DOI:10.12441/spyswjs.20230313002 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0037-09

基于级联反应高效制备*D*-泛酸的生物转化系统构建

许媛怡 蔡萌萌 张小玲 乔郅钠 尤甲甲 饶志明*

(江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】*D*-泛酸(维生素B_5)是一种水溶性维生素,广泛应用于饲料、食品、化工、制药等领域。目前,维生素B_5主要通过化学-酶法生产,但这种生产工艺会产生大量含氰废水,而细胞工厂具有绿色环保的特点。因此,非常有必要开发出一种用低值底物生产*D*-泛酸的生物转化系统。**【方法】**以课题组前期构建的*β*-丙氨酸合成菌株为出发菌株,通过偶联谷氨酸棒杆菌来源的*L*-天冬氨酸酶(*L*-aspartase,AspA)和短芽孢杆菌来源的泛酸合成酶(pantothenate synthetase,PanC)构建三级酶联体系,通过体外验证和优化*D*-泛酸生物合成途径,而后在细胞内实现重建,并优化3种酶配比和引入ATP循环再生系统,在5 L生物反应器中实现了*D*-泛酸的体系优化和放大生产。**【结果】**在最佳生物转化条件下,通过全细胞催化可将70 g/L的富马酸和89 g/L的*D*-泛解酸转化为128.6 g/L的*D*-泛酸,摩尔转化率为97.3%。**【结论】**成功开发出一种用富马酸和*D*-泛解酸生产*D*-泛酸的有效生物转化系统。

关键词:*D*-泛酸;大肠杆菌;*L*-天冬氨酸酶;*L*-天冬氨酸-*α*-脱羧酶;泛酸合成酶;ATP供应;级联反应

Construction of a Biotransformation System for Efficient Preparation of *D*-Pantothenic Acid Based on Cascade Reactions

*XU Yuanyi CAI Mengmeng ZHANG Xiaoling QIAO Zhina YOU Jiajia RAO Zhiming**

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] *D*-pantothenic acid (vitamin B_5) is a water-soluble vitamin widely used in feed, food, chemical, pharmaceutical and other industries. At present, vitamin B_5 is mainly produced by chemical-enzymatic methods, while this production process generates a large amount of cyanide-containing wastewater. Cell factories have the characteristics of being green and environmentally friendly. Therefore, it is necessary to develop a biotransformation system for producing *D*-pantothenic acid with low value substrates. [**Method**] With the *β*-alanine synthesis strain constructed in the previous study as the starting strain, a three-enzyme system was constructed by coupling *L*-aspartase from *Corynebacterium glutamicum* and pantothenate synthase (PanC) from *Bacillus subtilis*. The *D*-pantothenic acid biosynthesis pathway was validated and optimized *in vitro* and then reconstructed in cells. By optimizing the ratio of three enzymes and introducing an ATP cycle system, the system optimization and large-scale production of *D*-pantothenic acid were finally achieved in a 5 L bioreactor. [**Result**] Under the optimal biotransformation conditions, 70 g/L of fumaric acid and 89 g/L of *D*-pantolactone were converted to 128.6 g/L of *D*-pantothenic acid through whole cell catalysis, with a molar conversion rate of 97.3%. [**Conclusion**] An effective biotransformation system for producing *D*-pantothenic acid from fumaric acid and *D*-pantolactone is successfully developed.

Keywords: *D*-pantothenic acid; *Escherichia coli*; *L*-aspartase; *L*-aspartate-*α*-decarboxylase; pantothenate synthetase; ATP supply; cascade reactions

---

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2100900);国家自然科学基金项目(32070035)。

通信作者:饶志明(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢工程与合成生物学研究。E-mail:raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-03-13 **修回日期:**2023-04-12

D-泛酸是活细胞中辅酶A合成的关键前体物质，也是生命活动必需的维生素[1-2]。它可以由微生物和植物合成，但人类和其他动物无法合成。*D*-泛酸已广泛用于饲料、食品添加剂[3]、化妆品和制药行业[4-5]。

目前，工业化生产*D*-泛酸最主要的方法是化学合成法，通过加热*D*-泛酰内酯和*β*-丙氨酸的甲醇混合物来完成[6]，但存在使用剧毒原料和产生含氰化物的废水等问题[7]。因此，研究人员将注意力转向了*D*-泛酸生物合成工艺的开发。

