

灰绿青霉阿魏酸酯酶的分离纯化和酶学性质研究

徐大伟¹,高兆建^{1*},张铁柱²,杨杰³,王东星¹,杜永凯¹ (1. 徐州工程学院食品(生物)工程学院,江苏徐州 221000;2. 江苏天种牧业股份有限公司,江苏徐州 221100;3. 徐州鸿宇农业科技有限公司,江苏睢宁 221100)

摘要 [目的]研究青霉(*Penicillium glaucum*)XGY36 胞外产阿魏酸酯酶的纯化和酶学性质。[方法]菌株胞外产酶发酵液经硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose DE52 离子交换柱层析、Sephadex-G75 分子筛层析进行纯化,得到纯度较高的酶蛋白,并对其酶学性质进行研究。[结果]从菌株发酵液中分离纯化到电泳纯的阿魏酸酯酶,纯化倍数 6.54,酶活性回收 59.7%。阿魏酸酯酶经 SDS-PAGE 获得 1 个条带,其表现分子量为 36.5 ku。催化底物阿魏酸乙酯的最适反应温度为 50℃,最适 pH 为 5.0。阿魏酸酯酶在 60℃以下和 pH 3.0~7.0 范围内稳定。金属离子 Zn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 对酶有明显的激活作用,而 Pb²⁺、Hg²⁺ 和 Ag⁺ 对阿魏酸酯酶有强烈的抑制作用,Na⁺、K⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 对酶活的影响不大。[结论]青霉阿魏酸酯酶具有潜在的应用价值,适合应用于食品、医药及生物等领域。

关键词 灰绿青霉;阿魏酸酯酶;纯化;酶学性质

中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)15-024-04

Study on Separation, Purification and Enzymatic Properties of Ferulic Acid Esterase from *Penicillium glaucum*
XU Da-wei¹, GAO Zhao-jian^{1*}, ZHANG Tie-zhu² et al (1. College of Food (Biological) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221000; 2. Jiangsu Tianzhong Pasture Farming Co. Ltd., Xuzhou, Jiangsu 221000)
Abstract [Objective] The aim was to study purification and enzymatic properties of feruloyl esterase in the culture solution of *Penicillium glaucum* XGY36. [Method] The feruloyl esterase was obtained in the culture solution of *Penicillium glaucum* XGY36 and was purified to be homogeneous by the steps of ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose DE52 chromatographies, and Sephadex G-75 chromatography. The enzyme protein with high purity was obtained, enzymatic properties were studied. [Result] Purification of about 6.54 fold was achieved with an overall yield of 59.7%. The molecular weight of purified feruloyl esterase was estimated to be about 36.5 ku by SDS-PAGE. The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 50℃ and 5.0, respectively in catalytic reaction of ethyl ferulate. The enzyme activity was stable under 60℃, and with pH range of 3.0~7.0. The activity of feruloyl esterase was highly enhanced by Zn²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺, whereas it was strongly inhibited by the metal ions Pb²⁺, Hg²⁺ and Ag⁺, while Na⁺, K⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Fe²⁺ had no strong effect on feruloyl esterase activity. [Conclusion] Feruloyl esterase has potential applied value and fit to apply in the fields of food, medicine and biology etc..
Key words *Penicillium glaucum*; Ferulic acid esterase; Purification; Enzymatic properties

阿魏酸酯酶(Feruloyl esterase,FAE)^[1],属于羧酸酯水解酶的一个亚类,是一种典型的肉桂酸酯酶。阿魏酸酯酶主要用于破坏阿魏酸与多糖相连的酯键^[2],释放植物细胞壁中的阿魏酸^[1],使剩余的多糖主链易被降解,有效提高了含有大量木质纤维素和阿魏酸的副产品的营养价值^[3],在食品、饲料和造纸等工业中具有较好的应用前景^[4]。目前,几种微生物已被证实能分泌阿魏酸酯酶,主要包括黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[5-6]、链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)^[7]、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)^[8]、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)^[9]、宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)^[10]等。大多数的阿魏酸酯酶是从真菌中分离得到的。不同微生物分泌的阿魏酸酯酶在氨基酸序列、理化性质和催化功能上有所不同^[11]。目前,关于高温稳定的阿魏酸酯酶的纯化和性质的研究则鲜见报道。笔者所在实验室前期从土壤样品中筛选到 1 株能够产耐热阿魏酸酯酶的青霉菌株 XGY36。笔者对青霉发酵液中的阿魏酸酯酶进行分离与纯化,对其部分酶学性质进行了研究,旨在为阿魏酸酯酶在食品、饲料及造纸工业中的进一步应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

