

引用格式:苏惠娟,刘丹,闫堃,等. 基因筛选克隆表达原花青素降解酶及其酶解条件优化的初步研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2020,47(4):60–67.

SU HuiJuan, LIU Dan, YAN Kun, et al. Cloning and expression of proanthocyanidin degrading enzymes based on gene screening and the optimization of their enzymatic catalysis conditions[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2020,47(4):60–67.

# 基因筛选克隆表达原花青素降解酶及其酶解条件优化的初步研究

苏惠娟<sup>1,2#</sup> 刘丹<sup>1#</sup> 闫堃<sup>1</sup> 张超<sup>3</sup> 王文雅<sup>1,2</sup> 袁其朋<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京化工大学 厦门北化生物产业研究院, 厦门 361000;

3. 济南市济阳区综合检验检测中心, 济南 251400)

**摘要:** 针对化学法制备低聚原花青素存在环保压力和副产物多等问题,研究了通过生物酶法降解高聚原花青素来制备低聚原花青素的方法。首先通过基因筛选方法筛选出 *SananA* 和 *EcnanA* 基因用于酶法降解高聚原花青素,将 *SananA* 和 *EcnanA* 基因连接在不同质粒载体表达蛋白的结果表明,*SananA* 基因连接在 pETDuet-1 载体上时的蛋白表达效果较优。进而,利用纯化的 *SananA* 蛋白优化高聚原花青素降解条件,结果显示较优的酶解条件为温度 50 ℃、pH = 10、反应时间 8 h,在此条件下原花青素单体积量为 35.67 mg/g,二聚体积累量为 14.49 mg/g。

**关键词:** 原花青素; 低聚原花青素; N-乙酰神经氨酸裂解酶

**中图分类号:** Q81 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2020.04.009

## 引言

葡萄籽是葡萄酒和葡萄汁工业的主要副产物,含有多种活性物质。来源于葡萄籽的多酚——原花青素,具有很好的药理学功能,如抗氧化性、抗菌性、抗炎性等<sup>[1]</sup>,因此葡萄籽原花青素在食品、制药、医疗保健等领域应用广泛。葡萄籽中的原花青素主要由单体儿茶素(C)/表儿茶素(EC)及其二聚体,三聚体和高聚体组成,最高可达十五聚体<sup>[2-3]</sup>。研究发现葡萄籽中 65% 的原花青素聚合度  $n$  大于 5<sup>[3]</sup>,即由 5 个以上的单体聚合而成,然而关于原花青素生物利用率的研究显示,只有聚合度小于 5 的原花青素才能被人体吸收利用<sup>[4-7]</sup>。故虽然原花青素有

很好的生物活性,但多数大分子原花青素不能被人体吸收利用,因此将高聚原花青素( $n \geq 5$ )转化为能被人体吸收的低聚原花青素( $n < 5$ )或单体是提高其吸收率和推动葡萄籽高附加值利用的重要途径之一。目前,国内外常用的原花青素解聚方法主要有弱酸法<sup>[3]</sup>、单体链断裂剂法<sup>[8]</sup>、酸式盐法<sup>[9]</sup>、催化剂加氢裂解法<sup>[10]</sup>、碱裂解法<sup>[11]</sup>等。上述方法由于普遍存在生产成本低、对设备要求苛刻,或者有有毒性气体产生等问题,不适用于食品生产过程。酸碱水解法是目前使用较多的原花青素解聚方法,但是由于其潜在的环保问题和较多的副产物,也亟须改进和提升。利用酶蛋白降解高聚物具有条件温和、底物特异性强、副产物少等特点,如果能利用生物酶解聚高聚原花青素制备低聚原花青素,将对原花青素的解聚和葡萄籽的高附加值利用产生巨大的推动作用。对于降解原花青素的酶目前尚未有文献报道,因此本文的研究目的即是从已有的生物信息学数据库中寻找和挖掘能够降解原花青素的酶,并对其降解能力进行表征,为酶法解聚原花青素提供研究方法和基础数据。

收稿日期: 2020-02-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400601)

第一作者: 女,1990 年生,硕士生

# 同等贡献

\* 通信联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 实验原料

大肠杆菌购自北京全式金生物技术有限公司；质粒载体 (pETDuet-1/pMAL/pZE) 为本实验室保存；金黄色葡萄球菌购自中国科学院微生物研究中心。

限制性内切酶和 T4 连接酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA 聚合酶及其他 PCR 反应相关试剂,宝生物工程(大连)有限公司;DNA Marker 和蛋白 Marker,北京博迈德生物技术有限公司;涉及的 DNA 电泳试剂,Biomatik 公司;异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG),纯度大于 98%,上海赛百胜公司;蛋白 SDS-PAGE 电泳相关试剂,Amresco 公司。

