

泛酸合成酶菌株筛选及其催化生产 D-泛酸的研究

Strain screening of pantothenate synthetase and catalysis to produce D-pantothenic acid

马玉玉¹ 宋 伟² 冯小娜² 刘 佳² 钱园园²

MA Yu-yu¹ SONG Wei² FENG Xiao-na² LIU Jia² QIAN Yuan-yuan²

(1. 安徽科技学院食品工程学院, 安徽 凤阳 233100;

2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. College of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要: 将 11 个来源的泛酸合成酶 (Pantothenate synthetase, PS) 基因进行克隆, 并将其在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中表达, 构建成功的菌株进行酶学性质研究并在发酵罐上进行边发酵边转化试验。结果表明, 来源于短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 的 PS 酶活性最高, 为 1 562.3 U/mL, 最适温度为 30 ℃, 最适 pH 为 7.0, K_{cat} 为 115.4 s⁻¹。以 D-泛解酸和 β -丙氨酸为底物, 将重组菌株在 5 L 发酵罐中边发酵边转化, 反应进行 46 h 后 D-泛酸产量可达 92.2 g/L, 转化率为 93.7%, 时空产率为 48.5 g/(L · d)。

关键词: D-泛酸; 泛酸合成酶; 短短芽孢杆菌; 酶法; 边发酵边转化

Abstract: In this study, 11 source PS enzyme genes were cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the successful strain was constructed for enzymatic property study with simultaneous fermentation and transformation experiment on the fermentation tank. The results showed that the activity of PS derived from *Brevibacillus brevis* was the highest (1 562.3 U/mL), and the optimal temperature was 30 ℃, the optimal pH was 7.0, and the K_{cat} was 115.4 s⁻¹. The recombinant strain was fermented and transformed in a 5 L fermenter with D-pantothenic acid and β -alanine as substrates. After the re-

action for 46 h, the yield of D-pantothenic acid reached 92.2 g/L, the conversion rate reached 93.7%, and the spatiotemporal yield was 48.5 g/(L · d).

Keywords: D-pantothenic acid; pantothenate synthetase; *Brevibacillus brevis*; enzymic method; fermentation and transformation

泛酸 (Pantothenic acid, PA) 又称维生素 B₅, 是一种水溶性维生素, 仅 D-型 (D-PA) 具有生物活性, 是活细胞中合成辅酶 A (CoA) 的关键前体物质, 也是生命必需的维生素^[1-2]。泛酸具有制造抗体的功能, 在维护头发、皮肤以及血液健康方面有着重要的作用, 目前被广泛应用于制药行业、食品工业、化妆品以及饲料添加剂^[3-4]。纯游离泛酸是一种黄色黏稠的油状物, 酸性, 易溶于水和乙醇, 不溶于苯及氯仿, 在酸、碱以及光热条件下都不能稳定存在^[5]。

目前, 生产 D-泛酸的方法有: ① 物理诱导结晶法, 利用混旋泛酸钙的溶解度大于 D-型或 L-型这一特点进行诱导结晶, 此方法工艺成熟, 但只能生产泛酸钙, 无法用于其他泛酸衍生物的生产。② 化学拆分法, 利用氯胺酶等手性拆分剂拆分, 但拆分剂价格昂贵, 分离困难, 还存在毒性和环境污染问题^[6]。③ 微生物法, 包含代谢工程法、发酵法和生物酶法。Zhang 等^[7]利用代谢工程法生产 D-PA, 方法复杂, 产量低, 最高产量仅 28.45 g/L; 发酵法的产量较高, 但存在发酵产物成分复杂, 不利于下游提取等问题^[8-9], 发酵过程中产生的物质对食品品质也会产生一定的影响^[10-12]; 生物酶法是利用泛酸合成酶 (PS) 催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸进行缩合反应生成 D-PA, 反应条件温和, 没有副产物的生成, 更有利于产品分离。Miyatake 等^[13-14]研究了大肠杆菌来源的 PS 酶的酶学性

基金项目: 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (编号: LITE2018-20); 江苏省科技支撑计划社会发展项目 (编号: BE2018623)

作者简介: 马玉玉, 女, 安徽科技学院在读硕士研究生。

通信作者: 宋伟 (1991—), 男, 江南大学特聘副研究员, 博士。

E-mail: weisong@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-02-21

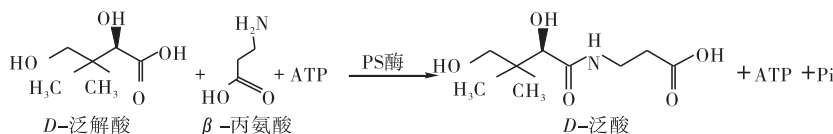


图 1 生物酶法合成 D-PA

Figure 1 D-PA was synthesized by biological enzyme

质,发现 PS 酶的最适 pH 为 10.0,最适温度为 30 °C。Tigu 等^[15]研究发现谷氨酸棒状杆菌来源的 PS 酶最适 pH 为 9.0,最适温度为 37 °C。目前,有关利用泛酸合成酶合成 D-泛酸的研究较少,Miki 等^[16]筛选了来自 *E.coli* 的 PS 酶经过 60 h 的发酵得到 117.5 g/L 的 D-PA,其发酵周期长,时空产率较低。由于反应需腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)提供能量(见图 1),所以酶法生产 D-PA 过程中大多需额外添加 ATP,而 ATP 价格昂贵,极大地增加了 D-泛酸的生产成本。