菌株是从采集于徐州云龙山、托龙山和云龙山湖公园等富含腐烂植物茎叶组织的土壤中筛选获得的,经鉴定确定为灰绿青霉(*Penicillium glaucum*),命名为菌株 XGY36。

基金项目 大学生创新创业基金项目(201311998053Y);徐州市科技计划项目(XF13C011,XF13C027)。

作者简介 徐大伟(1989-),男,江苏连云港人,本科生,专业:生物工程。*通讯作者,副教授,博士,从事食品生物技术。

收稿日期 2016-04-13

1.1.2 培养基。①斜面培养基(g/L):马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,121℃灭菌 20 min。②种子培养基:玉米粉 20 g/L、豆饼粉 30 g/L、KH₂PO₄ 5 g/L、CaCl₂ 0.5 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L,pH 6.5,121℃下蒸气灭菌 15 min。③摇瓶发酵培养基:玉米粉 20 g/L、豆饼粉 30 g/L、麦麸 15 g/L(粒径<0.05 mm)、葡萄糖 10 g/L、酵母粉 8 g/L、NH₄NO₃ 3 g/L、Na₂HPO₄·7H₂O 0.5 g/L、CaCl₂ 2 g/L、MgSO₄·7H₂O 1 g/L、NaCl 1 g/L,pH 6.2,121℃下灭菌 20 min。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂。DEAE-Cellulose DE52、Sephadex G-75,均为 Amersham pharmacia 公司产品;蛋白质低分子量 Marker,购自 TaKaRa 公司;阿魏酸乙酯等其他常规试剂均为国产或进口分析纯。

1.2.2 仪器。KTA Explorer 100/Explorer 10 型蛋白质纯化系统为美国 GE 公司产品;Hoefer 2-D Electrophoresis 电泳系统为美国 HOEFER 公司产品;SIGMA3K30 型台式冷冻离心机德国 Sigma 公司产品;Agilent1100 series 高效液相色谱仪为美国 Agilent 公司产品;Cascada™AN 型超纯水系统为美国 PALL 公司产品;Labscale TFF 小型切向流超滤系统为美国 Millipore 公司产品;UV-2450 紫外可见分光光度计为日本岛津公司产品。

1.3 方法

1.3.1 阿魏酸酯酶粗酶液的制备。种子液培养温度 28 ℃, 摇床转速 200 r/min, 培养 72 h 后将培养好的菌液按 10% 的接种量接种于装有发酵培养基的摇瓶中, 摇瓶容量 500 mL, 装量 120 mL, 培养温度 30 ℃, 摇床转速 200 r/min, 培养时间 96 h。发酵结束后。发酵培养物在 4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液作为粗酶液。

1.3.2 酶的分离与纯化。将发酵液于 6 000 r/min, 离心 20 min, 收集上清液, 添加硫酸铵至 75% 饱和度, 4 ℃ 静置过夜, 于 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清, 将沉淀溶解于 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 6.5) 中, 继续对其彻底透析。透析脱盐后的粗酶液用 10 mmol/L 的 Tris - HCl 缓冲液调节 pH 至 7.5 后, 上样于 DEAE - Cellulose DE52 阴离子交换柱 (2.5 cm × 20 cm) 层析, 上样后继续用 10 mmol/L 的 Tris - HCl 缓冲液 (pH 7.5) 洗脱未吸附的蛋白, 再用含有 0 ~ 1.0 mol/L 的 NaCl 的 Tris - HCl 缓冲液进行线性梯度洗脱, 洗脱速度为 0.5 mL/min, 每管收集 3 mL。测定收集管中溶液的酶活力。将有活性的部分合并, 超滤浓缩后, 样品上样于 20 mmol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH 7.5) 平衡的 Sephadex G - 75 (1.6 cm × 90 cm) 分子筛凝胶柱并洗脱, 控制流速为 0.5 mL/min。洗脱液经紫外检测并分部收集 (3 mL/管), 分别测定各收集管的酶活力, 将有活性的部分合并, 用于检测酶纯度及研究其酶学性质。