纯度大于 95% 的原花青素,天津市尖峰天然产物研究开发有限公司;纯度大于 98% 的表儿茶素、儿茶素、原花青素二聚体 B1 和原花青素二聚体 B2,成都曼思特生物科技有限公司;其他相关化学试剂购买自北京化学试剂公司。

## 1.2 仪器与设备

V-5100B 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;LC-20AT 液相色谱仪 (RP-HPLC),日本岛津公司;2-16KL 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;WS600+ 蛋白电泳仪,河北万生博朗电子有限公司;01C714 超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;EPS-100 核酸电泳仪,上海天能科技有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 高聚原花青素提取

参考文献[12]中的方法并略作改动,提取制备原花青素样品中聚合度较高的组分。用超纯水溶解葡萄籽原花青素样品,于容量瓶中定容,随后在分液漏斗中用乙酸乙酯反复萃取 3 次,收集水相并旋干得粗品。用甲醇将粗品溶解后,加入氯仿充分混合静置,然后离心收集固体,加少量甲醇重新溶解后,将溶液转移至鸡心瓶中 45℃ 旋干,得到的固体即为高聚原花青素样品。

### 1.3.2 酶解体系

酶解体系参照 Devenish 等<sup>[13]</sup>的方法并稍作改动。将 200 mmol/L 磷酸缓冲液、酶液与适量的原花青素或精制高聚原花青素固体充分混匀后,在摇床中震荡反应一段时间,其中反应体系的总体积为

1 mL。反应结束后,检测反应体系中的单体和二聚体原花青素含量。

### 1.3.3 原花青素中单体和二聚体含量测定

本文用来表征原花青素酶解后单体和二聚体含量变化的两种单体标品分别是儿茶素和表儿茶素,两种二聚体标品分别为原花青素 B1、B2。采用 LC-20AT 液相色谱仪,测定条件如下:流动相为乙腈 (A) 和 0.5% 磷酸水溶液 (B),按照表 1 所示的条件进行梯度混合洗脱;色谱柱为 Diamonsil-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温设为 35℃,流速采用 0.7 mL/min,上样量 20 μL,使用二极管阵列检测器,检测波长 280 nm。

Table 1 The RP-HPLC gradient elution conditions		
时间/min	体积分数/%	
	A	B
0.00	10	90
45.00	20	80
65.00	60	40
75.00	60	40
80.00	10	90

### 1.3.4 基因工程菌构建

基因工程菌构建过程中所涉及的工程菌的培养转化、重组酶蛋白的提取等分子生物学方法均参照 Sambrook 等<sup>[14]</sup>的研究方法,其中载体构建用到的引物如表 2 和表 3 所示。

Table 2 Primers for amplifying the nanA gene from Escherichia coli		
引物	序列 5'→3'	
pETDuet-1-nanA-F-(BamHI)	GGGAAAGGATCCGGCAACG	AATTTACGTGGCGTAATG
	AAATTTACGTGGCGTAATG	
pETDuet-1-nanA-R-(KpnI)	GGGAAAGGTACCTCACCCG	CGCTCTTGCATCAACT
	CGCTCTTGCATCAACT	
pMAL-nanA-F-(BamHI)	GGGAAAGGATCCGGCAACGA	ATTTACGTGGCGTAAT
	ATTTACGTGGCGTAAT	
pMAL-nanA-R-(PstI)	GGGAAACTGCAGTCACCCG	CGCTCTTGCATCAACTGC
	CGCTCTTGCATCAACTGC	
pZE-nanA-F-(KpnI)	GGGAAAGGTACCATGCATCACC	ACCATCAGCAACGAATTTA
	ACCATCAGCAACGAATTTA	
pZE-nanA-R-(XbaI)	GGGAAATCTAGATTACCCGC	GCTCTTGCATCAACTGCT
	GCTCTTGCATCAACTGCT	