试验拟从 11 种菌株中筛选出泛酸合成酶活性最高的短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*),并将其在大肠杆菌中表达后进行体外催化 D-泛解酸和 β-丙氨酸生产 D-泛酸试验。对培养基种类、诱导剂种类与浓度、诱导温度、培养基中的残糖量浓度以及补料分批发酵在 5 L 发酵罐上进行边发酵边转化优化,利用活菌在生长过程中的糖酵解反应产生的 ATP,无需外部添加,能大大降低生产成本。旨在为酶法生产 D-PA 的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

帚石南棒杆菌(*Corynebacterium callunae*)、黄色考克氏菌(*Kocuria flava*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*):中国工业微生物菌种保藏管理中心;

短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、质粒 pET-28a (+):实验室保藏。

1.1.2 试剂与仪器

D-泛解酸钠(99%)、D-泛酰内酯(99%)、β-丙氨酸(98%):分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

氢氧化钠、盐酸、氨水、乙腈、甲醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI、一步同源重组试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒:生工生物工程(上海)

股份有限公司;

ATP 检测试剂盒、His 标签蛋白纯化试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

高效液相色谱仪:Waters 2695 型,美国 Waters 公司;发酵罐:BIOTECH-5JG 型,5 L,上海保兴生物设备有限公司。

1.1.3 培养基的配制

(1) LB 液体培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L。

(2) LB 固体培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,2% 体积分数的琼脂粉。

(3) TB 液体培养基:胰蛋白胨 12 g/L,酵母粉 24 g/L,甘油 4 g/L,磷酸二氢钾 2.31 g/L,磷酸氢二钾 16.42 g/L。

(4) 葡萄糖发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,硫酸铵 9 g/L,碳酸钠 2 g/L,磷酸二氢钾 6.8 g/L,磷酸氢二铵 4 g/L,七水合硫酸镁 0.8 g/L,一水合柠檬酸 0.8 g/L,酵母粉 2 g/L,碳酸氢钠 2 g/L,微量金属溶液 5 mL/L。

(5) 微量金属溶液:七水合硫酸亚铁 10 g/L,二水合氯化钙 2 g/L,七水合硫酸锌 2.2 g/L,一水合硫酸锰 0.5 g/L,五水合硫酸铜 1 g/L,二水合氧化钼二钠 0.1 g/L,一水合氧化硼二钠 0.02 g/L,盐酸 5 mol/L。

(6) 补料培养基:葡萄糖 650 g/L,磷酸氢二铵 8.5 g/L,七水合硫酸镁 8 g/L。

1.2 方法

1.2.1 培养条件

(1) 平板培养:将保藏的菌种接种至 LB 固体培养基上,37 °C 培养箱中培养 12 h。

(2) 种子培养:用接种针从平板上挑取菌体,接入 LB 液体培养基(50 mL/250 mL)中,37 °C 下 200 r/min 摇床中培养 12 h。

(3) 发酵培养基培养:将种子培养基接种至发酵培养基(100 mL/500 mL)中,接种量为 10%,37 °C 下 200 r/min 摇床中培养 12 h。

(4) 5 L 发酵罐培养:5 L 发酵罐中初始装液量为 1.3 L,温度 30 °C,接种量 10%,自动流加纯氨水与 4 mol/L 盐酸控制 pH 值为 7.0,搅拌转速 550 r/min,通气量 2 vvm,底物投入量 500 mL,包含 60 g/L D-泛酰内酯和 40 g/L β-丙氨酸。

(5) *D*-泛解酸钠的制备:为降低生产成本,使用 1 mol/L *D*-泛酰内酯与 1 mol/L NaOH 在室温条件下完全反应 3 h 生成 1 mol/L *D*-泛解酸钠^[14]。

1.2.2 细菌基因组及质粒提取 将菌种先在含有 LB 固体培养基的平板中活化,37 ℃培养 12 h,挑取培养好的单菌落至 50 mL LB 液体培养基中,37 ℃培养 12 h,取 1.5 mL 菌液离心进行基因组提取,具体操作方式参考生工生物工程(上海)股份有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作手册。取 100 μL 含 pET-28a 的大肠杆菌菌液至 30 mL 含有卡那抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h,按生工生物工程(上海)股份有限公司质粒小提试剂盒的操作手册进行操作。

1.3 PS 酶重组载体的构建

以上述 11 种菌的基因组作为模板,分别将 11 种菌株来源的酶命名为 PS_{Cc}、PS_{Ml}、PS_{Kf}、PS_{Bb}、PS_{Bf}、PS_{Pa}、PS_{Sa}、PS_{Bm}、PS_{Cg}、PS_{Bs}、PS_{Ec},设计引物序列见表 1。PCR 扩增获得泛酸合成酶基因,将 PCR 产物回收。pET-28a (+)载体的质粒使用 BamHI 和 EcoRI 进行双酶切。使用一步同源重组的方法将 PCR 回收产物连接到表达载