1.3.3 酶活性检测。参照陈锦等^[12]的方法测定阿魏酸酯酶活力。取 0.1 mL 经适当稀释的酶液, 加入 500 μL pH 5.0 的 Na₂HPO₄ - 柠檬酸缓冲溶液配制的阿魏酸乙酯溶液, 在 50 ℃ 水浴保温 15 min 后加入 500 μL 10% 冰乙酸 (V/V) 终止酶促反应。先在酶溶液中加入 1 mL 冰乙酸溶液, 再加入底物溶液, 将其作为空白对照。采用 HPLC 法测定其阿魏酸含量。在 50 ℃、pH 5.0 条件下, 每分钟水解阿魏酸乙酯, 生成 1 μmol 阿魏酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位。高效液相色谱条件如下: C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1% 醋酸水溶液/甲醇 (72:28), 柱温 40 ℃, 检测波长 320 nm, 进样量 10 μL, 流速 1 mL/min。按上述色谱条件, 每个样品连续测定 3 次, 取峰面积平均值, 计算阿魏酸含量。

1.3.4 蛋白浓度测定。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝 G - 250 染色法 (Bradford 法), 用牛血清白蛋白制作标准曲线, 对蛋白浓度进行定量。

1.3.5 SDS - PAGE 测定蛋白质分子量。参照 Laemmli^[13]的方法进行 SDS - PAGE, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%。将样品和标准蛋白 [兔磷酸化酶 B (97 400 u)、牛血清白蛋白 (66 200 u)、兔肌动蛋白 (45 000 u)、牛碳酸酐酶 (31 000 u)、胰蛋白酶抑制剂 (21 500 u)、鸡蛋清溶菌酶 (14 400 u)] 进行 SDS - PAGE, 然后以相对迁移率对分子量绘图, 计算出该蛋白酶的分子量。

1.3.6 阿魏酸酯酶性质研究。

1.3.6.1 酶反应的最适温度和热稳定性。在 0.02 mol/L 的 Na₂HPO₄ - 柠檬酸缓冲溶液 (pH 5.0) 中, 不同温度 (30 ~

80 ℃) 下进行酶促反应, 确定酶反应的最适温度。热稳定性测定是将酶分别置于不同温度 (40 ~ 80 ℃) 下保温 4 h, 每隔 1 h 检测 1 次酶活, 以未经过热保温的酶液为空白对照 (100%), 检测酶的热稳定性。

1.3.6.2 酶反应的最适 pH 和酸碱稳定性。阿魏酸酯酶在不同 pH (3.0 ~ 8.0) 下进行酶促反应, 测定其最适 pH。测定 pH 稳定性是将酶液加入到 20 mmol/L 的不同 pH 缓冲液中, 再在 40 ℃ 下保温 1 h, 测定剩余阿魏酸酯酶的活性。所用缓冲液为 pH 3.0 ~ 6.0, 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液、pH 6.0 ~ 7.5 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液和 pH 8.0 ~ 8.5 的 Tris - HCl 缓冲液。

1.3.6.3 金属离子对酶活性的影响。取经适当稀释的酶液, 向其中分别加入用蒸馏水配制的金属盐溶液 (Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺、Pb²⁺), 使金属离子终浓度达到 5 mmol/L, 40 ℃ 下保温 1 h 后, 按照标准方法测定残余酶活。以上均以不添加金属离子的酶液为空白对照 (100%)。

2 结果与分析

2.1 离子交换柱层析纯化 将经过硫酸铵盐析、透析脱盐后初步纯化的蛋白样品过 DEAE - Cellulose DE52 柱进一步分离纯化。条件优化后, 当 pH 为 7.5 时, 采用阴离子交换层析柱对目标蛋白实现了较好分离。从图 1 可以看出, 样品经过阴离子交换层析, 随着洗脱 NaCl 浓度的逐渐增加, 洗脱出多个蛋白峰。经酶活测定发现, 酶活主要集中在 55 ~ 70 号收集管, 但与对照蛋白洗脱峰相比, 酶活集中区域与蛋白洗脱峰不完全重合, 说明酶活收集管中还有杂蛋白。合并有活性的收集管, 采用小型切向流超滤系统超滤浓缩进一步纯化。