表3 扩增金黄色葡萄球菌来源 *nanA* 基因所用引物

Table 3 Primers for amplifying the <i>nanA</i> gene from <i>Staphylococcus aureus</i>	
引物	序列 5'→3'
pETDuet-1- <i>nanA</i> -F-( <i>Bam</i> HI)	GGGAAAGGATCCGAACAAA GATTTAAAAGGTTTATATGC
pETDuet-1- <i>nanA</i> -R-( <i>Kpn</i> I)	GGGAAAGGTACCCTATAAAT CGTATTTTGCAATGAGTTGATC
pMAL- <i>nanA</i> -F-( <i>Bam</i> HI)	GGGAAAGGATCCAACAAAG ATTTAAAAGGTTTATATGC
pMAL- <i>nanA</i> -R-( <i>Pst</i> I)	GGGAAACTGCAGCTATATAT CGTATTTTGCAATGAGTTGATC
pZE- <i>nanA</i> -F-( <i>Kpn</i> I)	GGGAAAGGTACCATGAACA AAGATTTAAAAGGTTTAATATG
pZE- <i>nanA</i> -R-( <i>Xba</i> I)	GGGAAATCTAGATTATAAAT CGTATTTTGCAATGAGTTGATC

1.3.5 数据分析

所有实验重复3次,利用 Origin 2017 对实验数据进行分析,数据结果采用平均值 ± 标准差的形式表示。

2 结果与分析

2.1 降解酶的基因筛选

原花青素各单元间主要由 C4→C8 和 C4→C6 两种连接方式连接(图1),而高聚原花青素降解为低聚原花青素的过程也主要依靠聚合物单体间连接键的断裂。因此通过在酶学数据库中寻找底物与原花青素结构类似的裂解酶,就有可能挖掘筛选到原花青素降解酶。裂解酶是国际酶学委员会(IEC)划分的六大类酶中的一类,在 Enzyme Database -