体 pET-28a(+)中,37 ℃放置 30 min,将重组质粒转化到 *E.coli* JM109 感受态细胞中,用含有卡那抗性的 LB 平板进行阳性转化子筛选,将筛选出的阳性转化子使用 T7 通用引物进行菌落 PCR 验证,将验证成功的菌落挑出送往苏州金唯智生物科技有限公司对目的基因进行测序。

1.4 PS 酶表达菌株的构建

重组质粒 pET-28a(+)-PS 测序结果正确后,将其导入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中,用含有卡那抗性的 LB 平板进行筛选,选择转化成功的转化子进行菌落 PCR 验证,将验证成功的转化子挑入含有卡那抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h,将其放入甘油管中-40 ℃保藏。

1.5 酶活测定

混合物包括:100 μL 纯化后的泛酸合成酶,50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0),25 mmol/L *D*-泛解酸钠盐,25 mmol/L β-丙氨酸,4.5 mmol/L ATP,10 mmol/L MgCl₂,15 mmol/L KCl,总体积 1.1 mL。加入泛酸合成酶开始反应,30 ℃培养 30 min,随后添加 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 停止反应^[15]。

表 1 引物设计

Table 1 Primer design

引物名称	引物序列	酶切位点
PS _{Cc} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGCGCTTAATAACCACCAAAA	BamHI/EcoRI
PS _{Cc} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTACTGCTGGTTGGTGATCTCGA	BamHI/EcoRI
PS _{Ml} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGACCCCTCTCGACCGCG	BamHI/EcoRI
PS _{Ml} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTCACGCGCAGCGGCCCGCG	BamHI/EcoRI
PS _{Kf} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGAGCCCCGCCCCCGCG	BamHI/EcoRI
PS _{Kf} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTCAGAGCGCGGTTGTCTG	BamHI/EcoRI
PS _{Bb} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGATGCAAACAATGATGCAG	BamHI/EcoRI
PS _{Bb} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTACTTGATTGATGTAATCGT	BamHI/EcoRI
PS _{Bf} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAGTAATACATACGATC	BamHI/EcoRI
PS _{Bf} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTAAGATTCTTTGTATTTAAT	BamHI/EcoRI
PS _{Pa} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGAACACCGTCAAGACCGTC	BamHI/EcoRI
PS _{Pa} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTCAATCGAGGTGGACTGAGAG	BamHI/EcoRI
PS _{Sa} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGACTAAGCTGATTACTACG	BamHI/EcoRI
PS _{Sa} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTATTCAGCTCCAATTATTAT	BamHI/EcoRI
PS _{Bm} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAGTCATTACAACAATT	BamHI/EcoRI
PS _{Bm} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTAGTTATCCCCCTGTACGTC	BamHI/EcoRI
PS _{Cg} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGCAGGTAGCAACCACAAAG	BamHI/EcoRI
PS _{Cg} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTAGAGCTCGATATTGTCTGAT	BamHI/EcoRI
PS _{Bs} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGAGACAGATTACTGATATTTC	BamHI/EcoRI
PS _{Bs} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTATATTCTCTCCATTTCTCGAAT	BamHI/EcoRI
PS _{Ec} -F	CAGCAAAATGGGTCGCGGATCCATGTTAATTATCGAAACCCTGC	BamHI/EcoRI
PS _{Ec} -R	TTGTGACGAGAGCTCGAATTCTTACGCCAGCTCGACCATTTTG	BamHI/EcoRI

1.6 蛋白纯化

结合液包含 10 mmol/L 的 NH_4HPO_4 、10 mmol/L NaH_2PO_4 、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、1% 甘油, pH 7.4。洗脱液包含 10 mmol/L 的 NH_4HPO_4 、10 mmol/L NaH_2PO_4 、0.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L 咪唑, pH 7.4。将表达有待纯化蛋白的菌株与结合液按 1 : 10 (g/mL) 充分悬浮, 破碎。4 °C 下 8 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。0.22 μm 过膜备用, 以 20 mg 粗蛋白/mL 填料的比例上柱。具体操作步骤参照上海碧云天生物技术有限公司 His 标签蛋白纯化试剂盒的操作手册。

1.7 蛋白质浓度标准曲线

以牛血清白蛋白作为标准蛋白溶液, 取 8 支干净的试管, 并编号 0~7, 参照毛伍祥^[17]的方法, 于 595 nm 处测定其吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 标准蛋白液浓度为横坐标作图, 得蛋白质浓度标准曲线为 $y=0.0015x+0.3815$ ($R^2=0.9948$)。

1.8 HPLC 测定条件

流动相为 95% 50 mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(用磷酸调 pH 至 3.0)和 5% 乙腈, 流速 0.5 mL/min, 进样体积 20 μL , 柱温 25 °C, 色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ Column (5 μm , 4.6 mm×250 mm), 检测器为紫外检测器, 检测波长 210 nm。

