分数 4% 添加至各工程菌发酵培养基，诱导发酵 48 h 后阿魏酸释放结果见表 3。SP4-X 与 CK 均无法有效释放 DSWB 中的阿魏酸；SP1-F 的阿魏酸产量为 1.64 mg/g，释放率为 47.0%，表明单一 Fae 对 DSWB 水解作用有限；当 SP1-F-SP4-X 在 Xyn 最优分泌表达条件下发酵（即 SP1-F-SP4-X2），阿魏酸产量升高至 2.40 mg/g，但阿魏酸释放率仅升高至 68.8%；当 SP1-F-SP4-X 在 Fae 最优分泌表达条件下（即 SP1-F-SP4-X1），发酵 24 h 阿魏酸产量可达 2.70 mg/g，发酵 48 h 阿魏酸产量高达 3.18 mg/g，阿魏酸释放率高达 91.1%，发酵液中阿魏酸质量浓度达 127.20 mg/L。另外，混菌发酵组 SP1-F+SP4-X 产量略低于 SP1-F-SP4-X1 单菌发酵组。曾妍等[27]发现单独使用纤维素酶水解麦麸不产生阿魏酸，与 Fae 同时作用时才能释放阿魏酸。以上结果表明 Fae 是水解 DSWB 释放阿魏酸的关键酶，而 Xyn 的添加有助于进一步提高阿魏酸的释放效率。

为进一步提高阿魏酸产量，分别用含质量分数 8%、10% DSWB 的 LB 培养基发酵工程菌 SP1-F-SP4-X，结果显示，尽管阿魏酸释放率（分别为 92.0%、90.0%）基本不变，但增加培养基中 DSWB 的质量分数可进一步提高阿魏酸产量，在 48 h 时发酵液中阿魏酸质量浓度分别达 256.8、314.1 mg/L。

另外，各工程菌发酵上清液的还原糖质量浓度见表 3。Fae 单独作用时无法释放还原糖；Xyn 可有效释放还原糖，且与 Fae 复合时，可以更高效地水解并释放出 DSWB 中的还原糖。在含质量分数 10% DSWB 的 LB 培养基中，SP1-F-SP4-X 发酵 48 h 后，还原糖质量浓度高达 4 023.4 mg/L。表明该菌株可作为优秀的候选菌株，在高效水解麦麸生产还原糖（木糖/低聚木糖）方面具有应用潜能。

表3　重组菌株发酵DSWB释放阿魏酸及还原糖

Table 3　Release of ferulic acid and reducing sugars by recombinant strains during fermentation with DSWB

菌株	DSWB质量分数/%	发酵48 h阿魏酸释放率/%	阿魏酸质量浓度(mg/L)		还原糖质量浓度(mg/L)	
			24 h	48 h	24 h	48 h
CK	4	0	—	—	—	—
SP1-F	4	47.0	51.4	65.6	—	—
SP4-X	4	0	—	—	1 156.0	1 531.3
SP1-F+SP4-X	4	87.5	97.8	122.2	1 381.6	1 643.6
SP1-F-SP4-X1	4	91.1	108.2	127.2	1 396.2	1 681.4
SP1-F-SP4-X2	4	68.8	49.2	96.0	1 636.4	1 966.7
SP1-F-SP4-X	8	92.0	195.7	256.8	2 627.2	3 573.1
SP1-F-SP4-X	10	90.0	227.8	314.1	3 137.7	4 023.4

注：“—”表示未检出。

3　结论

阿魏酸作为功能性成分已广泛用于化妆品、医药及食品行业。麦麸作为其天然来源，具有安全性高、价格低廉、来源广泛的特点，是生产阿魏酸的优良底物。该研究通过信号肽筛选、重组表达载体构建及发酵条件优化，实现了Fae及Xyn在大肠杆菌中的高效分泌表达，酶活力分别达0.840 U/mL和0.620 U/mL。进一步将大肠杆菌工程菌应用于水解麦麸制备阿魏酸，在含质量分数10% DSWB的LB培养基发酵48 h后，阿魏酸产量达314.1 mg/L，释放率达90.0%。该研究为实现阿魏酸的绿色高效生产提供了科学依据。

参考文献

[1] BENTO-SILVA A，PATTO M C，ROSÁRIO BRONZE M. Relevance，structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls[J]. Food Chemistry，2018，246：360-378.

[2] DE PAIVA L B，GOLDBECK R，DOS SANTOS W D，et al. Ferulic acid and derivatives：molecules with potential application in the pharmaceutical field[J]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences，2013，49(3)：395-411.

[3] SHIRAI A，WATANABE T，MATSUKI H. Inactivation of foodborne pathogenic and spoilage micro-organisms using ultraviolet-a light in combination with ferulic acid[J]. Letters in Applied Microbiology，2017，64(2)：96-102.