目前生产*D*-泛酸的主要生物技术方法有微生物发酵法[8]和酶促生物转化法[9]。通过在大肠杆菌中工程改造天然(*R*)-泛解酸途径可以实现*D*-泛酸的高效生产[3]。但是*D*-泛酸微生物发酵生产中仍存在产量和效率低的缺点，这直接降低了微生物发酵法生产*D*-泛酸的市场竞争力[10]。

酶促生物转化是合成*D*-泛酸的另一种有效方法。有研究者[9]在发酵早期的对数阶段向含有泛酸合成酶(来自谷氨酸棒杆菌)的大肠杆菌菌株中添加底物，在32 h内*D*-泛酸产量达到97.1 g/L。泛酸合成酶生成*D*-泛酸需要消耗大量的ATP，所以目前报道的方法都需要通过边发酵边转化来生产*D*-泛酸[9-10]，这就导致了产物复杂和效率较低的问题。同时，目前关于生物转化合成*D*-泛酸的报道基本都是单酶转化，鲜少有通过多酶级联反应制备*D*-泛酸的报道。与单酶法相比，多酶级联反应具备显著优势：1)可以利用更简单、廉价的底物实现目标产品的生产；2)可以解决底物浓度过高造成的过量底物抑制问题；3)可减少反应步骤，节约中间产物分离纯化的成本，且缩短了反应时间，更符合绿色生产的需求[11]。此外，多酶级联反应已经成功应用于很多高值化合物的生产，如肌醇[10]和氨基酸[12]等。因此，通过多酶级联反应生产*D*-泛酸具有较高的研究价值。

要实现多酶级联反应的大规模应用，需要考虑生物催化剂的活性、反应的协同性和生物转化系统的稳定性。反应的协同性是提高多酶级联反应效率的主要影响因素。目前，已报道了2种方法，包括改变酶特性[13]和调节酶表达[14]来维持多酶级联反应的平衡。为了提高反应的协同性，作者进行了高效酶的筛选并在大肠杆菌中构建三酶级联反应体系(见图1)。通过双质粒表达、pET表达质粒的改进和基因复制策略，优化*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC的表达，拟解决多酶级联反应协同性差的问题。同时通过引入ATP循环再生系统旨在避免额外添加大量ATP的问题。

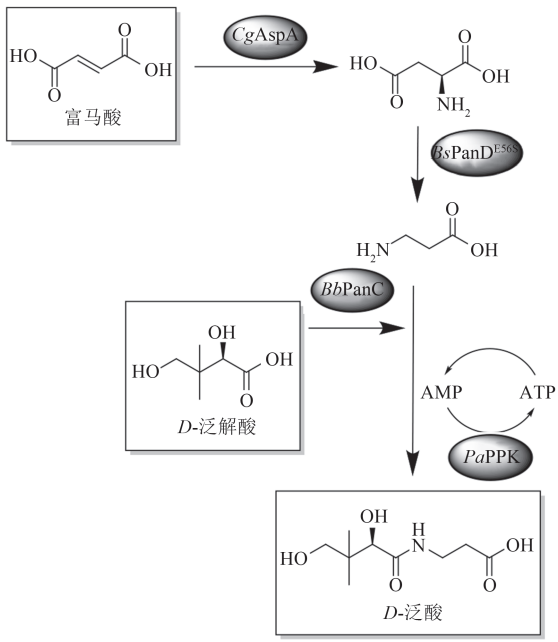


图1 多酶级联反应催化富马酸和*D*-泛解酸生成*D*-泛酸的路径设计

Fig. 1 Path design of *D*-pantothenic acid production from fumaric acid and *D*-pantolactone by multienzyme cascade reactions

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

采用大肠杆菌*Escherichia coli* JM109和质粒pETDuet-1R、pET-28a(+)来构建质粒，其中酶学性质研究均使用质粒pET-28a(+)。研究中所使用的酶见表1。采用大肠杆菌*Escherichia coli* BL21(DE3)作为基因表达的宿主，所用质粒和菌株均来自作者所在课题组。

表1 研究中所使用的酶

Table 1 Enzymes used in the experiment

酶名称	来源	基因长度/bp
*Cg*AspA	*Corynebacterium glutamicum*	1 581
*Bs*PanD^{E56S}	*Bacillus subtilis*	348
*Bb*PanC	*Bacillus brevis*	864
*Pa*PPK	*Pseudomonas aeruginosa*	1 491