1.9 细胞内 ATP 含量测定

将沉淀细胞离心, 弃上清, 轻轻弹散细胞, 按 6 孔板每孔加入 200 μL 裂解液裂解细胞, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清用于后续的测定, 具体操作参照上海碧云天生物技术有限公司 ATP 检测试剂盒的操作说明书。

1.10 数据处理

采用 Excel 对原始数据进行整理及误差分析, 采用 Origin 9.0 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 PS 酶的筛选

由表 2 可知, PS_{Bb} 的酶活最高, 为 1 562.3 U/mL, PS_{Ml} 的活性稍低, 为 946.5 U/mL, PS_{Pa} 与 PS_{Sa} 则无活性, 将结果与文献[18]的 PS 酶活进行比较发现, PS_{Bb} 的酶活更高, 高出 247.5 U/mL。

2.2 酶学性质分析

2.2.1 PS 酶的分离纯化 由图 2 可知, PS_{Bb} 的蛋白大小

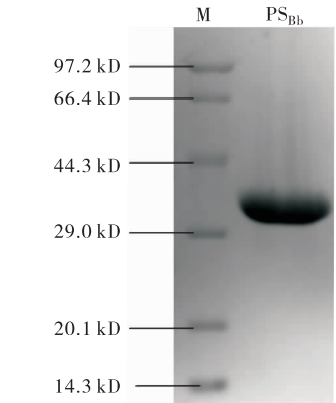
为 32 kD, 说明试验所得蛋白是正确的, 纯化后的蛋白浓度为 11 233.3 mg/mL。

2.2.2 酶学参数 由图 3 可知, PS 酶的活性随温度的升高先增加后降低, 当温度高于 60 °C 时, 酶活性丧失, PS 酶的最适反应温度为 30 °C。PS 酶在 30 °C 下放置 12 h 后, 残余酶活为 87.5%, 40 °C 放置 12 h 后残余酶活为 57.4%, 50 °C 放置 12 h 后残余酶活为 11.5%。当 pH 为 7.0 时, PS_{Bb} 活性最高, 在酸性条件或碱性条件下活性极低。PS 酶在 pH 7.0~7.5 时稳定, 放置 12 h 后其残余酶活仍达 70% 左右。 PS_{Bb} 的 K_{cat} 为 115.4 s^{-1} , 酶与 D-泛解酸和 β -丙氨酸两个底物的亲和力差异不大, K_m 分别为 1.2, 1.1 mmol/L。

由表 3 可知, PS_{Bb} 的转换数低于文献[11]的, 但 K_{cat}/K_m 值较大, 说明 PS_{Bb} 与底物的亲和力更大。

2.3 发酵罐转化条件优化

2.3.1 培养基 由图 4 可知, 使用 TB 培养基转化 46 h 后 D-PA 产量为 58.8 g/L, 转化率为 59.7%, 时空产率为 30.9 g/(L·d); 转化 48 h 后 D-PA 产量为 56.4 g/L, 转化率为 57.3%, 时空产率为 28.2 g/(L·d)。使用葡萄糖发酵培养基转化 46 h 后 D-PA 产量为 65.1 g/L, 转化率为 66.1%, 时空产率为 34.3 g/(L·d); 转化 48 h 后 D-PA 产量为 63.1 g/L, 转化率为 64.1%, 时空产率为 31.6 g/(L·d)。转化 46 h 后 D-PA 产量最高, 故将转化时长确定为 46 h。葡萄糖在菌体生长过程中参与细胞糖酵解产生 ATP, 为反应提供能量, 使用葡萄糖培养基得到的 D-PA 产量比使用 TB 培养基的产量高 6.4%, 故选用



M. Low Marker PS_{Bb} . 纯化后的蛋白质

图 2 纯化后 PS_{Bb} 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of PS_{Bb} from purification

表 2 PS 酶活测定结果

Table 2 PS enzyme activity determination results

										U/mL
PS_{Bb}	PS_{Ml}	PS_{Cg}	PS_{Bm}	PS_{Ec}	PS_{Bs}	PS_{Cc}	PS_{Kf}	PS_{Bf}	PS_{Pa}	PS_{Sa}
1 562.3	946.5	801.3	470.0	462.3	381.9	292.1	126.6	10.5	0.0	0.0

