

摘要

D-泛酸（维生素 B5）是一类水溶性维生素，被广泛应用于食品、饲料、医药、化工等领域。和传统化学合成法相比，以富马酸和 D-泛解酸为底物的多酶级联转化法具有反应温和、转化率高等优点，是具有较大潜力的 D-泛酸生物制备方法之一。但多酶级联反应的途径酶之间的酶活差异限制了反应的进行。本研究在大肠杆菌 BL21 中通过偶联 L-天冬氨酸- α -脱羧酶（PanD）、L-天冬氨酸酶（AspA）和泛酸合成酶（PanC），开发了催化富马酸和 D-泛解酸转化生成 D-泛酸的工艺路线。通过双质粒表达、pET 表达质粒改造和基因重复表达策略优化三酶的表达水平，显著提高了 D-泛酸的产量。主要研究结果如下：

（1）设计、构建与验证 D-泛酸生产的三酶级联途径。首先，筛选得到谷氨酸棒杆菌来源的 L-天冬氨酸酶（CgAspA）和短短芽孢杆菌来源的泛酸合成酶（BbPanC），与枯草芽孢杆菌来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶（BsPanD^{E56S}）作为级联反应的路径酶；其次，在体外验证了 CgAspA、BsPanD^{E56S} 和 BbPanC 级联反应途径的可行性，结果检测到了产物 D-泛酸的生成；最后，通过调节三种酶的酶活比例，确定了三酶的最佳体外酶活比例为 1.56:1:1.47。

（2）D-泛酸生物合成途径的体内重建和优化。首先，将 CgAspA、BsPanD^{E56S} 和 BbPanC 在质粒 pETDuet-1R 中共表达，构建 PL-01 菌株，利用全细胞转化验证了级联反应的体内可行性。然而，BsPanD^{E56S}（限速酶）与 CgAspA 和 BbPanC 的酶活差异（35.00:1:33.54）使反应失衡，中间产物 L-天冬氨酸的大量积累；然后，将 BsPanD^{E56S} 在 pET-28a（+）上单独表达，CgAspA 和 BbPanC 在质粒 pETDuet-1R 上共表达，构建 PL-02 菌株，三酶的酶活比例为 5.60:1:5.61；最后，进一步优化 AspA、PanD 和 PanC 的比例以高效生产 D-泛酸。对 pET-28a（+）-BsPanD^{E56S} 质粒的 T7 启动子和翻译起始区（TIR）进行改造，获得 PL-04 菌株，三种酶的酶活比例为 4.52:1:4.39。此外，还通过基因重复表达策略来提高 BsPanD^{E56S} 的表达水平，将基因重复数提高到 3 时，三酶的酶活比例为 1.67:1:1.56，与体外最佳酶活比例相近。

（3）引入基于多聚磷酸盐激酶（PPK）的 ATP 再生系统以增强细胞内的 ATP 供应。引入铜绿假单胞菌来源的 PPK，获得 PL-11 菌株，在不添加 ATP 的情况下，实现转化 70 g·L⁻¹ 富马酸和 89 g·L⁻¹ D-泛解酸，生成 74.5 g·L⁻¹ D-泛酸，产率为 84.9%。

（4）D-泛酸生产体系的优化及放大生产。对 PL-11 菌株的转化条件进行优化，确定最佳转化条件为：催化剂浓度 30 g·L⁻¹，转化 pH 7.0 和转化温度 35℃；最后，在 1 L 转化体系中，采用补料分批培养策略，实现转化 70 g·L⁻¹ 富马酸和 89 g·L⁻¹ D-泛解酸，生成 128.6 g·L⁻¹ D-泛酸，产率为 97.3%。

关键词：D-泛酸；大肠杆菌；级联反应；ATP 供应

Abstract

D-pantothenic acid (vitamin B5) is a water-soluble vitamin widely used in fields such as food, feed, medicine, and chemical engineering. By coupling L-aspartate- α -decarboxylase (PanD), L-aspartate enzyme (AspA) and pantothenic acid synthase (PanC), this study developed a process in *Escherichia coli* BL21 for catalyzing the conversion of fumaric acid and D-pantoic acid to D-pantothenic acid. The production of D-pantothenic acid was fine-tuned by optimizing the expression levels of the three enzymes through dual plasmid expression, pET expression plasmid improvement, and gene duplication strategy. The major results are listed as follow:

(1) Design, construct, and validate a three enzyme cascade pathway for D-pantothenic acid production. First, L-aspartase (*CgAspA*) from *Corynebacterium glutamicum* and pantothenate synthase (*BbPanC*) from *Bavibacterium brevis*, and L-aspartate- α -decarboxylase (*BsPanD*^{E56S}) from *Bacillus subtilis* were used as pathway enzymes for the cascade reaction; Then, the feasibility of the *CgAspA*, *BsPanD*^{E56S} and *BbPanC* enzyme cascade reaction pathway was validated *in vitro*, and the production of the product D-pantothenic acid was detected; Finally, by adjusting the enzyme activity ratio of the three enzymes, the optimal *in vitro* enzyme activity ratio of the three enzymes was determined to be 1.56:1:1.47.

(2) *In vivo* reconstruction and optimization of the D-pantothenic acid biosynthesis pathway. First, *CgAspA*, *BsPanD*^{E56S} and *BbPanC* were coexpressed in plasmid pETDuet-1R to construct strain PL-01. The *in vivo* feasibility of the cascade reaction was validated using whole cell transformation. However, the difference in enzyme activity between *BsPanD*^{E56S} (rate limiting enzyme), *CgAspA* and *BbPanC* (35.00:1:33.54) caused an imbalance in the reaction, resulting in a accumulation of intermediate product L-aspartic acid; Then, *BsPanD*^{E56S} was expressed separately on pET-28a(+), *CgAspA* and *BbPanC* were coexpressed on plasmid pETDuet-1R to construct PL-02 strain. The enzyme activity ratio of the three enzymes was 5.60:1:5.61; Finally, further optimize the AspA/PanD/PanC ratio to effectively produce D-pantothenic acid. The T7 promoter and translation initiation region (TIR) of the pET-28a(+)-*BsPanD*^{E56S} plasmid were modified to obtain PL-04 strain with an enzyme activity ratio of 4.52:1:4.39. In addition, the expression level of *BsPanD*^{E56S} was improved through gene duplication strategy. When the gene duplication number was increased to 3, the enzyme activity ratio of the three enzymes was 1.67:1:1.56, which was similar to the optimal enzyme activity ratio *in vitro*.

(3) Enhancing intracellular ATP supply by introducing an ATP regeneration system based on polyphosphate kinase (PPK). Introducing PPK from *Pseudomonas aeruginosa*, PL-11 strain was obtained. Without the addition of ATP, 70 g·L⁻¹ fumaric acid and 89 g·L⁻¹ D-pantoic acid was transformed into 74.5 g·L⁻¹ D-pantothenic acid with a productivity of 84.9%.

(4) Optimization and scaling up of the production system for D-pantothenic acid. Optimize the conversion conditions of PL-11 strain and determine the optimal conversion conditions as follows: catalyst concentration of 30 g·L⁻¹, conversion pH 7.0, and conversion temperature of 35°C; Finally, in 1 L transformation system, a batch feeding culture strategy was adopted to achieve the transformation of 70 g·L⁻¹ fumaric acid and 89 g·L⁻¹ D-pantoic acid, resulting in

128.6 g·L⁻¹ D-pantothenic acid with a productivity of 97.3%.

Keywords: D-pantothenic acid; *Escherichia coli*; Cascade reaction; ATP supply

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 D-泛酸的概述	1
1.1.1 D-泛酸的简介	1
1.1.2 D-泛酸的应用	1
1.1.3 D-泛酸的合成方法	2
1.2 酶转化法合成 D-泛酸的现状	4
1.2.1 单酶法合成 D-泛酸	4
1.2.2 多酶级联法合成 D-泛酸	4
1.3 L-天冬氨酸酶、L-天冬氨酸- α -脱羧酶、泛酸合成酶的概述	6
1.3.1 L-天冬氨酸酶的简介	6
1.3.2 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的简介	6
1.3.3 泛酸合成酶的简介	7
1.4 ATP 再生系统的研究进展及意义	8
1.4.1 ATP 再生系统的研究进展	8
1.4.2 ATP 再生系统的意义	9
1.5 课题的立题依据及意义	10
1.6 课题的主要研究内容	11
第二章 材料与方法	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 质粒、菌株及引物	13
2.1.2 主要实验仪器	15
2.1.3 主要培养基	16
2.1.4 主要实验试剂	16
2.2 实验方法	17
2.2.1 质粒抽提和基因组 DNA 的提取	17
2.2.2 目的基因的克隆及 PCR 扩增产物的回收	17
2.2.3 感受态细胞的制备及转化方法	18
2.2.4 重组质粒和重组菌的构建	18
2.2.5 关键酶的诱导表达及蛋白纯化	19
2.2.6 酶活测定	20
2.2.7 部分酶学性质的测定	20
2.2.8 重组菌株的全细胞转化	21
2.2.9 全细胞转化底物及产物的检测方法	22
第三章 结果与讨论	23

3.1 D-泛酸生产的三酶级联途径设计	23
3.1.1 级联路径的设计	23
3.1.2 L-天冬氨酸酶重组菌的构建	24
3.1.3 L-天冬氨酸- α -脱羧酶重组菌的构建	26
3.1.4 泛酸合成酶重组菌的构建	27
3.2 D-泛酸生物合成途径的体外验证	29
3.2.1 体外级联途径的可行性验证	29
3.2.2 体外级联途径的最佳酶活比例的确定	29
3.3 D-泛酸生物合成途径的体内重建	30
3.3.1 单质粒表达菌株的设计及验证	31
3.3.2 双质粒共表达菌株的设计及验证	32
3.4 三酶酶活比例的优化	34
3.4.1 pET 表达质粒改造策略	35
3.4.2 基因重复表达策略	36
3.5 基于多聚磷酸盐激酶的 ATP 再生系统的引入	38
3.5.1 ATP 再生系统的构建	38
3.5.2 ATP 再生系统的效果验证	39
3.6 转化富马酸、D-泛解酸生产 D-泛酸的体系优化及放大	40
3.6.1 CgAspA、BsPanD ^{E56S} 和 BbPanC 部分酶学性质的测定	40
3.6.2 D-泛酸生产体系的优化及放大	42
主要结论与展望	44
主要结论	44
展望	44
参考文献	46