1.1.2 试剂

同源重组连接试剂盒、高保真酶PhantaR Max（p515）DNA polymerases、2×Ex *Taq* DNA聚合酶：南京诺唯赞生物科技有限公司；限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA Marker、蛋白质Marker、大肠杆菌感受态制备试剂盒：Takara公司；培养基所需原料：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB培养基：NaCl 10 g/L、蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L，固体培养基则添加20 g/L的琼脂粉；活化斜面培养基：NaCl 10 g/L、蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、牛肉膏10 g/L、葡萄糖2 g/L、琼脂粉25 g/L；种子培养基：葡萄糖25 g/L、蛋白胨6 g/L、酵母粉10 g/L、K_2HPO_4 12 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 5 g/L、$FeSO_4·7H_2O$ 10 mg/L、$MnSO_4·H_2O$ 10 mg/L、VB_1 1.3 mg/L、VH 0.3 mg/L、消泡剂若干滴，初始pH 7.0；发酵培养基：葡萄糖20 g/L、蛋白胨4 g/L、酵母粉2 g/L、柠檬酸钠100 mg/L、K_2HPO_4 2 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 70 mg/L、$FeSO_4·7H_2O$ 80 mg/L、$MnSO_4·H_2O$ 80 mg/L、VB_1 0.8 mg/L、VH 0.2 mg/L、消泡剂若干滴，初始pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

1）单基因表达载体的构建：分别以*BspanD*^{E56S}、*BbpanC*、*CgaspA*和*Pappk*基因片段为模板，利用引物进行PCR扩增获得添加同源臂的*BspanD*^{E56S}、*BbpanC*、*CgaspA*和*Pappk*基因片段，纯化后与经*Nde* I和*Nhe* I酶切的线性化质粒pET-28a（+）进行同源重组连接，从而获得pET-28a（+）-*BspanD*^{E56S}、pET-28a（+）-*BbpanC*、pET-28a（+）-*CgaspA*和pET-28a（+）-*Pappk*。

2）多基因表达载体的构建：pETDuet-1R-*BbpanC*-*CgaspA*载体的构建方法和单基因表达载体的构建方法相同，以*BbpanC*基因片段为模板，利用引物进行PCR扩增获得添加同源臂的*BbpanC*基因片段，纯化后与经*Pst* I和*Sal* I酶切的线性化质粒pETDuet-1R进行同源重组连接，从而获得pETDuet-1R-*BbpanC*。同时，通过同源重组将pETDuet-1R-*BbpanC*插入*Nde* I和*Xho* I酶切位点之间，获得pETDuet-1R-*BbpanC*-*CgaspA*。

pETDuet-1R-*BbpanC*-*Pappk*-*CgaspA*载体的构建是在pETDuet-1R-*BbpanC*-*CgaspA*的基础上，通过相同的方法，在*Hin*d III和*Not* I酶切位点之间插入pET-28a（+）-*Pappk*上的基因片段（从T7启动子至*Pappk*基因），获得pETDuet-1R-*BbpanC*-*Pappk*-*CgaspA*。

参照文献[15]的方法改进pET表达质粒，将pET-28a（+）质粒的T7启动子替换为共识T7启动子（T7pCONS）或优化其翻译起始区（TIR）序列。

基因复制菌株的质粒通过酶切酶连构建。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-*BspanD*^{E56S}。使用*Nhe* I和*Bam*H I将第二个T7-*BspanD*^{E56S}片段插入pET28a^{TIR-1}-*BspanD*^{E56S}质粒。使用同样的方法，在*Eco*R I和*Sal* I酶切位点之间插入T7-*BspanD*^{E56S}片段；在*Hin*d III和*Not* I酶切位点之间插入T7-*BspanD*^{E56S}片段。

1.2.2 重组菌株的构建

所有质粒的宿主菌均为*E.coli* BL21。将1.2.1部分的连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞中，转化子菌落PCR所用引物为pET-28a（+）通用引物，条带大小完全正确的即为阳性转化子。将阳性转化子扩增培养并提取质粒进行测序，测序结果完全正确即大肠杆菌重组菌株构建成功。双质粒表达菌株的构建则将2个验证正确的质粒一起转化至大肠杆菌感受态细胞中，在双抗性LB培养基平板上生长的转化子即为构建成功的大肠杆菌双质粒表达菌株。

1.2.3 酶的诱导表达

*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC酶的诱导表达参照文献[9，12，16]进行。

1.2.4 *D*-泛酸的制备

将含有*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC的菌株在4 ℃下以6 000 *g*离心8 min，制备全细胞催化剂。三酶级联反应在500 mL摇瓶（50 mL工作体积）或5 L反应器（1 L工作体积）中进行。富马酸向*D*-泛酸转化的条件为：30 g/L湿细胞、50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.0，温度为37 ℃，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（摩尔比为1∶1∶1）。生物转化试验的最佳条件：30 g/L湿细胞、50 mmol/L的Tris-HCl、10 mmol/L的AMP、100 mmol/L六偏磷酸钠，pH 7.0，温度35 ℃，转化总时长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，并使两者的摩尔比保持在1∶1。通过定时补充纯氨水，将生物转化体系的pH控制在7.0。