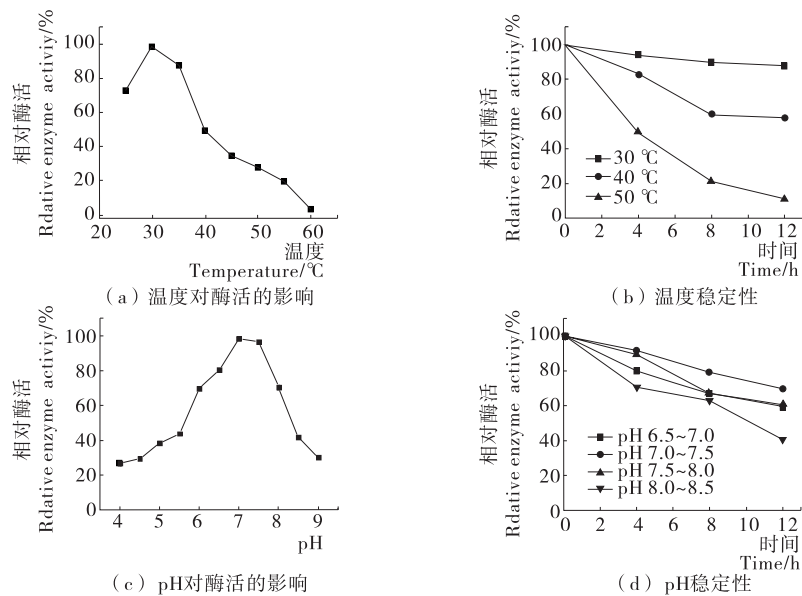


图 3 PS 酶学性质研究

Figure 3 Study on the enzymatic properties of PS

表 3 不同来源 PS 酶动力学参数比较

Table 3 Comparison of kinetic parameters of PS enzyme from different sources

酶的来源	K_{cat} / s^{-1}	D-泛解酸		β -丙氨酸		数据来源
		$K_m /$ (mmol $\cdot$ L $^{-1}$)	$K_{cat} / K_m /$ (L $\cdot$ s $^{-1}$ $\cdot$ mmol $^{-1}$)	$K_m /$ (mmol $\cdot$ L $^{-1}$)	$K_{cat} / K_m /$ (L $\cdot$ s $^{-1}$ $\cdot$ mmol $^{-1}$)	
<i>E. coli</i>	—	0.06	—	0.15	—	[14]
<i>C. glutamicum</i>	127.6 $\pm$ 5.3	1.4 $\pm$ 0.1	94.5	1.3 $\pm$ 0.2	98.1	[15]
<i>L. japonicus</i>	0.6	0.04	14.0	1.0	0.6	[18]
<i>M. tuberculosis</i>	3.4	0.13	26.2	0.8	4.3	[19]
<i>B. brevis</i>	115.4	1.20	96.2	1.1	104.9	

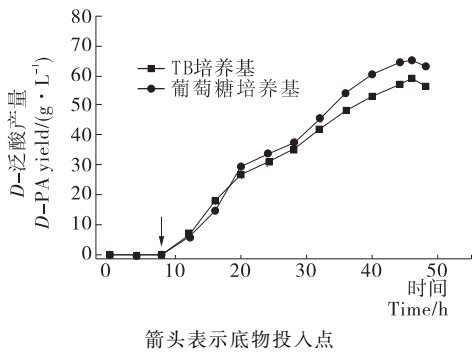


图 4 培养基优化

Figure 4 Medium optimization

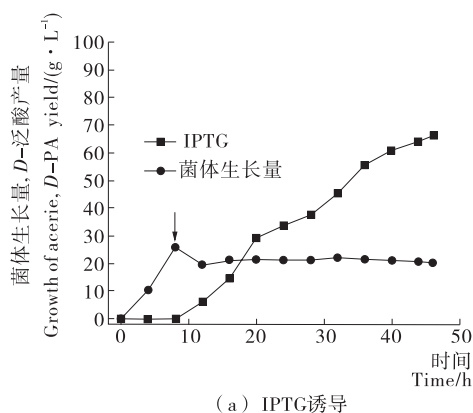
葡萄糖发酵培养基转化 46 h。

2.3.2 诱导剂 由图 5 可知,使用乳糖作为诱导剂的发酵罐中菌体生长情况更好, $OD_{600\text{ nm}}$ 可达 40,而使用 IPTG 作为诱导剂的发酵罐菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 仅维持在 20 左右。使用 IPTG 作为诱导剂转化 46 h 后 D -PA 产量为 66.3 g/L,转

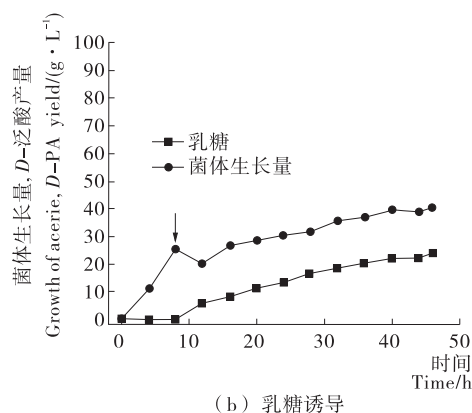
化率为 67.4%,时空产率为 34.9 g/(L $\cdot$ d);使用乳糖作为诱导剂转化 46 h 后 D -PA 产量为 24.1 g/L,转化率为 24.5%,IPTG 作为诱导剂时,相同条件下产量比乳糖的高 42.9%。这是由于乳糖作为诱导剂使用时并非其本身发挥作用,而是由其同素异形体异乳糖发挥作用,一部分乳糖作为碳源供菌体生长,没有完全诱导蛋白的表达,所以 IPTG 作为诱导剂的效果更好。