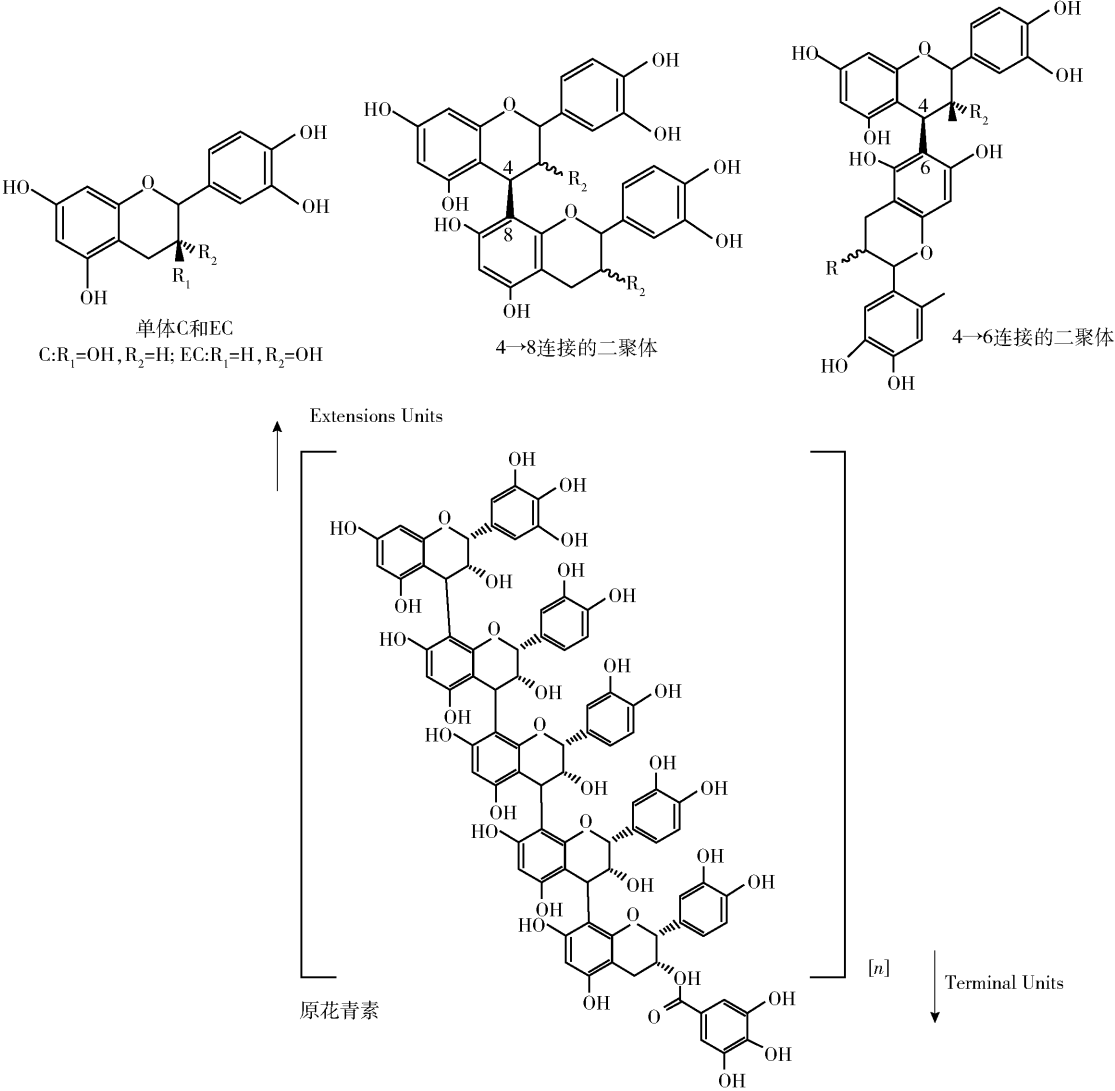


图1 原花青素单体、二聚体及原花青素多聚体

Fig. 1 Proanthocyanin monomers, dimers and high polymers

BRENDA 数据库搜索,发现能够断裂 C—C 键的酶很多,达上千个。将底物结构类似、来源于原核生物、有文献报告该酶已经被成功重组表达等因素作为进一步筛选的条件,最终筛选到了 N-乙酰神经氨酸裂解酶 (N-acetylneuraminate lyase, NAL)。NAL 能将 1 分子的 N-乙酰神经氨酸降解为两个低分子量的产物<sup>[15]</sup>;同时,N-乙酰神经氨酸与原花青素的结构类似,具有相似的官能团(图 1),在六元环结构中都含有一个环氧基团,NAL 裂解 N-乙酰神经氨酸的位置在环氧基团附近,这与高聚原花青素降解过程中单体之间 C—C 连接键断裂的原理类似。鉴于上述这些相似性,选择来源于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 N-乙酰神经氨酸裂解酶作为进一步研究原花青素降解的目标酶。

2.2 N-乙酰神经氨酸裂解酶的重组表达

将来源于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 NAL 基因分别命名为 *SananA* 和 *EcnanA*,它们的基因全序列可以从美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information,NCBI) 中检索获得,基因编号分别为 NC\_007795 (*SananA*) 和 NC\_000913 (*EcnanA*)。据文献报道这两种酶在大肠杆菌中已表达,因此大肠杆菌被选作宿主来表达 NAL。图 2 为重组质粒载体的构建过程,pETDuet-1、pMAL

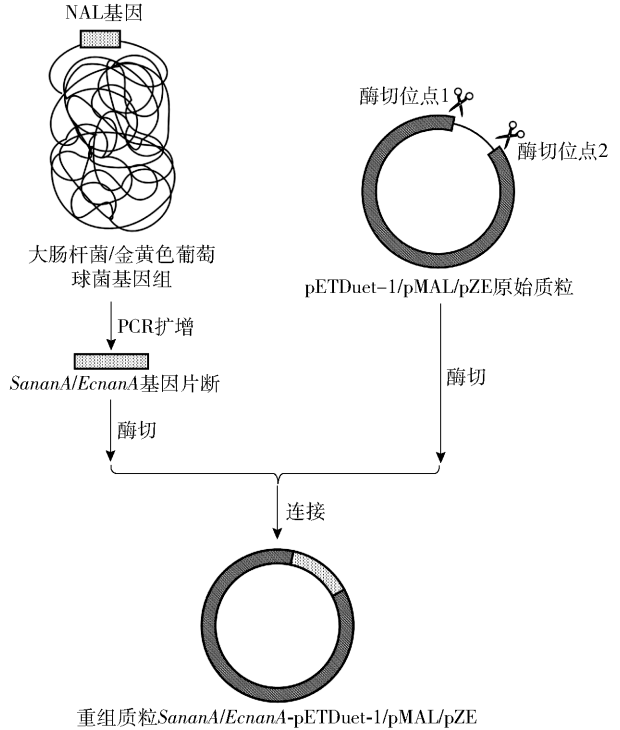


图 2 质粒构建过程  
Fig. 2 Plasmid construction procedure

和 pZE 分别对应高拷贝质粒、中拷贝质粒和弱启动子质粒,由金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的基因组 PCR 扩增得到 *SananA* 和 *EcnanA* 基因片段,而后将两种片段分别整合至上述 3 种不同的质粒中,得到 6 种重组质粒,通过优化质粒的构建达到高表达可溶性蛋白的目的。