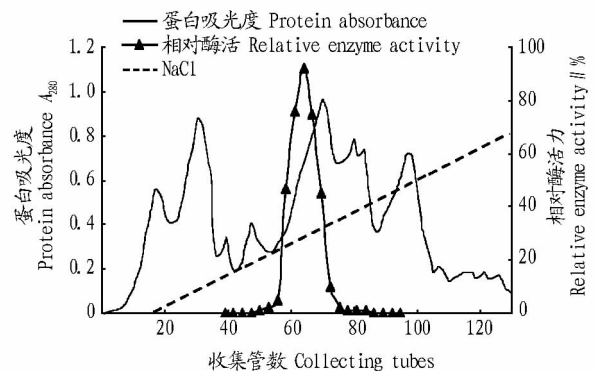


图 1 DEAE - Cellulose DE52 阴离子交换层析洗脱曲线

Fig. 1 Chromatography of protein by DEAE - Cellulose DE52

2.2 分子筛凝胶过滤层析 采用分子筛层析方法对合并的活性收集管蛋白进一步纯化。选择 Sephadex G - 75 色谱柱, 经条件优化后得到较为理想的分离效果。从图 2 可以看出, 经分离得到 3 个完全独立的洗脱峰, 经蛋白浓度测定, 洗脱后蛋白集中在峰 1 和峰 3, 峰 2 为非蛋白峰。对峰 1 和峰 3 进行酶活测定, 结果表明峰 3 (42 ~ 48 号管) 表现出强的阿魏酸酯酶活性, 活性峰同蛋白峰完全对应。

从表 1 可以看出, 经过硫酸铵沉淀、超滤、离子交换柱层

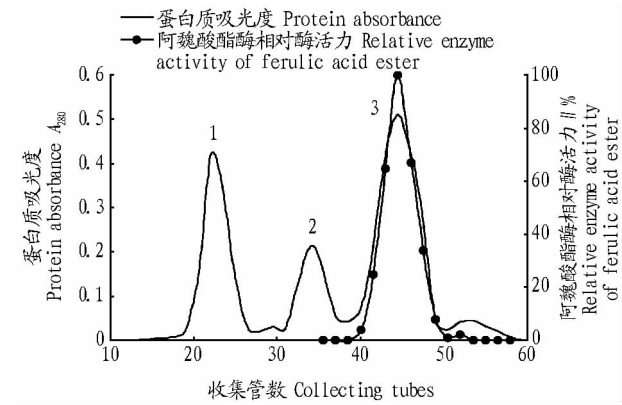


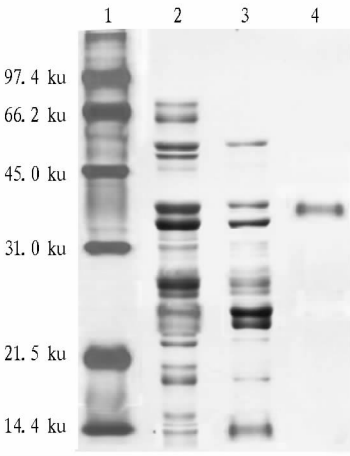
图2 Sephadex G-75 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 2 Chromatography of protein by Sephadex G-75

表1 灰绿青霉 XGY36 阿魏酸酯酶的分离与纯化

Table 1 Purification scheme of ferulic acid esterase from *Penicillium glaucum* XGY36

纯化步骤 Purification steps	总活力 Total activity mU	总蛋白 Total protein mg	比活力 Specific activity mU/mg	产率 Yield//%	纯化倍数 Purification times
发酵液上清 Culture supernatant	8 357.00	745.00	11.22	100.00	1.00
硫酸铵分级盐析 Ammonium sulfate Precipitation	7516.07	285.24	26.35	89.94	2.35
离子交换层析 DEAE-Cellulose DE52	4 607.21	40.22	114.56	55.13	10.21
分子筛凝胶过滤层析 Sephadex G-75	2 689.28	5.77	466.42	32.18	41.57



注:1. 低分子量标准蛋白;2. 经硫酸铵盐析后的粗酶液;3. 经硫酸铵盐析、DEAE-Cellulose DE52 阴离子交换层析后的粗酶液;4. 经硫酸铵盐析、DEAE-Cellulose DE52 阴离子交换层析、Sephadex G-75 分子筛凝胶过滤层析后的酶液。

Note: 1. Low molecular weight standard protein; 2. The crude enzyme liquid after a mmonium sulfate precipitation; 3. The crude enzyme liquid after a mmonium sulfate precipitation, DEAE-Cellulose DE52 anion exchange chromatography; 4. The crude enzyme liquid after a mmonium sulfate precipitation, DEAE-Cellulose DE52 anion exchange chromatography, Sephadex G-75 molecular sieve gel filtration.