第一章 绪论

1.1 D-泛酸的概述

1.1.1 D-泛酸的简介

D-泛酸 (D-pantothenic acid), 又被称为维生素 B₅, 水溶性维生素 B 族的一员, 化学结构式如图 1-1 所示。因其广泛存在于动植物和微生物中而得名“泛酸”和“泛多酸”。其相对分子质量为 219.24, 化学式为 C₉H₁₇NO₅。D-泛酸在常温下为白色粉末或浅黄色粘稠油状物, 熔点为 178-179°C; 无臭, 味微苦; 易溶于水、乙醇, 不溶于氯仿和苯, 在水溶液中显中性或弱碱性反应; 具有右旋光性。

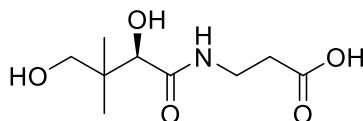


图 1-1 D-泛酸结构式

Fig. 1-1 The structure diagram of D-pantothenic acid

1.1.2 D-泛酸的应用

D-泛酸是一种普遍存在于生物体内的必需酸性物质, 可以调节身体内的能量代谢。被摄入到人体的蛋白质、脂肪、碳水化合物等, 在代谢产生能量的过程中, 都需要 D-泛酸发挥作用才能使食物中含有的能量被机体充分地利用, 因此其对于人体和动物的正常生理功能具有非常重要的调节作用, 被广泛应用于医药、食品、化妆品等领域^[1], 具体应用如下。

(1) 在医药领域的应用

(i) 维生素 B₅ 微生物和植物可以从头合成维生素 B₅, 而动物无法直接在体内合成维生素 B₅, 必须从饮食中获取^[2]。缺乏维生素 B₅ 可能导致相关疾病的发生^[3], 如周围神经炎^[4]和风湿病^[5]等; 维生素 B₅ 可用于治疗亨廷顿舞蹈病^[6]、阿兹海默症^[7]、帕金森病^[8]。此外, 研究发现 D-泛酸可作为自身免疫疾病的分子靶标干预炎症性肠病^[9]。近年来, 随着人口老龄化的加剧和社会养生保健意识的加强, D-泛酸在医药行业的应用受到越来越多的关注, 可以预计的是在医药领域 D-泛酸的需求量会持续走高, 市场前景良好。

(ii) 合成辅酶 A D-泛酸作为辅酶 A (CoA) 生物合成的关键前体, 是非核糖体肽合成酶 (NRPS)^[10]和聚酮合酶 (PKS)^[11]中的重要辅基。CoA 是一种辅酶, 参与细胞中的许多重要生化反应, 在人体中, 主要参与丙酮酸和脂肪酸的代谢, 在信号传导和表观遗传学中发挥重要作用^[12-13]。在临床上, CoA 主要用于治疗功能性低热症及白细胞减少症, 也可用于脂肪肝、糖尿病和心肌梗死等疾病的辅助治疗。研究发现 CoA 代谢途径可以诱导氧化磷酸化, 并促进 T 细胞的抗肿瘤作用^[14], 未来 CoA 或许会有更广阔的应用前景。

(2) 在食品领域的应用

(i) 用作食品添加剂 在食品工业中, D-泛酸可用作发色助剂, 适量添加使得肉色更加诱人; 可用作食品强化剂, 适当添加可以改善糕点、面包和乳制品的风味; 可用作营养强化剂, 添加到运动功能饮料和婴幼儿配方食品中以增加营养^[15]。

(ii) 用作饲料添加剂 在动物养殖产业中, D-泛酸可作为营养强化剂添加到动物饲料中, 通过提高饲料的品质从而提高养殖效益, 如应用于鱼的集约化养殖^[16]和食肉鸡(鸭、鹅)的养殖^[17-18]。此外, D-泛酸还可以提高牲畜的抗病能力和免疫能力, 改善肠道菌群平衡^[19-20]。

(iii) 用作保健品 D-泛酸作为合成 CoA 的前体参加生命代谢过程, 可帮助细胞的形成, 维持身体正常发育和中枢神经系统的发育, 因此 D-泛酸是一种科学的营养补充剂^[21]。目前, 添加 D-泛酸的保健食品在国内外均饱受欢迎, 如汤臣倍健的“多维女士”、养生堂的“成长快乐”、诺奥的“大人维生素”等。

(3) 在其他领域的应用

D-泛酸不仅在医药和食品领域中应用广泛, 在其他领域中也发挥着重要作用。

(i) 化妆品领域 D-泛酸是一种渗透性保湿剂, 由于其相对分子量较小, 可有效地渗透角质层, 使得角质层更加滋润, 与维生素 B6 联合使用, 可以保护皮肤表面黏膜, 抵御紫外线伤害; 是一种皮肤保护剂, 可以抑制表皮炎症因子活性, 降低化妆品中部分成分对于皮肤的损伤; 是一种良好的促渗剂, 可以使皮肤通道打开, 有利于护肤品中的有效成分更好地被皮肤吸收^[22]。

(ii) 生化品领域 D-泛酸在维护头发健康方面扮演着重要角色^[23]。当头发缺乏光泽、干枯毛躁或变得稀疏时, 多补充维生素 B5 可以改善发质。其衍生物 D-泛醇广泛添加于洗发、护发、染发产品中, 用于增强头发的营养与亮泽。

1.1.3 D-泛酸的合成方法

(1) 化学合成法

目前, D-泛酸的工业化生产主要依靠化学合成。以 D-泛酸的衍生物——D-泛酸钙为例, D-泛酸钙的常规合成方法是首先合成外消旋泛酰内酯, 再经光学分解得到 D-泛酰内酯, 最后 D-泛酰内酯与 β -丙氨酸钙缩合得到 D-泛酸钙^[24]。而其中外消旋泛酰内酯主要有 2 种合成方法, 分别是异丁醛-甲醛-氰化钠法和乙醛-异丁醛法。前一种方法生产工艺成熟, 原料廉价, 合成成本低, 但涉及剧毒的氰化物; 后者合成成本高, 但具有操作安全的优点。

虽然 D-泛酸的化学合成已经实现了大规模工业化, 但剧毒原材料的使用、副产品对环境的污染以及光学拆分剂的昂贵价格, 决定了它不是一种理想的、可持续的合成方法。因此, 仍需本着绿色、经济、环保的理念继续探索新的生产方式。

(2) 生物合成法

由于长期的自然进化, 酶在生命系统中展现出了良好的生物活性。科学技术的进步使酶成为传统化学催化剂的一种实用且环保的替代品。酶在催化效率、底物特异性和环境友好性方面具有优势。因此, 近几十年来, 新开发的生物合成方法在许多领域做出了巨大贡献, 特别是在食品、制药和化工行业^[25]。虽然生物合成法的发展时间不长, 并且

由于反应稳定性差和底物抑制等问题^[26]，在实际的工业化应用中会存在许多难题，但是因其更具有可持续性，更符合绿色发展的趋势，仍然是未来化学品制备的首选方法。同时，随着生物技术的不断进步，蛋白质改造技术和反应过程优化等方法正在逐步解决这些难题^[27]。

D-泛酸的生物合成法生产一般涉及到一个关键的酶——泛酸合成酶（Pantothenate Synthetase, PanC/PS; EC 6.3.2.1），可以特异性催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸缩合生成 D-泛酸^[28]。而 D-泛酸生产的生物合成法又可根据其生产方式的不同被分为两大类，分别是微生物发酵法和酶转化法。

微生物发酵法通过合成生物学和代谢工程方法等手段操纵微生物的细胞代谢，以实现增值产品的最大化生产^[29]。利用微生物发酵法生产化学品，具有显著的优点，如原料廉价且易得（如甘油、葡萄糖、玉米渣等），这为发酵法的大规模工业应用带来了可观的商业效益。由于 D-泛酸是微生物生长和代谢必不可少的辅助因子，各种微生物细胞都可以合成 D-泛酸，因此微生物发酵法很早就应用到 D-泛酸的生产中。20 世纪 90 年代，巴斯夫、帝斯曼、德固赛等知名化工和制药公司就开始关注 D-泛酸的生物合成。目前，通过微生物发酵，已经实现了在大肠杆菌^[15]、谷氨酸棒杆菌^[30]、巨大芽孢杆菌^[31]、肠沙门氏菌^[32]等微生物中生产 D-泛酸。在这些微生物中，大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌因其表达系统成熟完善、遗传背景透明、目标基因表达水平高和易于培养的特点，被认为是生物合成 D-泛酸的最高效和最具有前途的生产者^[33]。

此外，现在大多数工作都把 β -丙氨酸用作底物，将工作集中集中在如何增加泛解酸的积累上^[34]。Zou 等^[35]将 NADPH 的前体烟酰胺和烟酸添加到野生型大肠杆菌菌株 DPA11A01 的生长培养基中，D-泛酸的含量显著增加；通过游离质粒共表达 *pos5* 和 *ppnk* 以增加细胞内 NADPH 含量，进一步增加了 D-泛酸的积累；最终，在 5 L 生物反应器中，改造后的菌株 DPA11A14 通过补料分批发酵可以产生 $63.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ D-泛酸，生产强度为 $0.73 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ，糖酸转化率为 $0.33 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 葡萄糖，这是目前报道的通过发酵法生产 D-泛酸的最高产量。

随着微生物代谢改造技术和合成生物学技术的发展，通过微生物发酵法生产 D-泛酸迎来了更大的发展机遇，但是发酵法的大规模工业化应用，目前仍有许多问题亟待解决。主要有以下几个问题：（1）通过微生物发酵法生产，异源途径与细胞代谢竞争，从而限制产物产量增长并影响细胞生长，因此平衡好产物生产和细胞生长之间的关系成为限制其工业化应用的关键^[29,36]；（2）微生物发酵法通常生产周期较长，从而使得生产强度较低，同时，长时间的补料导致染菌机会大大增加，不利于工业化生产；（3）随着发酵过程的进行，产物 D-泛酸不断累积，过高的浓度会抑制细胞的生长和产物的积累，限制其生产能力的提高；（4）细胞内竞争代谢途径大量存在，利用基因敲除、表达水平调整和蛋白质工程等传统策略难以解决代谢途径复杂的产品的生产，目标代谢流弱难以积累目标产物，且下一步分离纯化产物的难度大。综合以上因素，酶转化法是目前来说更有潜力的合成 D-泛酸的生物合成法。

1.2 酶转化法合成D-泛酸的状况

与传统发酵法相比,通过酶转化法生产 D-泛酸有以下几个优点:(1)生产周期较短,生产强度较大,能源消耗低,有利于降低生产成本,从而提高产品竞争力;(2)细胞代谢途径对富马酸生成 L-天冬氨酸反应、L-天冬氨酸生成 β -丙氨酸反应和 β -丙氨酸和 D-泛解酸转化生成 D-泛酸反应的干扰可以忽略,基本无副产物产生,易于分离纯化产物。因此,酶转化法制备 D-泛酸是具有较大研究潜力的方法。根据酶转化过程中运用酶的数量不同,酶转化法又可以被分为单酶转化法和多酶转化法。