从图 3 可以看出,*SananA* 和 *EcnanA* 在 3 种不同的质粒中均获得了较高水平的表达,其中 *SananA* 和 *EcnanA* 在 pETDuet-1 质粒中可溶性表达量最大,*SananA*-pETDuet-1 重组质粒表达出的蛋白量最多。尽管在 *SananA*-pETDuet-1 重组质粒的细胞破碎液沉淀中也存在着大量不溶性的目标蛋白,但是其可溶性蛋白的表达量是最大的。进一步将 *SananA*-pETDuet-1 和 *EcnanA*-pETDuet-1 质粒表达的蛋白进行纯化,图 4 表明纯化后获得了大量纯度较高的 *SnNAL* (*SananA* 对应的 NAL 蛋白) 和 *EcNAL* (*EcnanA* 对应的 NAL 蛋白)。

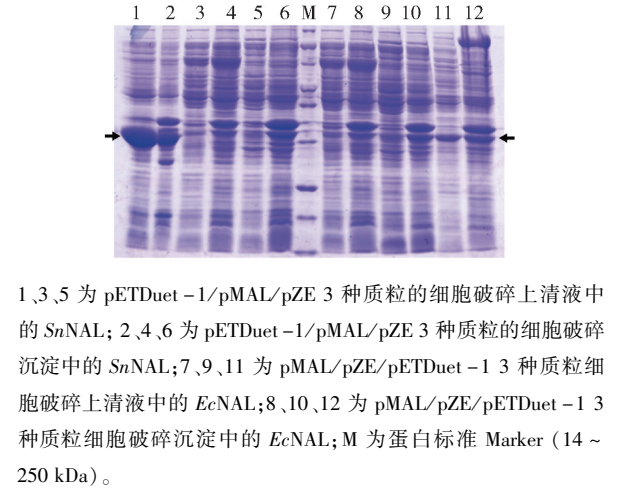


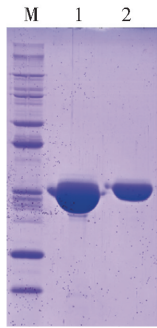
图 3 *SnNAL*/*EcNAL* 蛋白表达电泳图  
Fig. 3 SDS-PAGE of *SananA*/*EcnanA* of pETDuet-1/pMAL/pZE after cell lysis

2.3 NAL 降解原花青素的性能

2.3.1 NAL 粗酶液降解原花青素的效果

用 2.2 节构建的 6 种重组质粒表达的蛋白制备粗酶液进行原花青素降解试验,尝试使用文献[13]的反应条件,设置温度为 50 ℃,pH = 8.0,反应 1 h,反应过程中进行氮气保护,以避免降解产物被氧化。鉴于低聚原花青素非常不稳定,此处利用含有单体和二体的原花青素(未经处理的粗品)作为酶的底物,以期达到更为有效的筛选酶的目的,利用酶处理前后原花青素单体

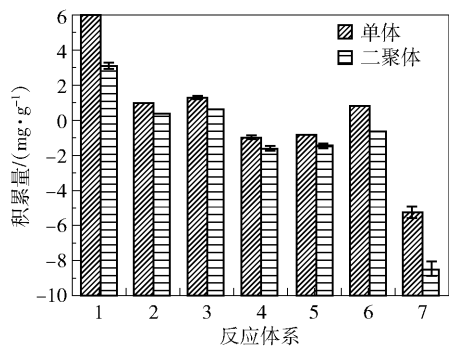




M—蛋白标准 Marker(14 ~ 250 kDa); 1—*SananA*-pETDuet-1;  
2—*EcnanA*-pETDuet-1。

图4 *SnNAL*/*EcNAL* 蛋白纯化后 SDS-PAGE 电泳图  
Fig. 4 SDS-PAGE of *SnNAL*/*EcNAL* proteins after purification

和二聚体含量的差值(积累量)来评价体系中酶的降解效率。结果如图 5 所示,与原花青素初始样品相比,1 号反应体系有明显的单体和二聚体积累,说明 NAL 具有降解高聚原花青素的能力;2 ~ 6 号反应体系无明显的单体和二聚体积累,甚至还有积累量降低的情况。与 7 号对照组的結果进行对比分析,推测大肠杆菌菌体破碎液中可能含有降解单体和二聚体的成分,导致某些反应体系中单体和二聚体积累量比原花青素初始样品对应物含量还低。为排除大肠杆菌菌体破碎液对酶降解高聚原花青素的影响,选择纯化后 *SnNAL* 和 *EcNAL* 蛋白进行降解实验,进一步研究 NAL 对高聚原花青素的降解效果。