图3 阿魏酸酯酶纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE results of proteins during the purification of ferulic acid esterase

析、分子筛凝胶过滤层析,酶的比活力从最初的 11.22 mU/mg 提高到 466.42 mU/mg,纯化了 41.57 倍,活性回收率为 32.18%。将纯化的酶冻干脱水后在 -4℃ 下保存下,储存 6 个月活性无明显变化。

2.3 阿魏酸酯酶纯度和分子量测定 采用 SDS-PAGE 分别测定硫酸铵盐析、DEAE-Cellulose DE52 阴离子交换层析、Sephadex G-75 分子筛凝胶层析法纯化后的粗酶纯度和分子量。从图 3 可以看出,仅经过硫酸铵盐析和透析纯化的粗酶液含有大量的蛋白条带,经 DEAE-Cellulose DE52 分离后去除了大量杂蛋白,获得约 8 条组分带,进一步经 Sephadex G-75 色谱柱分离后的酶液仅有 1 条蛋白条带,说明发酵液经过以上一系列纯化后已获得纯度较高的阿魏酸酯酶。经计算,阿魏酸酯酶的分子质量约为 36.5ku。该酶的分子

质量偏小,这可能与不同菌株所产的阿魏酸酯酶在分子结构和组成方面存在差异有关。

2.4 阿魏酸酯酶的酶学性质研究

2.4.1 最佳反应温度。从图 4 可以看出,在 30~50℃ 范围内,阿魏酸含量随着反应温度的升高而增加,说明随着温度的升高,阿魏酸酯酶酶活力增加,降解阿魏酸乙酯产生的阿魏酸含量也增加。当反应温度为 50℃ 时,阿魏酸含量达到最大值。此后,温度进一步升高,由于阿魏酸酯酶分子开始变性失活,所以阿魏酸含量降低,随着温度的升高而下降。因此,确定该酶降解反应的最佳温度为 50℃。

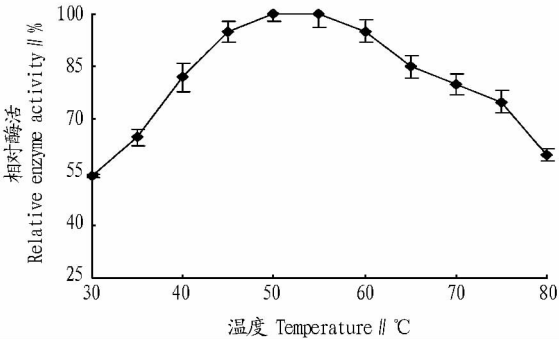


图4 阿魏酸酯酶的最适反应温度

Fig. 4 The optimal temperature of ferulic acid esterase

2.4.2 不同温度对阿魏酸酯酶稳定性的影响。从图 5 可以看出,40℃ 下保温 4 h 后酶活力几乎没有变化;50℃ 下保温 2 h 后剩余酶活在 90% 以上;60 和 70℃ 下保温 2 h 后剩余酶活约为 80%;在 70 和 80℃ 下保温 2 h 相对酶活仍保持 70% 以上;80℃ 下保温 3 h,酶活保持 50% 以上。该试验结

果表明该阿魏酸酯酶在 60 ℃ 以下具有良好的热稳定性。

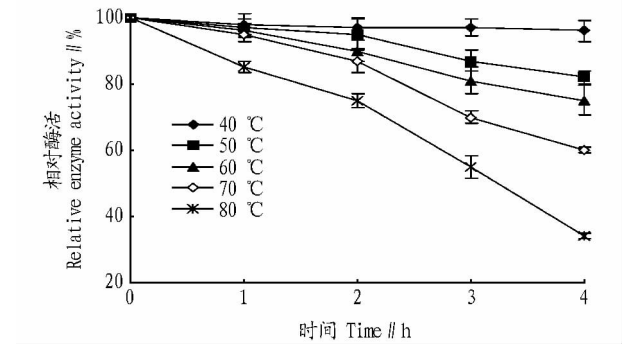


图 5 温度对阿魏酸酯酶稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on stability of ferulic acid esterase