2.3.3 诱导剂浓度 由图 6 可知, D -PA 产量随 IPTG 浓度的增大而减少,当 IPTG 浓度为 0.1 g/L 时, D -PA 产量最高,为 68.9 g/L,转化率为 70.0%,时空产率为 36.3 g/(L $\cdot$ d)。IPTG 对菌体有一定的毒性,高浓度会杀死细胞,故选择 0.1 g/L 为最适 IPTG 浓度,其产量比未优化时提高了 2.6%。

2.3.4 诱导温度 由图 7 可知,30 $^{\circ}\text{C}$ 时的 D -PA 产量均高于其他温度,该条件下的最高 D -PA 产量为 74.6 g/L,转化率为 75.8%,时空产率为 39.3 g/(L $\cdot$ d)。PS 酶的最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,此温度下的酶活性最高, D -PA 产量也最大,比



(a) IPTG诱导



(b) 乳糖诱导

箭头表示底物投入点

图5 诱导剂优化

Figure 5 Inducer optimization

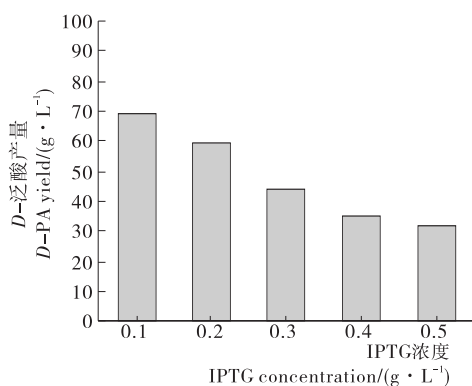
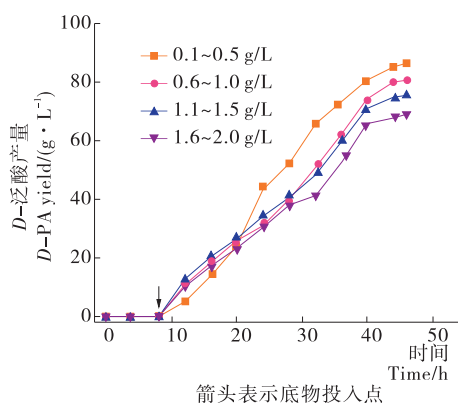


图6 IPTG浓度优化

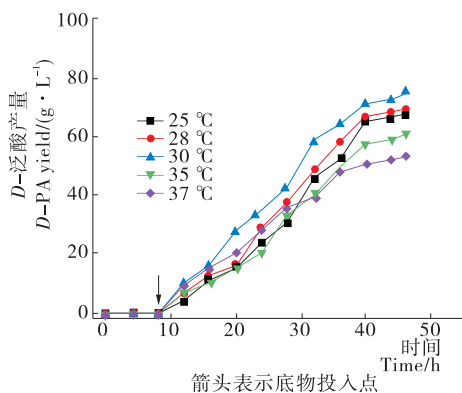
Figure 6 Optimization of IPTG concentration



箭头表示底物投入点

图8 残糖量优化

Figure 8 Optimization of residual sugar content



箭头表示底物投入点

图7 诱导温度优化

Figure 7 Induced temperature optimization

未优化时的产量提高了 5.8%，因此选择 30 °C 作为最适诱导温度。

2.4 补料分批发酵

2.4.1 培养基中残糖量优化 试验表明, PS_{bb} 细胞中 ATP 含量为 1.58×10^{-5} $\mu\text{mol}/\text{mg}$, pET-28a(+) 细胞内 ATP 含量为 1.15×10^{-6} $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 5 L 发酵罐转化试验表明, 细胞

生长过程中产生的 ATP 能满足反应所需的能量。

由图 8 可知, 残糖量为 0.1~0.5 g/L 时 *D*-PA 产量为 86.4 g/L, 转化率为 87.8%, 时空产率为 45.5 g/(L · d); 残糖量为 0.6~1.0 g/L 时 *D*-PA 产量为 80.5 g/L, 转化率为 81.8%, 时空产率为 42.4 g/(L · d); 残糖量为 1.1~1.5 g/L 时 *D*-PA 产量为 75.3 g/L, 转化率为 76.5%, 时空产率为 39.6 g/(L · d); 残糖量为 1.6~2.0 g/L 时 *D*-PA 产量为 68.7 g/L, 转化率为 69.8%, 时空产率为 36.2 g/(L · d)。残糖量控制后转化生产的 *D*-PA 产量比未控制时提高了 12%, 故残糖量控制在 0.1~0.5 g/L 时的效果最好。

2.4.2 底物分批投入 由图 9 可知, 当分 3 批次投入底物时, 反应结束菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 达 28 左右, *D*-PA 产量为 89.1 g/L, 转化率为 90.5%, 时空产率为 46.9 g/(L · d); 当分 5 批次投入底物时, 反应结束菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 达 35 左右, *D*-PA 产量为 92.2 g/L, 转化率为 93.7%, 时空产率为 48.5 g/(L · d); 当分 8 批次投入底物时, 反应结束菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 达 67 左右, *D*-PA 产量为 78.4 g/L, 转化率为