1.2.1 单酶法合成 D-泛酸

单酶转化法,顾名思义,转化过程中仅涉及一个酶,其转化体系构成简单,反应转化率较高。自 1990 年代初以来,武田药品^[37]等公司的专利中就开始报道 D-泛酸合成的生物途径。实际上,所有这些途径都使用泛酸合成酶(PanC)将 D-泛解酸和 β -丙氨酸缩合生成 D-泛酸^[38-39]。因为在体内只能合成 D-构型的产物,所以生物合成路线避免了繁琐且耗时的光学拆分过程,这是它们相对于传统化学路线的主要优势。

Miki 等^[40]发现了一种在 ATP 存在下,将 D-泛解酸和 β -丙氨酸转化为 D-泛酸的新型酶促反应。使用其构建的大肠杆菌,在外部添加 D-泛酰内酯和 β -丙氨酸的情况下,通过生物催化产生的 D-泛酸最高产量达到了 $117.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Tigu 等^[41]在谷氨酸棒杆菌中发现了一种高活性的泛酸合成酶,在发酵的早期阶段向含有该酶的大肠杆菌菌株中添加底物(D-泛解酸和 β -丙氨酸),在 32 h 内产生 $97.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ D-泛酸。然而,泛酸合成酶虽然是生物合成法生产 D-泛酸过程中最重要的酶,但目前关于泛酸合成酶的研究还比较少。

1.2.2 多酶级联法合成 D-泛酸

多酶级联法一般定义为在一个反应容器中组合多个催化步骤来生产广泛化学品的的方法。多酶级联法具有很多优点。首先,多酶级联可以改变反应平衡并避免不稳定或有毒中间体的产生,因为这些中间体是在反应中间产生的,可在随后的反应途径中被消耗。其次,多酶级联避免了中间体的分离和纯化,从而节省时间、试剂和成本^[42]。第三,由于化学试剂的使用较少,多酶级联反应产生的废物较少。最后,多酶级联转化通常比经典的单步转化产生更高的产量。目前,人工设计的级联反应被广泛用于高价值化学品的合成,如丙氨酸^[43]、肌醇^[44]和胺^[45]等。

多酶级联法,根据其反应环境的不同,可被分为体内级联反应(全细胞体系)和体外级联反应(无细胞体系)。其中体内级联反应一般依赖于活细胞代谢途径的辅因子循环或活细胞自身的代谢途径,而体外级联反应往往以分离的纯化酶作为催化剂进行转化反应^[46]。

基于酶促或化学酶促反应的体外级联法早已被成功开发。体外级联反应必须使用纯化的酶、细胞裂解物、细胞提取物或冷冻干燥的全细胞作为级联催化剂。与全细胞催化相比,使用纯化酶可以避免细胞自身生长的复杂代谢途径引起的副产物的积累。但是,酶纯化是一个昂贵且耗时的过程,特别是如果要进行体系放大或者工业化应用,则需要

更大的资金投入和工作量，而若使用粗制酶制剂则不能完全消除这些潜在的副反应，这一特点严重地阻碍了体外级联法的工业化应用。此外，如果生物催化剂依赖于辅助因子，则体外级联反应还需额外添加辅助因子，且辅助因子一般价格昂贵，这也进一步限制了体外级联法的工业化应用。

相比之下，在活宿主细胞内构建酶促级联反应与体外级联法相比具有许多优势。体内级联反应在生物转化之前无需进一步处理（例如细胞裂解、蛋白质纯化），即可使用完整细胞。因此与体外酶制剂相比，体内生物催化是一种更低成本且易实施的策略。将整个级联反应封闭在活细胞内消除了对外源辅因子补充和再生的需要，因为宿主内固有的代谢途径可以实现辅因子的补充和再生。然而，在宿主细胞内表达多种酶以进行体内生物催化并非完全没有问题。虽然宿主细胞细胞膜的存在可以给表达蛋白提供一个稳定的环境，但是也增加了底物被宿主细胞代谢降解的风险。同时，细胞膜的存在限制了底物的输入和产物的输出，这一特点限制了反应体系中底物的转化率的提高^[47-48]。而非天然酶途径的构建通常涉及到各种真核来源和原核来源的蛋白质，因此，当在同一细胞内同时承载这些酶时，必须在细胞生长和蛋白质表达上达成妥协才能成功建立体内级联途径。除此之外，一个细胞内多种重组蛋白的共表达可能会造成显著的代谢负担，并导致所需酶的产生量减少^[48]。故当多种酶同时在同一个细胞中表达时，如何精准调控蛋白的表达水平，调节多酶之间的酶活比例，成为构建体内级联反应的工作重点。

多酶级联法合成 D-泛酸，即将一些催化连续反应的酶互相联系在一起，建立 D-泛酸生产的反应链体系的方法。多酶级联法是单酶法合成 D-泛酸的进一步发展，即在单酶法的关键酶 PanC 的上下游途径中引入更多的酶，这些酶能够利用更有潜力的底物生成 PanC 的底物 β -丙氨酸或 D-泛解酸。而本实验室前期通过 Glu56Ser 突变提高了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 来源的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶 (PanD/ADC; EC 4.1.1.11) 的酶活性和催化稳定性，可将 L-天冬氨酸高效转化为 β -丙氨酸^[49]，因此选择 PanD 作为该级联转化途径的第二个酶。但 PanD 的底物 L-天冬氨酸的价格仍较高且存在底物抑制作用，这些特点限制了该方法的工业化应用。有文献报道，可以通过 L-天冬氨酸酶 (AspA; EC 4.3.1.1) 从富马酸生产 L-天冬氨酸，AspA 可以催化富马酸胺化或脱氨生成 L-天冬氨酸的可逆反应^[50]。因此，富马酸是一种潜在的底物，可以通过涉及 AspA 和 PanD 的体外双酶级联反应转化为 β -丙氨酸^[51]。Qian 等^[45]通过在 *E. coli* BL21 (DE3) 中偶联谷氨酸棒杆菌来源的 PanD 酶 (CgPanD) 和大肠杆菌来源的 AspA 酶 (EcAspA)，采用核糖体结合位点调控和基因重复表达策略协调 AspA 和 PanD 的表达水平，在 5 L 生物反应器中转化， β -丙氨酸的产量为 $80.4 \pm 1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，转化率为 $95.3 \pm 1.6\%$ 。因此，通过多酶级联转化富马酸和 D-泛解酸制备 D-泛酸具有理论可行性。

然而，将不同的酶、中间体和化学品组合到一个级联体系中，用于多个反应，需要精确调整反应条件以确保其兼容性。因此，催化剂的选择性、反应条件的相容性和反应的协同性是实施级联途径的重要瓶颈，限制了反应转化速率和产率的提高^[52]。其中，反应系统的协同性需要精心微调，例如，精确调控多酶级联反应中单个酶的活性比例^[53]，使各个酶的酶活比例协调，级联路径的各个反应相平衡。因此，需要付出更多努力来提

高多酶级联法的工业实用性。

1.3 L-天冬氨酸酶、L-天冬氨酸- α -脱羧酶、泛酸合成酶的概述

1.3.1 L-天冬氨酸酶的简介

L-天冬氨酸酶 (AspA; EC 4.3.1.1) 可以介导以富马酸和氨为底物的反应, 合成 L-天冬氨酸, 如图 1-2 所示。它是最重要的工业酶之一, 已被应用于大规模生产 L-天冬氨酸。该酶是已知的最特殊的酶之一, 多年来的广泛研究未能确定任何可以替代 L-天冬氨酸的氨基酸底物^[54]。该酶对 D-天冬氨酸或巴豆酸没有活性, 而对 L-天冬氨酸具有高度选择性^[55]。

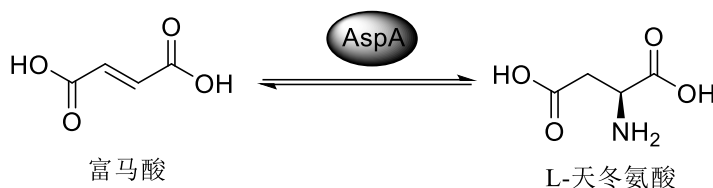


图 1-2 L-天冬氨酸酶的催化反应过程

Fig. 1-2 The catalytic reaction process of L-aspartase

目前, 关于 L-天冬氨酸酶的研究主要集中在大肠杆菌来源的, 也有枯草芽孢杆菌^[56]来源的 L-天冬氨酸酶被研究。Yasuhisa 等^[54]通过定向进化, 首次实现了 L-天冬氨酸酶的底物特异性改造; 通过易错 PCR 构建大肠杆菌来源的 L-天冬氨酸酶突变体文库, 筛选转化体以实现以 L-天冬氨酸- α -酰胺为底物生产富马酸单酰胺。此外, 大肠杆菌来源的 L-天冬氨酸酶已通过体外模拟预测其结构^[57], *EcAspA* 由四个相同的亚基组成, 每个亚基的中央结构域是极度保守的, 由五个长螺旋组成, 它们都略微弯曲并且彼此平行。由于对于 L-天冬氨酸酶的研究已经比较深入, 因此在本研究中可通过查阅 BRENDA 酶数据库等方式, 选择具有潜力的 L-天冬氨酸酶作为研究对象。

1.3.2 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的简介

L-天冬氨酸- α -脱羧酶 (PanD/ADC; EC 4.1.1.11) 可以特异性催化 L-天冬氨酸转化为 β -丙氨酸, 如图 1-3 所示。它属于丙酮酰依赖性酶, 在保守的丝氨酸残基上进行自催化、分子内自裂解反应。自裂解产生丙酮酰基部分, 这是 L-天冬氨酸发生脱羧反应所必需的。PanD 自动加工的机制通常被认为是一种自催化的主链重排, 这是蛋白质成熟的重要翻译后修饰。PanD 的自我加工系统与其他依赖丙酮酰基的酶如组氨酸脱羧酶、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶^[58]和精氨酸脱羧酶^[59]具有高度相似性。