2.4.3 pH 对阿魏酸酯酶活性的影响。

2.4.3.1 最佳反应 pH。从图 6 可以看出,当反应液的 pH 为 3.0~5.0 时,阿魏酸含量随着 pH 的升高而逐渐增加。当 pH 为 5.0,阿魏酸含量达到最大值。当反应液的 pH 超过 5.0 时,阿魏酸酯酶的活力逐渐降低;当 pH 超过 6.5 时,阿魏酸酯酶活力大幅降低。这也说明碱性条件不利于催化降解反应。阿魏酸酯酶催化阿魏酸乙酯制备阿魏酸的最适反应 pH 为 5.0。

2.4.3.2 阿魏酸酯酶的酸碱稳定性。将纯化后的酶液用不同 pH 的缓冲液配制,于室温下处理 4 h,测定其剩余酶活力。从图 6 可以看出,在 pH 3.0~3.5 范围内酶活呈上升趋势,当 pH 为 3.5~6.5,酶活性几乎没有变化;当 pH 超过 6.5 时,酶活力呈逐渐下降趋势。整体来看,在 pH3.5~6.5 范围内酶活力比较稳定,保温 4 h 后阿魏酸酯酶的剩余活力仍在 90% 以上,表明该酶在酸性环境下有较强的耐受力。

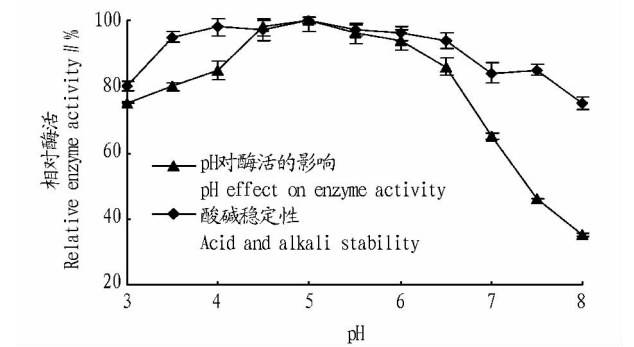


图 6 阿魏酸酯酶的最适反应 pH 及其 pH 稳定性

Fig. 6 Optimal pH and pH stability of ferulic acid esterase

2.4.3.3 常见金属离子对阿魏酸酯酶活性的影响。在阿魏酸酯酶中加入各种金属离子并保持离子浓度为 5 mmol/L,同时以不添加金属离子的酶液为对照,测定阿魏酸酯酶活性。由表 2 可知,Zn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 对阿魏酸酯酶具有一定的激活作用,Pb²⁺、Hg²⁺ 和 Ag⁺ 对阿魏酸酯酶有强烈的抑制作用,其他一些金属离子(如 Na⁺、K⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺ 等)对阿魏酸酯酶活性没有显著影响,说明阿魏酸酯酶与大部分金属离子都有良好的配伍性能。

表 2 各种金属离子对阿魏酸酯酶活性的影响
Table 2 Effect of various metal ions on the ferulic acid esterase activity

试剂 Reagent	浓度 Concentration mmol/L	相对酶活 Relative enzyme activity/%
—	—	100.0 ± 3.1
Na ⁺	5	102.0 ± 1.5
K ⁺	5	100.0 ± 2.6
Mg ²⁺	5	128.0 ± 6.4
Ca ²⁺	5	135.0 ± 2.4
Mn ²⁺	5	78.0 ± 3.8
Fe ²⁺	5	91.0 ± 2.9
Cu ²⁺	5	80.0 ± 3.6
Zn ²⁺	5	114.0 ± 4.8
Hg ²⁺	5	34.0 ± 1.6
Pb ²⁺	5	27.0 ± 4.4
Ag ⁺	5	44.0 ± 1.5