79.6%, 时空产率为 41.3 g/(L · d)。说明高浓度的 β -丙氨酸会对细胞生长产生毒害作用, 当分批投入后细胞生长好的表达出的蛋白更多, 而分 8 批次投入底物时菌体浓度很高, 产生的 *D*-PA 产量却降低, 是因为细胞生长过快就会很难表达蛋白。在转化过程中底物分 5 批次投入时的产量比一批次投入时的提高了 5.9%, 所以底物分

5 批次投入时效果最好。

2.5 *D*-PA 的 HPLC 与 LC-MS 验证

由图 10 可知, 发酵液的色谱峰出峰时间约为 19.15 min, 与标准品出峰时间相同, 初步认定试验所得产品为 *D*-PA。

由图 11 可知, 发酵液色谱峰出峰时间约为 3.37 min,

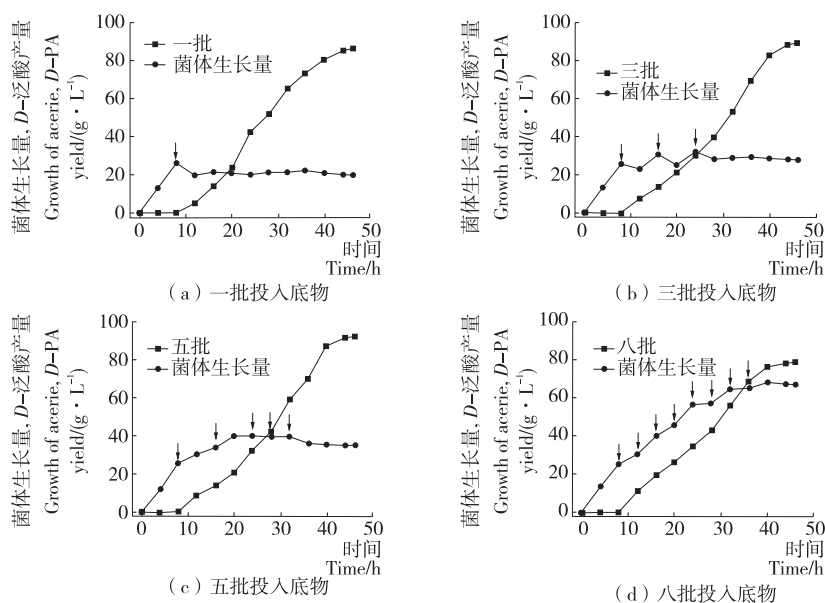


图 9 底物分批投入

Figure 9 Substrates are invested in batches

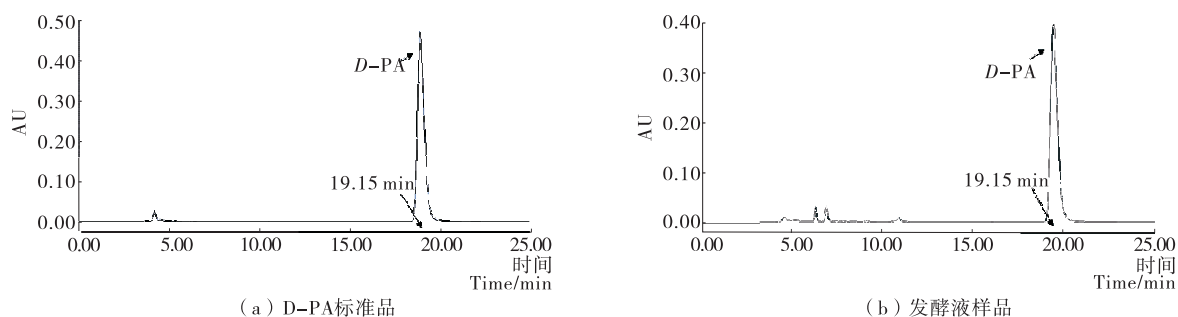


图 10 *D*-PA 的 HPLC 图谱

Figure 10 HPLC determination of *D*-PA

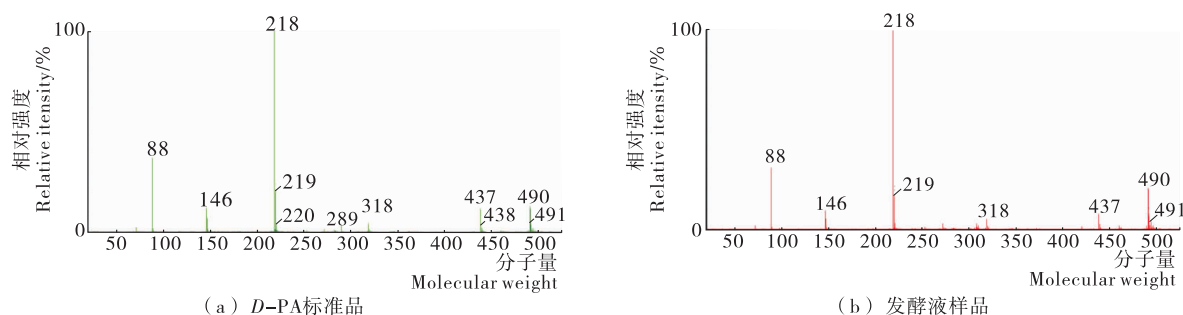


图 11 *D*-PA 的 LC-MS 图谱

Figure 11 LC-MS spectrum of *D*-PA

D-PA 分子量为 219,在检测过程中为负离子检测,失去一个质子,所以显示的分子量为 218,样品与标准品一致,由此可证明试验所得产品为 D-PA。

3 结论

将 11 种来源的泛酸合成酶基因进行克隆,在 *E.coli* BL21(DE3)中进行异源表达,经酶活测定筛选出活性最高的短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)来源的泛酸合成酶(PS),并对其酶学性质进行研究;在 5 L 发酵罐上进行边发酵边转化条件优化,利用生长中的重组菌株催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸生产 D-泛酸。结果表明,PS 酶的最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,最适 pH 为 7.0,转换数为 115.4 s^{-1} 。葡萄糖发酵培养基中使用 0.1 g/L 的 IPTG,30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行诱导,发酵液中残糖量为 0.1~0.5 g/L 时,转化效果较好。将底物分成 5 批次投入反应时,D-PA 产量最高为 92.2 g/L,转化率达到 93.7%。后续需进一步缩短反应时间,提高产量以达到工业化生产标准,边发酵边转化过程中发酵罐的转速、溶氧、通气量等需进一步优化。

参考文献

- [1] WEBB M E, SMITH A G, ABELL C. Biosynthesis of pantothenate [J]. Natural Product Reports, 2004, 21 (6): 695-721.
- [2] 张潇潇, 裴娟萍. 泛酸生物合成相关酶及其基因的研究进展[J]. 科技通报, 2008(6): 799-805.
- [3] POSTARU M, CASCAVAL D, GALACTION A I. Pantothenic acid- applications, synthesis, and biosynthesis [J]. Medical-Surgical Journal-Revista Medico-Chirurgicala, 2015, 119(3): 938-943.
- [4] YAO Chun-xiao, CHOU Jian-dong, WANG Tao, et al. Pantothenic acid, vitamin C, and Biotin play important roles in the growth of lactobacillus helveticus[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9(4): 1 194.
- [5] YANG Yan-hui, XIAO Chun-ling. The functions and biosynthesis of pantothenate[J]. Chemistry of Life, 2008, 28(4): 448-452.
- [6] 汤一新, 孙志浩, 华蕾. 微生物酶拆分方法生产 D-泛酸的手性中间体 D-泛解酸内酯[J]. 工业微生物, 2001(3): 1-5.