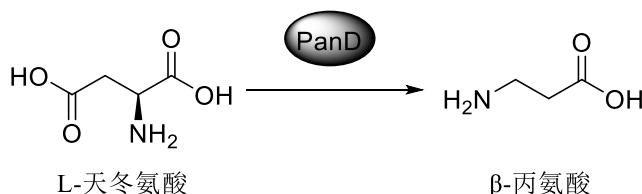


图 1-3 L-天冬氨酸- α -脱羧酶的催化反应过程

Fig. 1-3 The catalytic reaction process of L-aspartate- α -decarboxylase

PanD 是天冬氨酸途径合成 D-泛酸的关键酶，目前，已有关于细菌来源^[60]、昆虫来源^[61]、古细菌来源^[62]、动物来源^[63]的 PanD 的研究。豆科植物根瘤菌中 L-天冬氨酸转化为 β -丙氨酸的反应最早被报道，但对细菌来源的 PanD 的细致研究始于对大肠杆菌生物催化能力的探索。Dusch 等^[64]通过大肠杆菌来源的 PanD (EcPanD) 的功能互补分析鉴定了谷氨酸棒杆菌来源的 PanD (CgPanD)，发现失活是导致细菌来源的 PanD 工业化应用失败的主要因素之一。Mo 等^[65]认为 L-天冬氨酸可能是细菌来源的 PanD 的一种机制性失活剂，根据其添加时间和浓度的不同使 PanD 的活性产生不同程度的丧失。昆虫来源的 PanD 不存在未知机制的失活作用，其中，红面甲虫 (*Tribolium castaneum*) 来源的 PanD (TcPanD) 被证实与 EcPanD 和 CgPanD 相比，其活性最高^[66,67]。除了细菌和昆虫来源的 PanD 外，在古细菌中也发现了具有 PanD 活性的酶，Kim 等^[67]在 *Pyrococcus horikoshii* (一种超嗜热古细菌) 中发现并纯化了对 L-天冬氨酸催化效率高于 L-谷氨酸的类谷氨酸脱羧酶 (类 GAD 酶)，这意味着古细菌中存在的类 GAD 酶具有催化 L-天冬氨酸反应的能力。长期以来，人们认为 β -丙氨酸不能在动物 (昆虫除外) 中合成，只能从外源获得，但 Liu 等^[68]发现人谷氨酸脱羧酶样蛋白 1 (由 Gad11 编码) 具有 PanD 的部分催化特性，可在肌肉和肝细胞中直接生成 β -丙氨酸。

总的来说，目前对原核生物来源的 PanD 的研究更为透彻，其催化机理和晶体结构明确且原核生物来源的 PanD 在转化的过程中无需辅因子的额外添加，同时由于实验室前期改造获得的 BsPanD^{E56S} 的相关性能良好，因此本研究选择 BsPanD^{E56S} 作为其中一种级联途径酶进行相关实验。

1.3.3 泛酸合成酶的简介

泛酸合成酶 (PanC/PS; EC 6.3.2.1) 依赖于 ATP，可以催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸的缩合反应产生 D-泛酸，如图 1-4 所示。细菌和植物来源的泛酸合成酶是具有重要序列同一性的二聚酶。研究发现 PanC 的两步反应机理在拟南芥和大肠杆菌来源的酶之间是保守的^[69]。但拟南芥来源的 PanC 表现出明显的变构作用，而大肠杆菌来源的 PanC 则基本上没有变构作用。由于植物中控制泛酸生物合成的亚细胞区室化，PanC 的变构行为赋予其选择优势。植物来源的 PanC 通过变构作用体现了功能适应性，并且没有改变活性位点的结构。Chakrabarti 等^[70]通过 X 射线晶体衍射和高分辨率 NMR 光谱研究了底物 D-泛酸对 PanC 同质抑制的结构基础，结果显示第二个泛酸分子结合在 ATP 结合口袋中，这表明 D-泛酸对泛酸生物合成的同质作用是由底物与 ATP 结合位点的竞争性结合引起的。

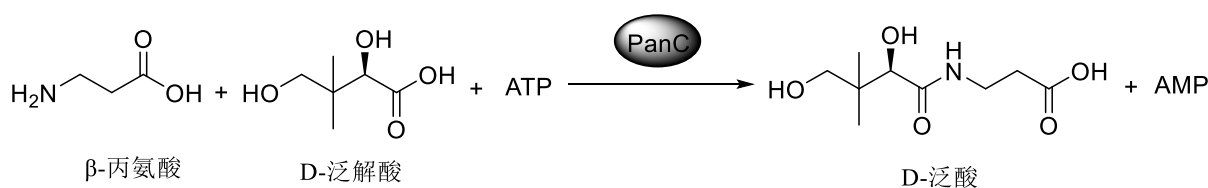


图 1-4 泛酸合成酶的催化反应过程

Fig. 1-4 The catalytic reaction process of pantothenic acid synthetase

目前,已有大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、短短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 等来源的 PanC 被研究^[41,71]。研究显示,来自谷氨酸棒杆菌的高活性 PanC 能够以高转化速率生产 D-泛酸,在发酵的早期对数阶段向含有该酶的大肠杆菌菌株中添加底物 (D-泛解酸和 β -丙氨酸) 导致在 32 h 内产生 $97.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-泛酸,对应产率为 99.1%,转化速率为 $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[41]。马玉玉等^[71]对短短芽孢杆菌来源的 PanC 酶的酶学性质进行探究,其酶活达 $1562.3 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, Kcat 为 115.4 s^{-1} , 最适 pH 为 pH 7.0, 最适温度为 30°C 。在 5 L 发酵罐中,重组菌株以 D-泛解酸和 β -丙氨酸为底物,通过边发酵边转化的方式,转化 46 h 后, D-泛酸的产量达到 $92.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 产率为 93.7%, 转化速率为 $68.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。由于目前关于 PanC 的研究还较少,因此在本研究中,需要选择来源范围更广的 PanC 进行研究,以筛选得到性能更好的 PanC 用于后续实验。

1.4 ATP再生系统的研究进展及意义

1.4.1 ATP 再生系统的研究进展

腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP), 简称三磷酸腺苷, 是生物能量载体, 在活细胞中驱动许多生物反应过程, 例如生物合成、运输、遗传信息处理和流动性等。ATP 通常被称为活细胞中的通用能量货币。它通过含化学能的分子 (例如碳水化合物、蛋白质、脂质) 的分解和光合作用捕获化学能, 然后释放其衍生物为其他细胞过程提供能量。ATP 是一种核苷酸, 由三个主要成分组成: 腺嘌呤、D-核糖和与 D-核糖结合的三个磷酸基团链。可用的化学能储存在磷酸基团之间的键中。在大多数情况下, ATP 会转化为二磷酸腺苷 (ADP), 释放能量和一种无机磷酸根离子。有时它会转化为单磷酸腺苷 (AMP), 释放能量和焦磷酸 (PPi)。大部分 ATP 通过上述过程从 ADP 再生^[72]。ATP 再生对所有生命活动都至关重要。

细胞呼吸和光合作用过程是自然界中最有效的 ATP 生产方式。现在构建 ATP 再生系统一般是通过分离出高产 ATP 的细胞器 (例如叶绿体、线粒体) 的方式。但是此种方法有比较明显的缺陷: (1) 分离细胞器需要消耗大量时间和成本; (2) 细胞器通常非常脆弱, 且使用时间有限, 进一步增加了成本。另一种方法是利用细菌的色素细胞, 如深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)^[73] 和光合细菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*)^[74] 来源的色素细胞均已被证明可以生产 ATP。然而, 这些 ATP 再生系统的效果仍然无法与活细胞或分离的酶相提并论。

当然, ATP 再生最简单的方法之一是利用体内系统, 即活细胞的自身存在的 ATP 再生或生产系统, 该方法无需提供额外的辅因子或底物^[75-76]。并且这些系统可利用不同的前体再生 ATP, 如腺苷、AMP 或 ADP 等, 因为在细胞中存在丰富的具有相应转化能力的酶。现在, 为了使得 ATP 在再生过程中可以更好地透过细胞膜吸收底物和释放产物, 通常使用通透性强的细胞或直接使用粗细胞提取物作为生产系统^[77]。

目前, 应用于 ATP 再生系统的酶主要分为两大类, 一类是腺苷酸激酶, 又被称为肌

激酶,可催化 ATP 与腺苷可逆性生成 ADP;另一类是腺苷激酶,可催化 ATP 与 AMP 可逆性生成 ADP^[78-79]。其中,在腺苷酸激酶中最早报道的酶是氨基甲酸激酶,其磷酸盐供体为氨基甲酰磷酸,可与 ADP 发生磷酸化反应生成 ATP,但是由于其磷酸盐供体在水中不稳定,这种方法的应用场景高度受限^[80]。现在最常用的应用于 ATP 再生系统的腺苷酸激酶是乙酸激酶,其以乙酰磷酸作为磷酸盐供体^[81]。20 世纪 70 年代,乙酸激酶就开始应用于甘油激酶或己糖激酶的生物催化反应以实现 ATP 的体外循环再生^[82-83]。此外,丙酮酸激酶也可用于 ATP 再生,其磷酸盐供体为磷酸烯醇丙酮酸 (PEP),而 PEP 是最昂贵的磷酸盐供体之一,因此当反应中需要大量使用 PEP 时,需要使用更廉价的前体提前合成 PEP,这也大大增加了操作过程的复杂性,限制了丙酮酸激酶在 ATP 再生方面的应用^[84]。现在,关于使用肌酸激酶应用于 ATP 再生系统的报道还较少,其磷酸盐供体为磷酸肌酸,但其未来前景良好,磷酸肌酸的价格低廉使其具有巨大的优势,因此肌酸激酶被认为是醋酸激酶或丙酮酸激酶非常合适的替代品^[85]。

最近,科学家开始关注多聚磷酸盐激酶 (PPK),其可催化 ATP 的磷酸盐残基可逆性地转移到无机聚磷酸盐 (PolyP)。PolyP 是一种由高能磷酸键连接的磷酸基单体的线性聚合物,存在于所有生物体中^[86-87],由于其低成本、易获得性和高稳定性, PolyP 已成为重要的磷酸盐供体。ATP 再生系统的构建与 PPK 催化功能密切相关。目前,大多数 PPK 根据其结构上和顺序上差异,可归类为两个大类。第一类是 PPK1,更偏好 ATP 作为底物,并且具有明显有利于 PolyP 合成而不是 ATP 合成的反应平衡(大肠杆菌的 PolyP 酶的合成与利用的比值为 4.1)^[85];第二类是 PPK2,更偏好 GDP 作为底物,并且具有明显有利于 NTP 合成而不是 PolyP 合成的反应平衡^[88]。系统发育序列分析表明, PPK2 比 PPK1 更古老^[89],两者在细菌中都是进化保守的^[89]。不同结构和序列的 PPK2 常用于 ATP 再生过程,因为它们具有影响核苷酸磷酸化的能力。PPK2 根据其磷酸核苷的不同可被分为三类^[90]: I 类优先催化 GDP/ADP 合成 GTP/ATP; II 类优先催化 GMP/AMP 合成 GDP/ADP; III 类可以磷酸化 GMP/AMP 和 GDP/ADP^[91]。目前,已有许多不同来源的 PPK2I 的结构和功能已得到表征,例如来自苜蓿根瘤菌的 Sm02148^[92]和铜绿假单胞菌的 PA0141^[93-94]。目前,还没有关于 PPK1 酶催化 AMP 磷酸化的报道。因此,迄今为止, PPK2II 是 PolyP 依赖性 AMP 磷酸化的唯一选择。PPK2III 类酶尚未用于 ATP 再生,但肯定会引起研究者的兴趣,因为其只需使用一种酶就可以实现催化 AMP 生成 ATP 的两个磷酸化步骤。而在本研究中, PanC 催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸缩合生成 D-泛酸的反应高度依赖于 ATP,且其将会将 ATP 转化为 AMP,因此迫切需要找到一个高效的 PPK 以实现 AMP 到 ATP 的转化,在体内构建起 ATP 再生系统。