[4] SHAHIDI F，CHANDRASEKARA A. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities[J]. Phytochemistry Reviews，2010，9(1)：147-170.

[5] GOPALAN N，RODRÍGUEZ-DURAN L V，SAUCEDO-CASTANEDA G，et al. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases：a versatile enzyme for biorefining of biomass[J]. Bioresource Technology，2015，193：534-544.

[6] DE OLIVEIRA D M，FINGER-TEIXEIRA A，MOTA T R，et al. Ferulic acid：a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis[J]. Plant Biotechnology Journal，2015，13(9)：1224-1232.

[7] ROBBINS R J. Phenolic acids in foods：an overview of analytical methodology[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2003，51(10)：2866-2887.

[8] URAJI M，ARIMA J，INOUE Y，et al. Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from *Streptomyces* sp. in the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass[J]. PLoS One，2014，9(8)：e104584.

[9] ZHANG S B，ZHAI H C，WANG L，et al. Expression，purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*[J]. Protein Expression and Purification，2013，92(1)：36-40.

[10] DAMÁSIO A R L，BRAGA C M P，BRENELLI L B，et al. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2013，97(15)：6759-6767.

[11] LONG L K，ZHAO H Y，DING D F，et al. Heterologous expression of two *Aspergillus niger* feruloyl esterases in *Trichoderma reesei* for the production of ferulic acid from wheat bran[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering，2018，41(5)：593-601.

[12] NIETER A，KELLE S，LINKE D，et al. Feruloyl esterases from *Schizophyllum* commune to treat food industry side-streams[J]. Bioresource Technology，2016，220：38-46.

[13] BROCKMEIER U，CASPERS M，FREUDL R，et al. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*：a powerful strategy in optimizing heterologous

protein secretion in gram-positive bacteria[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 362(3): 393-402.

[14] CHENG F S, SHENG J P, CAI T, et al. A protease-insensitive feruloyl esterase from China Holstein cow rumen metagenomic library: expression, characterization, and utilization in ferulic acid release from wheat straw [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(10): 2546-2553.

[15] GHADIKOLAEI K K, NOGHABI K A, ZAHIRI H S. Development of a bifunctional xylanase-cellulase chimera with enhanced activity on rice and barley straws using a modular xylanase and an endoglucanase procured from camel rumen metagenome[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(18): 6929-6939.

[16] WU H L, LI H L, XUE Y, et al. High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 120: 41-48.

[17] DENG H X, JIA P, JIANG J, et al. Expression and characterisation of feruloyl esterases from *Lactobacillus fermentum* JN248 and release of ferulic acid from wheat bran [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 272-277.

[18] WANG R N, YANG J S, JANG J M, et al. Efficient ferulic acid and xylo-oligosaccharides production by a novel multi-modular bifunctional xylanase/feruloyl esterase using agricultural residues as substrates [J]. Bioresource Technology, 2020, 297: 122487.

[19] GAO D F, LUAN Y Q, WANG Q, et al. Construction of cellulose-utilizing *Escherichia coli* based on a secretable cellulase[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 159.

[20] XU Z S, KONG J, ZHANG S S, et al. Comparison of enzyme secretion and ferulic acid production by *Escherichia coli* expressing different *Lactobacillus* feruloyl esterases[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 568716.

[21] XU Z S, WANG T, ZHANG S S. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production [J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121526.

[22] BOKINSKY G, PERALTA-YAHYA P P, GEORGE A, et al. Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli* [J]. PNAS, 2011, 108 (50): 19949-19954.

[23] LONG L K, WU L Q, LIN Q Y, et al. Highly efficient extraction of ferulic acid from cereal brans by a new type A feruloyl esterase from *Eupenicillium parvum* in combination with dilute phosphoric acid pretreatment[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 190(4): 1561-1578.

[24] ZHANG S B, PEI X Q, WU Z L. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 140-147.

[25] DUAN X L, DAI Y W, ZHANG T. Characterization of feruloyl esterase from *Bacillus pumilus* SK52.001 and its application in ferulic acid production from de-starched wheat bran[J]. Foods, 2021, 10(6): 1229.

[26] HE X Y, LI Y, TAO Y H, et al. Discovering and efficiently promoting the extracellular secretory expression of *Thermobacillus* sp. ZCTH02-B1 sucrose phosphorylase in *Escherichia coli* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 532-540.

[27] 曾妍，于皓杰，杨标，等. 阿魏酸酯酶与纤维素酶协同水解麦麸释放阿魏酸的研究[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(4)：379-384.

ZENG Y, YU H J, YANG B, et al. Synergistic effect of feruloyl esterase and cellulase on the release of ferulic acid from wheat bran[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(4): 379-384.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）