1、2、3 为 pETDuet-1/pMAL/pZE 表达 *SnNAL* 的细胞破碎上清液的酶解效果;4、5、6 为 pMAL/pZE/pETDuet-1 表达的 *EcNAL* 的细胞破碎上清液的酶解效果;7 为对照组(空白大肠杆菌菌体细胞破碎上清液)。

图5 不同重组质粒产生的粗酶液的降解反应  
Fig. 5 The degradation reactions in different crude enzyme solutions

2.3.2 NAL 纯化产物降解高聚原花青素的效果

将 *SananA*-pETDuet-1 和 *EcnanA*-pETDuet-1 质粒表达的蛋白进行纯化(图 4),用纯化后的 *SnNAL* 酶和 *EcNAL* 酶降解高聚原花青素。酶解过程为:配制 10 mg/mL 的高聚原花青素溶液,加入纯化后酶,在温度 50 ℃、pH = 8.0 条件下反应 1 h。

从表 4 中的结果可以看出,NAL 的确能将高聚原花青素降解为单体和二聚体,而且当所用酶含量相同时,*SnNAL* 酶和 *EcNAL* 酶降解高聚原花青素产生的单体和二聚体的量无显著差异,这说明这两种酶降解高聚原花青素的能力相似。考虑到金黄色葡萄球菌来源的 *SnNAL* 相较于大肠杆菌来源的 *EcNAL* 在 *SananA*-pETDuet-1 质粒中可溶性蛋白表达量更多,因此接下来的优化实验选 *SnNAL* 作为高聚原花青素的降解酶。

表 4 纯化后 *SnNAL* 和 *EcNAL* 的降解效果

酶	积累量/(mg·g <sup>-1</sup> )	
	单体	二聚体
<i>SnNAL</i>	2.47 ± 0.15	7.89 ± 0.17
<i>EcNAL</i>	2.67 ± 0.19	8.05 ± 0.15

表中酶的质量浓度均为 0.17 mg/mL。

2.4 NAL 降解高聚原花青素条件的优化

参照已有的研究<sup>[13]</sup>,将反应温度设定在 50 ℃,因为在此温度下原花青素较为稳定且溶解性好,但 50 ℃时 pH 对 NAL 影响较大。因此之后的实验将 pH、反应时间和 NAL 蛋白浓度对高聚原花青素降解的影响作为优化重点。

2.4.1 pH

为研究 pH 对 N-乙酰神经氨酸裂解酶降解原花青素的影响,设置如图 6、7 所示的 pH 范围,将含有单体和二聚体的原花青素(未经处理的粗品)作为酶的底物,在质量浓度为 50 μg/mL 的原花青素溶液中加入 NAL,使酶质量浓度为 0.17 mg/mL,反应 1 h,测定在不同 pH 下单体和二聚体积累量的变化,同时设置不加酶的反应体系为空白对照,考察 pH 对原花青素降解产物稳定性的影响。

如图 6、7 所示,含 NAL 的体系在实验的 pH 范围内起初随着 pH 的升高,单体和二聚体积累量呈现逐渐增加的趋势,当 pH 达到 10 时,单体和二聚体积累量达到最大值,但是当 pH 大于 10 时,单体