1.4.2 ATP 再生系统的意义

Liao 等^[95]通过在与酿酒酵母耦合的 ATP 再生系统中改变大肠杆菌的腺苷代谢来增强谷胱甘肽的生产。在这项研究中,通过使用啤酒酵母 WSH2 的糖酵解途径作为腺苷和葡萄糖的 ATP 再生器,利用大肠杆菌 JM109 (pBV03) 结合 ATP 再生系统生产谷胱甘肽。结果大肠杆菌 JM109 (pBV03) 将腺苷不可逆地转化为次黄嘌呤,表明偶联 ATP 再生系统中谷胱甘肽的产生较少是由于 ATP 产生效率低下。此研究提供了一种策略,可通

过提高耦合的 ATP 再生系统以提高谷胱甘肽产量的效率。

Xiao 等^[96]通过使用 D-聚蔗糖差向异构酶和 L-鼠李糖激酶,建立了一种从 D-果糖高转化得到 D-阿洛糖而不需要繁琐的异构体分离步骤的方法。在本研究中,开发了与多磷酸激酶偶联的 ATP 再生系统,与没有 ATP 再生系统的情况相比,ATP 的使用量可以减少到理论用量的 1/10。该报道的 ATP 生物合成系统提供了一个潜在且有前途的平台,可以以较低的 ATP 成本将 D-果糖转化为 D-阿洛糖。

Yan 等^[97]设计并开发了一种使用体外 ATP 再生系统生成迷迭香酸的方法。在搭建的微生物生产模块化平台中,偶联 *AjPPK2* 和 *SmPPK2* 酶,将 AMP 成功转化为 ATP,不需要添加许多辅助因子。最终,通过双循环再生系统将迷迭香酸的生产力提升了 70 多倍,达到了 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。该 ATP 再生系统具有高稳定性和低成本的优点,证明了使用 ATP 依赖性酶进行可持续性反应的能力。

总之,开发具有低成本、高转化速率、长使用寿命、良好相容性和稳健性的 ATP 再生或合成系统是级联生物催化和合成生物学的自下而上策略之一。从目前来看,PPK 及其应用是酶促 ATP 再生的首选,而建立基于酶的 ATP 再生系统,最关键在于提高系统的温度稳定性、pH 耐受性以及一系列广泛的生物反应条件的相容性。在本研究中,*PanC* 在 ATP 存在下催化 D-泛解酸和 β -丙氨酸缩合生成 D-泛酸,因此 ATP 是限制多酶级联反应产量和产率提高的关键因素。已有的研究^[41,71]使用生长中的细胞进行生物催化转化,以通过细胞自身生产 ATP,但边发酵边转化会造成副产物的积累和生产效率的下降。因此引入基于 PPK 的 ATP 再生系统对于高产 D-泛酸细胞工厂的构建具有重要的意义。

1.5 课题的立题依据及意义

(1) 立题依据

D-泛酸也称作维生素 B5,无臭,味微苦,是活细胞中 CoA 合成的关键前体,也是生命必需的维生素^[98]。一般认为 D-泛酸与皮肤和头发的生长状态相关,当皮肤和头发干燥或缺乏光泽时,通过补充 D-泛酸可改善皮肤和头发状态;另外,D-泛酸还是制造抗体的重要前体,可以提高机体的抵抗力,临床上用于缓和抗生素的毒副作用和治疗过敏症状。

维生素 B5 可以由微生物和植物合成,但不能由人类和其他动物合成,已广泛应用于饲料、食品添加剂^[15]、化妆品和制药行业^[99-100]。其中,动物饲料行业的需求最大,占到总需求的 3/4。随着我国农业强国和乡村振兴政策的出台和实施,动物饲料行业的下游需求还在不断扩大。当然,居民人均可支配收入的增加使得社会大众对于保健品和化妆品的需求也在逐渐增加。目前,全球主要的维生素 B5 生产厂家共有 6 家,其中 4 家为中国企业。D-泛酸的全球总产能约为 3000 t,国内产能约为 2400 t,占全球 4/5 的份额。总的来说,D-泛酸具有良好的市场前景。

目前,市场上的 D-泛酸生产大多依赖于化学合成工艺,需要使用剧毒物质,如氢氰酸或氰化钠,以及后续会产生大量含氰废水,污染水源^[101]。因此,随着市场对 D-泛酸

需求的增加和环保政策的实施，迫切需要建立起一种环保、可持续的 D-泛酸生产新方法。生物催化领域的发展使得更加复杂且涉及多酶级联转化的生物催化系统被成功开发^[102]。这些生物催化过程被组装在单个反应容器中，可以在温和的反应条件下完成困难的化学反应，产生最少的废物，因此具有良好的经济效益。现在，多酶级联转化已成功应用于天然代谢物或异质新产品的生物合成^[25]，如三肽谷胱甘肽^[103]、香豆酸^[104]、昆布二糖^[105]、肌醇^[106]和 2,3-丁二醇^[106]。因此，从工业化角度来看，我们迫切需要且具备一定的技术基础，开发一个多酶级联转化系统，使多酶转化制备 D-泛酸变为现实。

（2）立题意义

（i）本文采用的多酶转化法以 D-泛解酸和低附加值的富马酸作为底物合成具有高附加值的 D-泛酸，较单酶转化法，降低了反应成本，有利于实现多酶转化法制备 D-泛酸的工业化应用。同时一锅法生产 D-泛酸，解决了多步反应面临的中间产物的分离纯化问题，适应了绿色生产的发展趋势。

（ii）在多酶级联反应中，通过双质粒共表达、pET 表达质粒改造和基因重复表达策略精准调控多酶之间酶活比例，为其他全细胞多酶级联反应中多酶间协同性的调控提供了参考。

（iii）通过使用铜绿假单胞菌来源的多聚磷酸盐激酶实现 ATP 的循环再生，为需要额外添加用于基团转移辅助因子（如 ATP 或 SAM）以及氧化还原辅助因子的多酶级联转化系统的构建奠定基础。

1.6 课题的主要研究内容

本实验在实验室前期工作的基础上，在大肠杆菌 BL21 菌株中异源表达 L-天冬氨酸酶、L-天冬氨酸- α -脱羧酶和泛酸合成酶，结合双质粒表达、pET 表达质粒改造和基因重复表达策略，协调三种酶的表达强度，并通过引入 ATP 再生系统来实现 ATP 的免外源添加，最后，通过全细胞催化体系的优化，建立最佳生物转化体系，实现 D-泛酸的高产，以为 D-泛酸的酶法生产做出力所能及的贡献并为相关研究提供参考。

本论文主要内容如下：

（1）D-泛酸生产的三酶级联途径设计。以实验室原有 BsPanD^{E56S} 为基础，分别向前向后拓展级联途径。筛选不同来源的 AspA，进行比酶活的比较，探究富马酸到 L-天冬氨酸的转化能力，获得转化能力最强的 AspA；筛选不同来源的 PanC，进行比酶活的比较，探究 β -丙氨酸到 D-泛酸的转化能力，获得转化能力最强的 PanC。

（2）AspA、PanD 和 PanC 的最佳体外酶活比例的确定。将筛选得到转化效率最高的 CgAspA 和 BbPanC，与 BsPanD^{E56S} 分别进行诱导表达并纯化，体外转化实验验证体外级联途径的可行性。通过调节三种酶之间的酶活比例，有效优化该体外系统。

（3）体内三酶级联途径的建立及优化。将酶活性较差的编码 BsPanD^{E56S} 的基因单独在 pET-28a(+) 上表达，编码 CgAspA 和 BbPanC 的基因在质粒 pETDuet-1R 上表达，双质粒表达策略实现了 BsPanD^{E56S} 表达水平的提高，通过 pET 表达质粒改造和基因重

复表达策略，进一步调节三酶之间的酶活比例，减少中间产物 L-天冬氨酸的积累，增加 D-泛酸的产量。

(4) ATP 再生系统的引入。利用实验室已有的高效转化 AMP 生成 ATP 的 PPK 构建 ATP 再生体系，实现无额外添加 ATP 情况下 D-泛酸的高产。

(5) D-泛酸生产体系的优化及放大。对多酶级联转化富马酸和 D-泛解酸生产 D-泛酸的生产体系的相关变量进行优化，在最佳转化条件下，验证其转化富马酸和 D-泛解酸生产 D-泛酸的能力；在放大水平（1 L 转化体系）验证该菌株的放大生产能力，为建立规模化的多酶转化法生产 D-泛酸的工艺路线奠定基础。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、菌株及引物

本研究中所涉及的菌株、质粒和用于目的基因克隆的引物及其详细信息见表 2-1、2-2。

表 2-1 本研究使用的质粒和菌株
Tab. 2-1 The plasmids and strains used in the work

质粒/菌株	特性	来源
pET-28a (+)	His 标签、Kan ^r 、T7 启动子，长度为 5369 bp	实验室保藏
pET-Duet-1R	His 标签、Amp ^r 、T7 双启动子，长度为 5420bp	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-BsPanD ^{E56S}	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-BsPanD ^{E56S} ，Kan ^r	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-EcAspA	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-EcAspA，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-CgAspA	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-CgAspA，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-BsAspA	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-BsAspA，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-BbPanC	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-BbPanC，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-BsPanC	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-BsPanC，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-EcPanC	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-EcPanC，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-CgPanC	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-CgPanC，Kan ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> BL21/ pET28a-PaPanC	<i>E. coli</i> BL21 含有 pET28a-PaPanC，Kan ^r	本研究构建
PL-01	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-BsPanD ^{E56S} -BbPanC-CgAspA，Amp ^r	本研究构建
PL-02	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a-BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建
PL-03	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{T7pCONS} -BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建
PL-04	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{TIR-1} -BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建
PL-05	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{TIR-2} -BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建
PL-06	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{T7pCONS+TIR-1} -BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建
PL-07	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{T7pCONS+TIR-2} -BsPanD ^{E56S} ，Amp ^r ，Kan ^r	本研究构建

表 2-1 本研究使用的质粒和菌株 (续)