- [7] ZHANG Bo, ZHANG Xiao-ming, WANG Wei, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for D-pantothenic acid production[J]. Food Chemistry, 2019, 294(1): 267-275.
- [8] RIEPING M D, THIERBACH G D, PFEFFERLE W D, et al. Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using Enterobacteriaceae strains; EP, 1006193 [P]. 2003-09-17.
- [9] RIEPING M, HERMANN T, PFEFFERLE W. Process for the fermentative production of D-pantothenic acid; EP, 1360303[P]. 2003-11-12.
- [10] 李俊, 卢阳, 刘永翔. 乳酸菌发酵对苦荞芽苗饮料品质和营养成分的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(12): 195-199.
- [11] 刘小燕, 周红丽. 香坊肠杆菌发酵果酒的香气物质分析[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 48-54.
- [12] 王立, 任思, 周素梅. 绿豆发酵制品及其功能活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 231-236.
- [13] MIYATAKE K, NAKANO Y, KITAOKA S. Pantothenate synthetase of *Escherichia coli* B. I. Physicochemical properties[J]. Journal of Biochemistry, 1976, 79(3): 673-678.
- [14] MIYATAKE K, NAKANO Y, KITAOKA S. Enzymological properties of pantothenate synthetase from *Escherichia coli* B[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1978, 24(3): 243-253.
- [15] TIGU Fitsum, ZHANG Jun-li, LIU Guo-xia, et al. A highly active pantothenate synthetase from *Corynebacterium glutamicum* enables the production of D-pantothenic acid with high productivity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 6 039-6 046.
- [16] MIKI H, YAMAGUCHI T, HIKICHI Y, et al. Production method of d-pantothenic acid and plasmids and microorganisms thereof; EP, 0493060[P]. 1992-07-01.
- [17] 毛伍祥. 关于考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度实验的误差分析与改进[J]. 课程教育研究, 2017(38): 248.
- [18] GENSCHEL U, POWELL C A, ABELL C, et al. The final step of pantothenate biosynthesis in higher plants: Cloning and characterization of pantothenate synthetase from *Lotus japonicus* and *Oryza sativum* (rice)[J]. Biochemical Journal, 1999, 341: 669-678.
- [19] ZHENG R J, BLANCHARD J S. Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase[J]. Biochemistry, 2001, 40(43): 12 904-12 912.