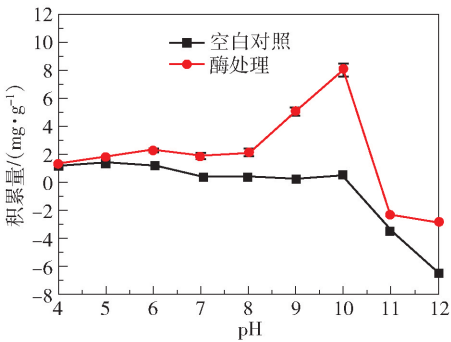


图 6 反应 pH 值对单体积积累量的影响  
Fig. 6 Effects of pH on the yield of monomers

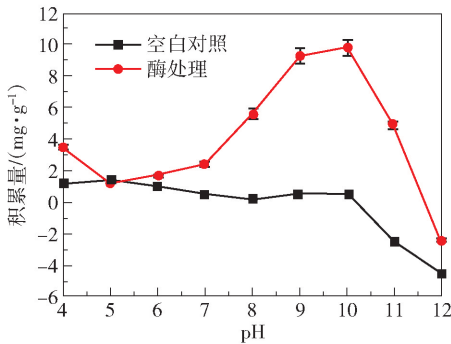


图 7 反应 pH 值对二聚体积累量的影响  
Fig. 7 Effects of pH on the yield of dimers

和二聚体积累量迅速下降,说明 N-乙酰神经氨酸裂解酶的活性在高 pH 下被抑制,同时单体和二聚体分子稳定性差,在碱性条件下可能被降解为更小的分子。由于在极端 pH 条件下高聚原花青素不稳定,故将空白缓冲溶液作为对照组。由实验数据可知,对照组除了在 pH 为 4 的酸性条件下单体和二聚体有少许积累,以及在 pH 为 11 和 12 条件下单体和二聚体发生了降解外,其他 pH 下空白溶液对单体和二聚体没有太大影响,最终将 pH = 10 确定为最优条件。

2.4.2 反应时间

反应时间的优化范围设置如图 8 所示。在 pH = 10,反应温度为 50 ℃ 的条件下,在质量浓度为 10 mg/mL 的高聚原花青素溶液中加入质量浓度为 0.17 mg/mL 的 NAL 进行反应,每隔一段时间取样测定单体和二聚体的含量。结果显示,反应 8 h 时单体积积累量最高,4 h 时二聚体积累量达到最高;单体和二聚体的积累量达到最高值后,进一步延长反应时间,积累量则呈现下降趋势。推测出现该现象是单体、二聚体分子不稳定降解的结果,但具体反应机

制还需进一步深入研究。综合考虑降解过程中低聚原花青素的积累量,将最优反应时间设为 8 h。

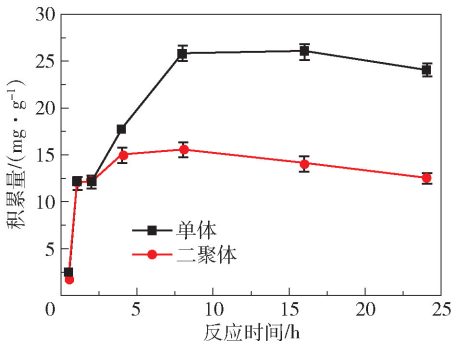


图 8 反应时间对单体和二聚体积累量的影响  
Fig. 8 Effects of reaction time on the yields of monomers and dimers

2.4.3 NAL 添加量

选择反应温度 50 ℃、反应时间 8 h、pH = 10 的酶解条件,在质量浓度为 10 mg/mL 的高聚原花青素溶液中添加不同量的酶(表 5),测定 NAL 添加量对酶降解效果的影响。结果表明,在酶添加质量浓度区间为 0.09 ~ 0.35 mg/mL 时,随着酶浓度的提高单体和二聚体的积累量逐渐增加,当添加酶的质量浓度大于 0.35 mg/mL 时单体和二聚体的积累量增加不明显。因此确定最佳的酶添加质量浓度为 0.35 mg/mL,在该浓度条件下可得到 35.67 mg/g 单体和 14.49 mg/g 二聚体。

表 5 *Sn*NAL 蛋白浓度对单体和二聚体积累量的影响  
Table 5 Effect of *Sn*NAL concentration on the yields of monomers and dimers

蛋白质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	积累量/(mg·g <sup>-1</sup> )	
	单体	二聚体
0.09	18.16 ± 0.12	11.21 ± 0.20
0.17	25.18 ± 0.31	15.83 ± 0.23
0.25	32.19 ± 0.18	15.21 ± 0.16
0.35	35.67 ± 0.34	14.49 ± 0.13
0.42	35.70 ± 0.27	15.12 ± 0.19
0.52	35.01 ± 0.21	14.24 ± 0.16

3 结论

本文利用生物酶法降低原花青素的聚合度,首先通过基因筛选方法,找到金黄色葡萄球菌来源的 *SananA* 和大肠杆菌来源的 *EcnanA* 基因用于酶法降解高聚原花青素的研究;然后通过构建 6 种不同的

重组菌株来优化目标蛋白的表达,结果表明,将 *SananA* 基因构建到 *pETDuet-1* 质粒,获得的可溶性蛋白表达量最优。随后,纯化 *SananA-pETDuet-1* 表达的 NAL 酶,并对其降解原花青素的条件进行优化,确定较优的酶解反应条件为:反应温度 50 ℃、pH = 10、反应时间 8 h、酶添加量 0.35 mg/mL,在此条件下得到的单体积量为 35.67 mg/g,二聚体积量为 14.49 mg/g。