Tab. 2-1 The plasmids and strains used in the work (continued)

菌株/质粒	特性	来源
PL-08	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{TIR-1} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} , Amp ^r , Kan ^r	本研究构建
PL-09	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{TIR-1} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} , Amp ^r , Kan ^r	本研究构建
PL-10	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-BbPanC、pET28a ^{TIR-1} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} , Amp ^r , Kan ^r	本研究构建
PL-11	<i>E. coli</i> BL21 含有 pETDuet-CgAspA-PaPPK-BbPanC、pET28a ^{TIR-1} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} -BsPanD ^{E56S} , Amp ^r , Kan ^r	本研究构建

表 2-2 本研究使用的引物

Tab. 2-2 The primers used in this work

引物	序列 (5'→3')
NdeI-EcAspA-F	CGCGGCAGCCATATGATGTCTAAGACGAGC
NheI-EcAspA-R	ACCAGTCATGCTAGCTTAGTTCTCCAAGTA
NdeI-BsAspA-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGTTAAACGGCCAAAAAGA
NheI-BsAspA-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTTATTTTCTAATAGTTCTT
NdeI-CgAspA-F	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTTAGTTCTCCAAGTAGAGCC
NheI-CgAspA-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTTAGTTCTCCAAGTAGAGCC
NdeI-BbPanC-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGATGCAAACAATGATGCA
NheI-BbPanC-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCCTACTTGATTGATGTTATCG
NdeI-CgPanC-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGCAGTTAGCAACCACAAA
NheI-CgPanC-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCCTAGAGCTCGATATTGTCGA
NdeI-EcPanC-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGTTAATTATCGAAACCCT
NheI-EcPanC-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTTACGCCAGCTCGACCATT
NdeI-BsPanC-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGAGACAGATTACTGATAT
NheI-BsPanC-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTTATATTCTCTCCATTTCTC
NdeI-PaPanC-F	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGTTTGAATCCGCGGAAGT
NheI-PaPanC-R	TGTCCACCAGTCATGCTAGCTCACTTGTCCTTCTTGACG
NdeI-BsPanD ^{E56S} -F	CGCGGCAGCCATATGATGTATCGAACAATG
NheI-BsPanD ^{E56S} -R	ACCAGTCATGCTAGCATACAAAATTGTACG
NdeI-BbPanC-F	CGCGGCAGCCATATGATGATGCAAACAATG
NheI-EcPanC-R	ACCAGTCATGCTAGCCTACTTGATTGATGT
NdeI-CgAspA-F	AAGAAGGAGATATACATATGATGTCTAAGACGAGCAACAA
XhoI-CgAspA-R	GTTTCTTTACCAGACTCGAGTTAGTTCTCCAAGTAGAGCC
PstI-BsPanD ^{E56S} -F	CGAGCTCGGCGCGCCTGCAGATGTATCGAACAATGATGAG
Sall-BsPanD ^{E56S} -R	GCGGCCGCAAGCTTGTCGACCTACAACCTATGTACGGGCTG
HindIII-BbPanC-F	AGTTGTAGGTCGACAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGG
NotI-BbPanC-R	CTTAAGCATTATGCGGCCGCTACTTGATTGATGTTATCG
PstI-EcBbPanC-F	CGAGCTCGGCGCGCCTGCAGATGTATGCAAACAATGATGCA
Sall-BbPanC-R	GCGGCCGCAAGCTTGTCGACCTAATTGATTGATGTTATCG

表 2-2 本研究中使用的引物 (续)
Tab. 2-2 The primers used in this work (continued)

引物	序列 (5'→3')
<i>NdeI</i> -CgAspA-F	AAGAAGGAGATATAC <u>ATATG</u> ATGTCTAAGACGAGCAACAA
<i>XhoI</i> -CgAspA -R	GTTTCTTTACCAGAC <u>CTCGAG</u> TTAGTTCTCCAAGTAGAGCC
T7p ^{CONS} -F	ACGACTCACTATAGGGAGAGGAATTGTGAGCGGA
T7p ^{CONS} -R	TCCGCTCACAATTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGT
TIR-1-F	GTTATCATGGGTAGCAGCCATCATCATCATCATCA
TIR-1-R	GCTACCCATGATAACTCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
TIR-2-F	GCAGCTATCCAGCTTAGCCATCATCATCATCATCA
TIR-2-R	AAGCTGGATAGCTGCTCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
<i>NheI</i> -copy-2-F	CTAGCTAGC <u>ATGTAT</u> CGAACAATGA
<i>Bam</i> HI-copy-2-R	CGCGGATCCCTACAAAATTGTACGG
<i>Eco</i> RI -copy-3-F	CCGGAATTCATGTATCGAACAATGATG
<i>Sall</i> -copy-3-R	TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACGTCGACCTACAAAATTGTACGGGCT GGTTCG
<i>Hind</i> III-copy-4-F	CCC <u>AAGCTT</u> ATGTATCGAACAATGATGAGC
<i>Not</i> I-copy-4-R	TTTTCTTTTGC GGCCGCTACAAAATTGTACGGGC
<i>Hind</i> III- <i>Pa</i> PPK-F	GCCTGCAGGTCGACA <u>AAGCTT</u> ATGTTCGAATCCGCG
<i>Not</i> I- <i>Pa</i> PPK-R	CTTAAGCATTATGCGGCCGCTCACTTGTCTTCTT
pETDuet-F	TCCGGCGTAGAGGATCGAGAT
pETDuet-R	TGGCGTTCAAATTTTCGCAGCA
pETDuet- <i>BsPanD</i> ^{E56S} -R	TTATGCGGCCGCAAGCTT

注：下划线为限制性酶切位点

2.1.2 主要实验仪器

本研究中所使用的主要实验仪器见表 2-3。

表 2-3 本研究中所使用的实验仪器
Tab. 2-3 The experimental instruments used in this study

实验仪器	生产厂家
PCR 仪	杭州博日科技股份有限公司
核酸电泳仪	韦克斯科技有限公司
凝胶成像仪	英国 UVP 有限公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
冷冻离心机	HITACHI 公司
台式高速 Sigma 离心机	美国 Sigma 公司
恒温培养箱	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
恒温水浴锅	精宏电子科技有限公司
振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
电子天平	苏州赛恩斯仪器有限公司

表 2-3 本研究所使用的实验仪器（续）

Tab. 2-3 The experimental instruments used in this study (continued)

实验仪器	生产厂家
紫外可见分光光度计	尤尼柯（上海）仪器有限公司
精密 pH 计	Mettler-Toledo 有限公司
5 L 发酵罐	迪必尔公司
安捷伦高效液相	安捷伦科技（中国）有限公司

2.1.3 主要培养基

本研究中所使用的主要培养基见表 2-4。

表 2-4 本研究使用的培养基

Tab. 2-4 The mediums used in this work

培养基种类	配方	灭菌条件
LB 培养基	蛋白胨 10 g·L ⁻¹ , NaCl 10 g·L ⁻¹ , 酵母粉 5 g·L ⁻¹ ; 固体培养基另外加入琼脂粉 20 g·L ⁻¹	121°C 高压灭菌 15 min
种子培养基	酵母粉 10 g·L ⁻¹ , 蛋白胨 6 g·L ⁻¹ , KH ₂ PO ₄ 1.2 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O 10 mg·L ⁻¹ , MnSO ₄ 10 mg·L ⁻¹ , V _{B1} 1.3 mg·L ⁻¹ , V _H 0.3 mg·L ⁻¹ (pH 7.0)	115°C 高压灭菌 20 min
发酵培养基	酵母粉 2 g·L ⁻¹ , 蛋白胨 4 g·L ⁻¹ , KH ₂ PO ₄ 2 g·L ⁻¹ , 柠檬酸钠 1 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.7 g·L ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O 100 mg·L ⁻¹ , MnSO ₄ 100 mg·L ⁻¹ , V _{B1} 0.8 mg·L ⁻¹ , V _H 0.2 mg·L ⁻¹ (pH 7.0)	115°C 高压灭菌 20 min

2.1.4 主要实验试剂

本研究中所使用的主要实验试剂见表 2-5。其他未经特殊说明的试剂购自国药集团有限公司。

表 2-5 本研究中所使用的实验试剂

Tab. 2-5 The experimental reagents used in this study

实验试剂	生产厂家
质粒提取试剂盒、基因组提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒	南京诺唯赞生物科技有限公司
ClonExpress II One Step Cloning Kit、2×Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技有限公司
大肠杆菌感受态试剂盒	大连海宝生物技术有限公司
限制性内切酶（ <i>NotI</i> 、 <i>NheI</i> 、 <i>BamHI</i> 等）	大连海宝生物技术有限公司
DNA Marker、蛋白 Marker	大连海宝生物技术有限公司
富马酸、L-天冬氨酸、β-丙氨酸、D-泛酰内酯、D-泛酸钠、氢氧化钠、六偏磷酸钠、腺嘌呤核苷三磷酸等	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
酵母粉和蛋白胨	英国 Oxoid 公司
抗生素、溶菌酶和 IPTG 等	生工生物工程（上海）有限公司
高效液相级甲醇和乙腈	北京沃凯生物科技有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 质粒抽提和基因组 DNA 的提取

质粒抽提和基因组 DNA 的提取均采用南京诺唯赞公司商品化试剂盒，具体操作步骤按照其说明书进行。

2.2.2 目的基因的克隆及 PCR 扩增产物的回收

(1) 目的基因的克隆

以 NCBI 数据库中的基因序列作为参照，利用 SnapGene 软件设计上下游引物，将获得目的基因序列 *EcAspA* (CDS: BAE78141.1), *BsAspA* (CDS: AIY97984.1), *CgAspA* (CDS: AUI00557.1), *BbPanC* (CDS: AWX55948.1), *CgPanC* (CDS: AUH99748.1), *EcPanC* (CDS: BAE76042.1), *BsPanC* (CDS: AIY97872.1), *BbPanC* (CDS: AWX55948.1), *PaPanC* (CDS: ABJ14113.1) 和 *PaPPK* (CDS: QKR29896.1) 插入质粒 pET-28a (+) 中，具体引物信息见表 2-2，配制 PCR 反应体系 (50 mL)，如表 2-6 所示，按照表 2-7 的 PCR 反应程序进行目的基因的克隆。

表 2-6 PCR 反应体系
Tab. 2-6 PCR amplification system

名称	体积 (μL)
模板 (基因片段、质粒或基因组)	1
上游引物	2
下游引物	2
DNA 聚合酶 (2×Phanta Max Master Mix)	25
去离子水	20