3 结论

该研究建立了从灰绿青霉(*Penicillium glaucum*) 发酵液中获取阿魏酸酯酶的纯化方法。该试验结果表明,发酵液经过硫酸铵沉淀预处理、阴离子交换层析以及分子筛层析纯化等,最终获得了纯度较高的阿魏酸酯酶。该酶分子量 36.5 ku,最终纯化 41.57 倍。该研究提纯的 GOD 的最适 pH 为 5.0,酶在 pH3.0~7.0 范围内较稳定,其 pH 稳定范围较宽,主要在酸性环境下,由此可见该阿魏酸酯酶特别适合在饲料中使用,在动物胃的酸性环境下一直保持高活性,可以有效将富纤维饲料充分降解。此外,酶的最适温度为 50 ℃,在 80 ℃ 下保温 2 h 仍保存有 70% 以上的酶活力,说明此酶的热稳定性很好,可高温应用。在饲料、食品等工业上应用阿魏酸酯酶时,其热稳定性相当重要,特别是在食品灭菌消毒以及饲料的高温造粒中该酶可以保持高稳定性。因此,阿魏酸酯酶在工业中有潜在的应用价值。

参考文献

[1] YANG S,TANG L,YAN Q,et al. Biochemical characteristics and gene cloning of a novel thermostable feruloyl esterase from *Chaetomium* sp. [J]. Journal of molecular catalysis B:Enzymatic,2013,97:328-336.

[2] 方园,欧仕益,张宁. 阿魏酸酯酶的制备及其酶学性质[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2012(5):481-485.

[3] GOPALAN N,RODRÍGUEZ - DURAN LV,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.

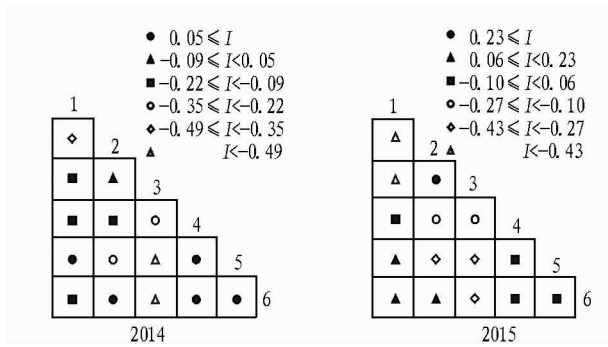
[4] LIU Q,ZHOU D Y,CHEN L,et al. Effects of feruloyl esterase,non - starch polysaccharide degrading enzymes, phytase, and their combinations on in vitro degradation of rice bran and nutrient digestibility of rice bran based diets in adult cockerels[J]. Livestock science,2015,178:255-262.

[5] ZENG W,CHEN H Z. Air pressure pulsation solid state fermentation of feruloyl esterase by *Aspergillus niger* [J]. Bioresource technology, 2009,100(3):1371-1375.

[6] 徐腾洋,方若思,董亚晨,等. 黑曲霉 XTY 液体深层发酵产阿魏酸酯酶的培养基优化研究[J]. 中国食品学报,2013(6):111-116.

[7] FAZARY A E,ISMADJI S,JU Y. Stability and solubility studies of native and activated *Aspergillus awamori* feruloyl esterase[J]. Journal of molecular catalysis B:Enzymatic,2009,59(1/2/3):190-196.

[8] ZHANG S,ZHAI H,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.

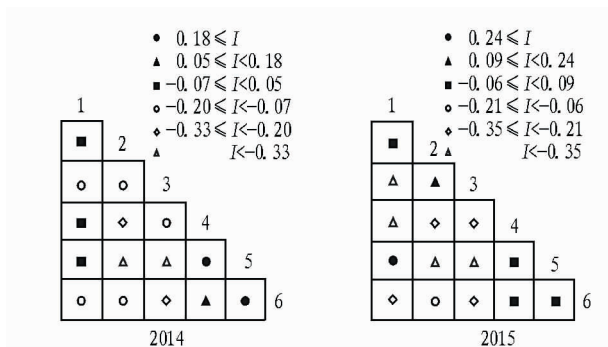


注:显著性关联 $P < 0.05$ 。

Note: Significant correlation $P < 0.05$.

图2 低水平氮素添加优势物种间种间关联度半矩阵

Fig.2 Half-matrix diagram of interspecific association among dominant species with a low level nitrogen addition



注:显著性关联 $P < 0.05$ 。

Note: Significant correlation $P < 0.05$.