上述研究结果表明利用生物酶法降解高聚原花青素制备低聚原花青素的思路可行,且具有条件温和、底物特异性强、副产物少等特点。但从实验结果可以看出,本文筛选到的 NAL 的酶解效率与传统的酸碱水解法相比还有很大差距。因此,未来的研究中可以对已有酶进行定向进化以提高酶解效率,或从基因库中筛选更多的相同底物谱的酶,从而寻找出解聚原花青素效率更高的酶。

## 参考文献:

- [1] LIU R, SHI C Y, SONG Y S, et al. Impact of oligomeric procyanidins on wheat gluten microstructure and physicochemical properties[J]. Food Chemistry, 2018, 260: 37–43.
- [2] GABETTA B, FUZZATI N, GRIFFINI A, et al. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds[J]. Fitoterapia, 2000, 71(2): 162–175.
- [3] LUO L X, CUI Y, CHENG J H, et al. An approach for degradation of grape seed and skin proanthocyanidin polymers into oligomers by sulphurous acid[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 203–211.
- [4] OU K Q, GU L W. Absorption and metabolism of proanthocyanidins[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 43–53.
- [5] 张慧文, 张玉, 马超美. 原花青素的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 296–304.  
ZHANG H W, ZHANG Y, MA C M. Progress in procyanidins research[J]. Food Science, 2015, 36(5): 296–304. (in Chinese)
- [6] SHOJI T, MASUMOTO S, MORIICHI N, et al. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration; analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 884–892.
- [7] TSANG C, AUGER C, MULLEN W, et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats[J]. British Journal of Nutrition, 2005, 94(2): 170–181.
- [8] LIU H W, ZOU T, GAO J M, et al. Depolymerization of cranberry procyanidins using (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epigallocatechin gallate as chain breakers[J]. Food Chemistry, 2013, 141: 488–494.
- [9] LIN Q, CAO Q L, HUO Q. Study on degradation process of procyanidins[J]. Asian Journal of Chemistry, 2014, 26(19): 6665–6668.
- [10] LI Z, ZENG J J, TONG Z H, et al. Hydrogenolytic depolymerization of procyanidin polymers from hi-tannin sorghum bran[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 337–342.
- [11] WHITE B L, HOWARD L R, PRIOR R L. Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(13): 7572–7579.
- [12] SAUCIER C, MIRABEL M, DAVIAUD F, et al. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(12): 5732–5735.
- [13] DEVENISH S R A, GERRARD J A. The quaternary structure of *Escherichia coli* N-acetylneuraminate lyase is essential for functional expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 388(1): 107–111.
- [14] RUSSELL D W, SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] UCHIDA Y, TSUKADA Y, SUGIMORI T. Purification and properties of N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biochemistry, 1984, 96(2): 507–522.

# Cloning and expression of proanthocyanidin degrading enzymes based on gene screening and the optimization of their enzymatic catalysis conditions

SU HuiJuan<sup>1, 2#</sup> LIU Dan<sup>1#</sup> YAN Kun<sup>1</sup> ZHANG Chao<sup>3</sup> WANG WenYa<sup>1, 2</sup>  
YUAN QiPeng<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Amoy-BUCT Industrial Bio-technovation Institute, Beijing University of Chemical Technology, Xiamen 361000;

3. Jinan Jiyang Area Comprehensive Testing Center, Jinan 251400, China)

**Abstract:** The chemical preparation of oligomeric procyanidins suffers from potential environmental problems and excessive byproduct formation. In order to overcome these drawbacks, this work attempts to identify an enzyme which can degrade polymeric procyanidins to form oligomeric procyanidins. After gene screening in a database, the genes of N-acetylneuraminate lyase from *S. aureus* and *E. coli* were selected as target genes. After the *nanA* genes from *S. aureus* and *E. coli* were ligated into the plasmids of pETDuet-1, pMAL and pZE, SDS-PAGE indicated that *SananA* has the highest soluble expression in the pETDuet-1 plasmid. Subsequent experiments for enzymatic hydrolysis indicated that a temperature of 50 °C, at pH = 10, for 8 h afforded the best degradation conditions, resulting in monomer yields of 35.67 mg/g and dimer yields of 14.49 mg/g from the polymeric procyanidins.

**Key words:** procyanidins; oligomeric proanthocyanidins; N-acetylneuraminate lyase