表 2-7 PCR 反应程序
Tab. 2-7 The reaction program of PCR

程序	温度 (°C)	时间 (min)
预变性	95	5
变性	98	10
退火	55	30
延伸	72	1~2
终延伸	72	10

注：变性、退火、延伸循环 28-30 次

(2) PCR 扩增产物回收

目的基因扩增完成后，对 PCR 扩增产物进行琼脂糖核酸凝胶电泳，电泳结束后切胶。PCR 扩增产物的回收采用南京诺唯赞公司的商业化 DNA 胶回收试剂盒，具体操作步骤按照其说明书进行。

2.2.3 感受态细胞的制备及转化方法

(1) 感受态细胞的制备

大肠杆菌 *E. coli* BL21 感受态细胞的制备采用大连海宝公司商品化大肠杆菌感受态试剂盒，具体操作步骤按照其说明书进行。

(2) 转化方法

冰上融化感受态细胞，将外源 DNA 加入感受态细胞中，轻弹管壁混合均匀，冰上放置 30 min；42℃热激 60-90 s，冰上放置 2 min；加入不含抗生素的 LB 培养基，37℃复苏 1 h；在室温下将复苏液 6000 r·min⁻¹ 离心 3 min 后弃部分上清液，重悬后涂布于对应抗性的 LB 固体培养基，37℃过夜培养；次日，挑选转化子进行菌落 PCR 验证。

2.2.4 重组质粒和重组菌的构建

(1) 单基因表达载体的构建

以 pET28a-*EcAspA* 表达载体的构建过程为例，简要说明本研究中单基因表达载体的构建方法。以大肠杆菌 *E. coli* BL21 的基因组为模板，利用引物 *NdeI-EcAspA-F* 和 *NheI-EcAspA-R*，进行目的基因的克隆和 PCR 产物的回收，获得纯化的添加同源臂的 *EcPanD* 基因片段；利用 *NdeI* 和 *NheI* 内切酶将 pET-28a (+) 质粒进行过双酶切，双酶切反应体系如表 2-8 所示。将双酶切后的质粒纯化，然后将 DNA 片段与线性化质粒 pET-28a (+) 进行同源重组，37℃连接 45min，同源重组反应体系如表 2-9 所示。连接产物通过化学转化法转化至 BL21 感受态细胞中，挑取单菌落进行 PCR 验证，阳性转化子（即 PCR 核酸胶结果中出现正确大小的条带）进行基因测序（委托苏州金唯智生物科技有限公司），测序结果与理论序列一致，证明单基因表达载体 pET28a-*EcAspA* 构建成功。

表 2-8 双酶切反应体系

Tab. 2-8 Double digestion reaction system

名称	体积 (μL)
pET-28a (+) 质粒或基因片段	41
<i>NdeI</i> 内切酶	2
<i>NheI</i> 内切酶	2
10× Green buffer	5

表 2-9 同源重组反应体系

Tab. 2-9 Homologous recombination reaction system

名称	体积 (μL)
线性化 pET-28a (+) 质粒	5
添加同源臂的基因片段	2
同源重组酶	2
同源重组 buffer	4
去离子水	7

(2) 多基因表达载体的构建

多基因表达载体的构建方法和单基因表达载体的构建方法相同,通过引物(见表 2-2)扩增目的基因,获得添加了同源臂的目的基因片段,与使用对应的限制性内切酶线性化处理过的单基因表达载体进行同源重组,37°C 酶连 45 min,连接产物通过化学转化法转化至 BL21 感受态细胞中,挑取单菌落进行 PCR 验证,阳性转化子进行测序,测序结果与理论序列一致,证明多基因表达载体构建成功。

pET 表达质粒改造是通过在 pET-28a (+) 质粒的 T7 启动子上添加完整的 T7 共识序列(T7p^{CONS})或优化翻译起始区(TIR)序列构建的,具体参照文献^[107]所述方法进行。

基因重复表达菌株的质粒是通过酶切连接构建的。以 pET28a^{TIR-1}-BsPanD^{E56S}-BsPanD^{E56S} 的构建过程为例,简要说明本研究中基因重复表达菌株的质粒的构建方法,具体过程如下:将 pET28a^{TIR-1}-BsPanD^{E56S} 质粒上从 T7 启动子至 BsPanD^{E56S} 基因的片段命名为 T7^{TIR}-BsPanD^{E56S},使用引物 *NheI*-copy-2-F 和 *Bam*HI-copy-2-R 进行 PCR 扩增目的基因(基因两端酶切位点为 *NheI* 和 *Bam*HI),经过胶回收获得目的基因 T7^{TIR}-BsPanD^{E56S},将其用 *NheI* 和 *Bam*HI 限制性内切酶进行双酶切,胶回收获得目的片段,与使用相同酶切位点双酶切的 pET28a^{TIR-1}-BsPanD^{E56S} 质粒进行酶切连接,目的基因与载体的酶切连接体系(10 μL)如表 2-10 所示,连接产物转化至 BL21 感受态细胞中,挑取单菌落进行 PCR 验证,阳性转化子进行测序,测序结果与理论序列一致,证明基因重复表达菌株的质粒构建成功。

表 2-10 目的基因与载体的酶切连接程序
Tab. 2-10 connection system with T-simple vector

名称	体积 (μL)
目的片段	5
载体	1
T ₄ DNA 连接酶	0.5
10×T ₄ 缓冲液	1
去离子水	2.5

2.2.5 关键酶的诱导表达及蛋白纯化

将重组大肠杆菌 *E.coli* BL21/pET28a-*EcAspA*、*E.coli* BL21/pET28a-*CgAspA*、*E.coli* BL21/pET28a-*BsAspA*、*E.coli* BL21/pET28a-*EcPanC*、*E.coli* BL21/pET28a-*CgPanC*、*E.coli* BL21/pET28a-*BsPanC*、*E.coli* BL21/pET28a-*BbPanC*、*E.coli* BL21/pET28a-*PaPanC* 分别接种至 Kan 抗性(终浓度 100 mg·L⁻¹)的 10 mL LB 液体培养基中,37°C、200 r·min⁻¹ 过夜培养,按 1% (V/V) 的接种量转接至 Kan 抗性(终浓度 100 mg·L⁻¹)的 100 mL LB 液体培养基中,37°C、200 r·min⁻¹ 培养,当培养液浓度(OD₆₀₀)达到 0.6-0.8 时(约 2 h),通过添加 IPTG(终浓度 0.5 mmol·L⁻¹),在 16°C、200 r·min⁻¹ 过夜培养,启动目标蛋白表达。

诱导结束后,利用冷冻离心机在 4°C、6000 r·min⁻¹ 下高速离心 5 min 收集菌体,重

悬于 PBS 缓冲液 (KH_2PO_4 27 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 Na_2HPO_4 1.42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KCl 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) 中, 重复 2 次, 重悬于 5 mL PBS 缓冲液中, 并使用超声破碎仪破碎细胞, 细胞破碎液利用冷冻离心机在 4°C、12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下高速离心 10 min, 去沉淀, 获得粗酶液。

使用配备 His-Trap™ HP 层析柱 (1 mL, GE Life Sciences, 瑞典) 的 AKTA Prime 蛋白纯化仪 (GE Healthcare, 瑞典) 纯化蛋白, 具体步骤如下: 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤粗酶液, 滤液 4°C 保藏备用; 在 4°C 低温条件下, 向镍离子亲和层析柱里注入 10 mL 超纯水以充分冲洗层析柱; 加入 10 mL M_0 缓冲液 (500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.4) 以平衡层析柱, 使用 M_0 缓冲液冲洗层析柱至流出液的 pH 值达到 7.4 (约 5 mL M_0 缓冲液); 将经过预处理的粗酶液注入柱子; 用 M_0 缓冲液冲洗柱子至基线平衡以去除杂蛋白; 使用 M_{500} 缓冲液 (500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.4) 进行梯度洗脱, 收集吸收峰处对应的洗脱液, 通过 SDS-PAGE 蛋白胶验证蛋白纯化效果。

2.2.6 酶活测定

(1) L-天冬氨酸酶 (AspA) 的酶活 AspA 的酶活的定义: 每分钟反应生成 1 μmol L-天冬氨酸钠所需的 AspA 的酶量为一个酶活力单位 (U); 其酶活测定体系 (2 mL) 为适量纯酶液、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 富马酸、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8); 反应条件: 37°C 水浴孵育 10 min (反应前预热酶活测定体系中除酶液以外成分), 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸溶液终止反应。

(2) L-天冬氨酸- α -脱羧酶 (PanD) 的酶活 PanD 的酶活的定义: 每分钟产生 1 μmol β -丙氨酸所需的 PanD 的酶量为一个酶活力单位 (U); 酶活测定体系 (1 mL) 为适量纯酶液、38 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 天冬氨酸和 90 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (用 NaOH 调节 pH 到 7.0); 反应条件: 37°C 水浴孵育 20 min (反应前预热酶活测定体系中除酶液以外成分), 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸溶液终止反应。

(3) 泛酸合成酶 (PanC) 的酶活 PanC 的酶活的定义: 每分钟产生 1 μmol D-泛酸所需 PanC 的酶量为一个酶活力单位 (U); 酶活测定体系 (1.1 mL): 适量纯酶液、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-泛解酸钠盐、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -丙氨酸、4.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 和 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2); 反应条件: 37°C 水浴孵育 20 min (反应前预热酶活测定体系中除酶液以外成分), 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸溶液终止反应。

蛋白浓度采用 Bradford 法测定^[108]。

2.2.7 部分酶学性质的测定

(1) 最适温度

(i) L-天冬氨酸酶的最适反应温度 AspA 最适反应温度的测定体系 (2 mL): 30 μL 纯酶液、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 富马酸、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.8); 自变量: 温度, 控制温度范围为 25-75°C, 梯度间隔为 5°C, 此外还设置了 37°C; 反应条件: 设置 3 个平行实验组, 反应 10 min, 使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸终止反应。

(ii) L-天冬氨酸- α -脱羧酶的最适反应温度 PanD 最适反应温度的测定体系 (1 mL):

30 μL 纯酶液、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-天冬氨酸和 90 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液；自变量：温度，控制温度范围为 25-75 $^{\circ}\text{C}$ ，梯度间隔为 5 $^{\circ}\text{C}$ ，此外还设置了 37 $^{\circ}\text{C}$ ；反应条件：设置 3 个平行实验组，反应 20 min，使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸终止反应。

(iii) 泛酸合成酶的最适反应温度 PanC 最适反应温度的测定体系 (1.1 mL)：30 μL 纯酶液、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-泛解酸钠、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -丙氨酸、4.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 和 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2)；自变量：温度，控制温度范围为 25-75 $^{\circ}\text{C}$ ，梯度间隔为 5 $^{\circ}\text{C}$ ，此外还设置了 37 $^{\circ}\text{C}$ ；反应条件：设置 3 个平行实验组，反应 20 min，使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸终止反应。