图3 中水平氮素添加优势物种间种间关联度半矩阵

Fig.3 Half-matrix diagram of interspecific association among dominant species with a moderate nitrogen addition

期处于增加趋势,但生态位宽度低于杂类草;至7月中旬生态位宽度大于杂类草,并继续增加。杂类草生态位宽度的季节动态呈不断缩小的趋势。造成上述现象的原因是禾草类返青较早易被啃食,这为返青较迟的杂类草提供了较大的资源空间,使得杂类草在植被空隙中得到更好地生长。该研究表明,禾草类生态位变宽,并未出现生态位先增加后降低的趋势,导致上述原因的不同可能是不同群落中土壤养分差异所致。王仁忠^[19]将土壤水分、有机质含量、土壤含盐量作为

3个资源维度计算放牧条件下羊草草原主要植物种群的生态位宽度与生态位重叠指数,结果发现羊草在上述资源上生态位宽度最大。这与该研究结果一致,表明羊草对资源环境的利用能力最强,体现了退化群落中羊草对氮的利用效率较高。

参考文献

- [1] KANG L, HAN X G, ZHANG Z B, et al. Grassland ecosystems in china: Review of current knowledge and research advancement[J]. Philosophical transactions of the royal society B-Biological sciences, 2007, 362: 997-1008.
- [2] 王德利, 杨利民. 草地生态与管理利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 279-299.
- [3] 刘钟岭, 王炜, 郝敦元, 等. 内蒙古草原退化与恢复演替机理的探讨[J]. 干旱区资源与环境, 2002, 16(1): 84-91.
- [4] TILMAN D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: A stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly[J]. Pro Nal Acad Sci USA, 2004, 101(30): 10845-10861.
- [5] KERBS C J. Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance[M]. New York: Fair Field Graphics, 1978: 225-228.
- [6] SYLVAIN D, DANIEL C, CLEMENTINE G C. Niche separation in community analysis: A new method[J]. Ecology, 2000, 81(10): 2914-2917.
- [7] BERENDS F. Inter-specific competition and niche differentiation between *Plantago lanceolate* and *Anthoxanthum odoratum* in a natural hay field[J]. Ecology, 1983, 71: 379-390.
- [8] ODUM E P. Basic ecology[M]. New York: CBS College Publishing, 1982: 401-407.
- [9] AUSTIN M P, MEYERS J A. Current approaches to modelling the environmental niche of eucalypts: Implication for management of forest biodiversity[J]. Forest ecology and management, 1996, 85(1/2/3): 95-106.
- [10] WHITTAKER R H. Evolution and measurement of species diversity[J]. Taxon, 1972, 21: 213-251.
- [11] 张金屯. 植被数量生态学方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995: 79-87.
- [12] 戈峰. 现代生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 329-332.
- [13] 肖玉, 贾婷婷, 赵旭, 等. 青藏高原腹地退化苔草草原植物生态位的特征[J]. 中国草地学报, 2015(1): 30-37.
- [14] 王鹤龄, 牛俊义, 郑华平, 等. 玛曲高寒沙化草地生态位特征及其施肥改良研究[J]. 草地学报, 2008, 17(6): 18-24.
- [15] MAY R M. Theoretical ecology[M]. Oxford: Blackwell Science Publication, 1980.
- [16] LI A, WU J G, HUANG J H. Distinguishing between human-induced and climate-driven vegetation changes: A critical application of RESTREND in inner Mongolia[J]. Landscape ecology, 2012, 27: 969-982.
- [17] 陈子莹, 田福平, 郑阳. 施肥对玛曲高寒沙化草地主要植物种生态位的影响[J]. 草地学报, 2011, 19(5): 884-888.
- [18] 林丽, 赵成章, 龙瑞军, 等. 石羊河上游退化草地植物功能群生态位分异特征以阿尔泰狗娃花型草地为例[J]. 草业科学, 2009, 26(5): 50-55.
- [19] 王仁忠. 放牧影响下羊草草地主要植物种群生态位宽度和生态位重叠的研究[J]. 植物生态学报, 1997, 21(4): 304-311.

(上接第27页)

- [9] DEBEIRE P, KHOUNE P, JELTSCH J, 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.
- [10] 龚燕燕, 殷欣, 邹敏辰, 等. 宇佐美曲霉阿魏酸酯酶A基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013(7): 706-712.

- [11] 李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质[J]. 微生物学报, 2010(8): 1058-1064.
- [12] 陈锦, 胡茂丰, 吴章华, 等. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2015(8): 218-221.
- [13] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 68012-68015.