(2) 最适反应 pH 最适反应 pH 的测定体系：与最适反应温度的测定体系相同；自变量：pH，采用柠檬酸缓冲液 (pH 4.0-5.5)、磷酸盐缓冲液 (pH 5.5-8.0) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0-9.0)，控制 pH 范围为 pH 4.0-9.0，pH 的梯度为 0.5；反应条件：设置 3 个平行实验组，反应 (AspA: 10 min; PanD、PanC: 20 min)，使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸终止反应。

(3) 温度稳定性 测定体系：与最适温度的测定体系相同；自变量：温度，控制温度范围为 30-50 $^{\circ}\text{C}$ ，梯度间隔为 5 $^{\circ}\text{C}$ ，此外还设置了 37 $^{\circ}\text{C}$ ；反应条件：设置 3 个平行实验组，保温 12 h，反应 (AspA: 10 min; PanD、PanC: 20 min)，使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸终止反应，在最适反应温度和最适 pH 下，测定保温前后的比酶活，将保温前的比酶活 (100%) 设置为对照组，计算得到不同温度下的剩余比酶活。

(4) pH 稳定性 测定体系：与最适温度的测定体系相同；自变量：pH，控制 pH 值分别为 6.0-6.5、6.5-7.0、7.0-7.5、7.5-8.0 和 8.0-8.5；反应条件：设置 3 个平行实验组，保温 12 h，反应 (AspA: 10 min; PanD、PanC: 20 min)，使用 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氯乙酸终止反应，在最适反应温度和最适反应 pH 下，测量放置前后的比酶活，以放置前的比酶活 (100%) 设置为对照组，计算得到不同 pH 下剩余比酶活。

2.2.8 重组菌株的全细胞转化

按照 2.2.6 的实验方法进行诱导，收集细胞，将收集到的菌体用于进行全细胞转化。三酶级联反应在 500 mL 摇瓶 (100 mL 工作体积) 或 5 L 反应器 (1 L 工作体积) 中进行。

(1) 富马酸和 D-泛解酸向 D-泛酸转化的初步尝试：30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 湿细胞、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、pH 7.0 和 37 $^{\circ}\text{C}$ ，转化总时长为 36 h，向反应体系中加入底物富马酸、ATP 和 D-泛解酸制备液，同时富马酸、ATP 与 D-泛解酸制备液的分子量比为 1:1:1。

(2) 全细胞转化富马酸和 D-泛解酸生产 D-泛酸的转化条件优化：

(i) 催化剂浓度 自变量：催化剂浓度 (10、20、30、40、50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)；应变量：全细胞体系转化富马酸和 D-泛解酸生成 D-泛酸的产量；控制变量：温度 37 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 7.0，单次投料。

(ii) 反应 pH 自变量：反应 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)；应变量：全细胞体系转化富马酸和 D-泛解酸生成 D-泛酸的产量；控制变量：催化剂浓度 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，温度 37 $^{\circ}\text{C}$ ，单次投料。

(iii) 反应温度 自变量: 反应温度 (25、30、35、37、40、45℃); 应变量: 全细胞体系转化富马酸和 D-泛解酸生成 D-泛酸的产量; 控制变量: 催化剂浓度 30 g·L⁻¹, pH 7.0, 单次投料。

(iv) 投料方式 自变量: 投料方式条件 (分批培养、补料分批培养); 应变量: 全细胞体系转化富马酸和 D-泛解酸生成 D-泛酸的产量; 控制变量: 催化剂浓度 30 g·L⁻¹, pH 7.0, 温度 35℃。

(3) 生物转化实验最佳条件: 30 g·L⁻¹ 湿细胞、50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、10 mmol·L⁻¹ AMP、100 mmol·L⁻¹ 六偏磷酸钠、pH 7.0 和温度 35℃。转化总时长为 30 h, 每 6 h 向反应体系中加入底物富马酸和 D-泛解酸制备液, 同时富马酸与 D-泛解酸制备液的分子量比例保持在 1:1。通过定时补充纯氨水, 将生物转化体系的 pH 值控制在 pH 7.0。

转化结束后, 利用冷冻离心机在 4℃、12000 r·min⁻¹ 下高速离心 10 min, 取上清液稀释合适倍数用于 HPLC 检测, 检测底物富马酸、D-泛解酸 (与富马酸等比例投料, 为了方便检测, 一般仅检测富马酸产量), 中间产物 L-天冬氨酸、β-丙氨酸和最终产物 D-泛酸的含量。

2.2.9 全细胞转化底物及产物的检测方法

底物富马酸, 中间产物 L-天冬氨酸、β-丙氨酸和产物 D-泛酸的浓度采用 Agilent LC1260 HPLC 系统测定。富马酸的测定方法参考文献^[109]。检测所需的流动相为 5 mmol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液。色谱条件为: 有机酸分析柱 (Bio-Rad Amine HPX-87H 柱, 300 mm×7.8 mm), 55℃, 0.6 mL·min⁻¹, 210 nm。

L-天冬氨酸、β-丙氨酸的测定方法参考文献^[49]。检测所需的流动相为 A 相和 D 相。A 相为 225 μL·L⁻¹ 三乙胺和 8 g·L⁻¹ 乙酸钠溶液 (用磷酸调节 pH 至 7.2), 之后再加入 5 mL·L⁻¹ 四氢呋喃。D 相为 6 g·L⁻¹ 乙酸钠溶液 (用磷酸调节 pH 至 7.2), 40% (V/V) 甲醇, 40% (V/V) 乙腈。氨基酸的 HPLC 分析通过 OPA/FMOC 在线衍生化确定。色谱条件为: C18 色谱柱 (5 μm, 4.6×250 mm, Agilent, 美国), 40℃, 1 mL·min⁻¹, 338 nm, A 和 D 相梯度洗脱。在梯度洗脱程序开始时, A 相为 92% (V/V), D 相为 8% (V/V)。在最初的 27.5 min 内, D 相以恒定速率上升到 60% (V/V), 到 31.5 min 时, D 相上升到 100% (V/V) 并维持 2.5 min, 最后在 1.5 min 内减少至 8% (V/V)。

D-泛酸的测定方法参考文献^[41]。检测所需的流动相为 95% (V/V) 50 mmol·L⁻¹ NH₄H₂PO₄ 缓冲液 (用磷酸调节 pH 至 3.0) 和 5% (V/V) 的乙腈, 色谱条件为: C18 色谱柱 (5 μm, 4.6×250 mm, Agilent, 美国), 25℃, 0.5 mL·min⁻¹, 210 nm。

第三章 结果与讨论

3.1 D-泛酸生产的三酶级联途径设计

3.1.1 级联路径的设计

大多数微生物包括大肠杆菌都能合成 D-泛酸。D-泛酸的生物合成是通过非线性生物合成途径完成的,该途径由两部分组成: β -丙氨酸和(R)-泛解酸生物合成途径^[110]。

(R)-泛解酸主要是由大肠杆菌中的六种酶,从丙酮酸出发合成的,包括乙酰羟酸合酶(AHAS)、*ilvC* 编码的酮醇酸还原异构酶(KARI)、*ilvD* 编码的二羟酸脱水酶(DAD)、*panB* 编码的酮异戊酸羟甲基转移酶(KPHMT)、*panE* 编码的酮泛解酸还原酶(KPR)和由 *panC* 编码的泛酸合成酶(PanC)^[111]。

目前关于(R)-泛解酸生物合成途径的研究主要集中在微生物发酵生产 D-泛酸方向。Zhang 等^[15,110]在大肠杆菌 W3110 中过表达谷氨酸棒杆菌来源的 *panC* 和 *panB* 并基于系统代谢分析加强 (R)-泛解酸途径,通过补料分批发酵,在 5 L 发酵罐中,D-泛酸的产量达到了 $32.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Zou 等^[35]在 DPA11A01 菌株中游离表达 *pos5* 和 *ppnk* 以加强 NADPH 的体内供应,通过补料分批发酵,在 5 L 发酵罐中,D-泛酸的产量达到了 $63.58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,生产强度为 $0.73 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,这是目前报道的微生物发酵法生产 D-泛酸的最高产量。

而 β -丙氨酸是由 L-天冬氨酸通过 PanD 的脱羧作用形成的。然而,大肠杆菌中天然 PanD 的活性不足,通常在发酵培养基中外源补充 β -丙氨酸以提高 D-泛酸的产量^[41]。因此, β -丙氨酸的产量不足严重限制了生物法生产 D-泛酸的发展,有必要对 β -丙氨酸的生物合成途径进行研究。目前,研究者已经对在不同的生物体中的 β -丙氨酸的生物合成途径进行研究。在动物中, β -丙氨酸是通过多种途径产生的,例如通过 L-天冬氨酸的脱羧反应,以及肝脏中肌肽、尿嘧啶和胞嘧啶的分解^[112-114]。在酵母细胞中, β -丙氨酸是通过亚精胺的氧化合成的^[115]。在原核生物中,已经确定了两种负责 β -丙氨酸生物合成的代谢途径。一种是尿嘧啶被还原并水解为 N-氨甲酰- β -丙氨酸,然后被 β -丙氨酸合成酶催化为 β -丙氨酸^[116]。另一种是 β -丙氨酸的主要生产途径,即 L-天冬氨酸被 PanD 催化生成 β -丙氨酸^[117]。由于 L-天冬氨酸反应简单且易于获得,PanD 已成为 β -丙氨酸生产的焦点^[118-119],因此本研究选择 PanD 作为级联转化途径中的路径酶之一。

早前,本实验室通过在大肠杆菌中表达和表征枯草芽孢杆菌来源的 PanD(BsPanD),并在其催化位点附近理性设计几个定点突变,结果发现 Glu56Ser(E56S)突变体显示出比野生型酶高 1.6 倍的活性^[49]。故选择以 BsPanD^{E56S} 为基础,建立从 L-天冬氨酸到 β -丙氨酸的途径。但是考虑到 L-天冬氨酸的价格仍相对较高,希望再引入一个能够利用更低附加值的底物转化生成 L-天冬氨酸的酶。Qian 等^[45]开发了 AspA 和 PanD 的双酶级联反应,可以催化廉价低的底物富马酸转化为 β -丙氨酸,在 5 L 生物反应器中, β -丙氨酸产量达 $80.4\pm 1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,转化率为 $95.3\pm 1.6\%$ 。故选择再引入 L-天冬氨酸酶,建立由富马酸到 L-天冬氨酸再到 β -丙氨酸最终生成 D-泛酸的级联途径,如图 3-1。具体地,催化富马酸和 D-泛解酸生产 D-泛酸的级联反应共分三步:(1)L-天冬氨酸酶(AspA; EC 4.3.1.1)

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/276045231033010054>