1.2.5 相关参数的测定

底物富马酸，中间产物*L*-天冬氨酸、*β*-丙氨酸和产物*D*-泛酸的浓度采用高效液相色谱（HPLC）测定。

富马酸的测定方法参考文献[17]。检测条件：流动相为5 mmol/L H_2SO_4溶液，Aminex糖分析柱（9 μm×7.8 mm×300 mm），流量0.6 mL/min，柱温55 ℃，检测波长210 nm。

L-天冬氨酸、*β*-丙氨酸的测定方法参考文献[16]。氨基酸的HPLC分析通过OPA FMOC在线衍生化确定。检测条件：流动相A为200 μL/L三乙胺（含5 g/L乙酸钠和5 mL/L四氢呋喃，pH 7.2），流动相B为400 mL/L甲醇和400 mL/L乙腈（含5 g/L乙酸钠，pH 7.2）的混合溶液，采用C18色谱柱（5 μm×4.6 mm×250 mm），柱温40 ℃，流量1 mL/min，梯度洗脱，检测波长338 nm。

D-泛酸的测定方法参考文献[9]。检测条件：流动相为乙腈和50 mmol/L的$NH_4H_2PO_4$缓冲液（用磷酸调节pH至3.0），体积比为1∶19，C18色谱柱（5 μm×4.6 mm×250 mm），柱温25 ℃，流量0.5 mL/min，检测波长210 nm。

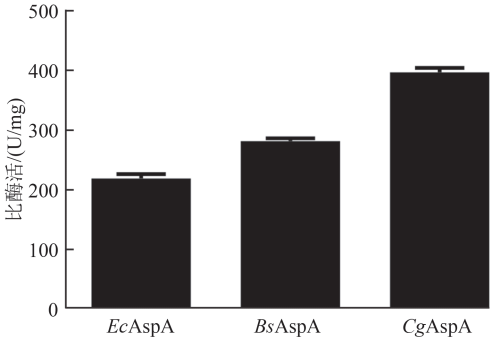
2 结果与讨论

2.1 三酶级联反应体系的设计

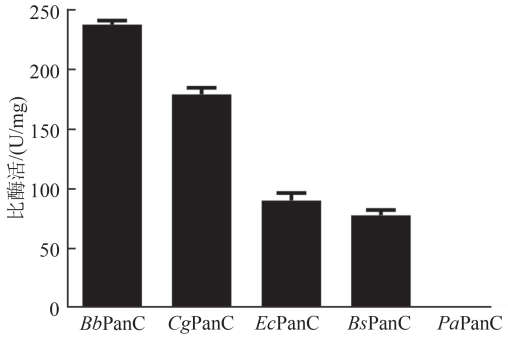
目前已报道的合成*D*-泛酸的生物途径[3,9]几乎都使用泛酸合成酶（PanC）将*D*-泛解酸和*β*-丙氨酸缩合生成*D*-泛酸[3]，其中*β*-丙氨酸的产量也是限制*D*-泛酸生产的关键因素，在*D*-泛酸的发酵生产中需要不断补加*β*-丙氨酸[10]。因此，寻找到可以催化生成*β*-丙氨酸的酶十分重要。*Bs*PanD^{E56S}可以将*L*-天冬氨酸脱羧生成*β*-丙氨酸。作者所在课题组前期将*Bs*PanD中与酶活性位点相邻的氨基酸残基E56突变为丝氨酸，并通过大肠杆菌全细胞催化，使*β*-丙氨酸的产量达到了215.3 g/L[16]。因此，作者以*Bs*PanD^{E56S}酶为基础设计多酶级联反应体系，通过低值底物全细胞转化，实现*D*-泛酸的高效生产。

*Bs*PanD^{E56S}酶可以将*L*-天冬氨酸转化为*β*-丙氨酸，但*L*-天冬氨酸的价格相对昂贵，且浓度过高会遏制反应进行[18]，故考虑通过偶联AspA将更为廉价的富马酸转化为*L*-天冬氨酸。采用富马酸生产*D*-泛酸的级联反应体系分为3步：1）富马酸经过AspA的加氨作用生成*L*-天冬氨酸；2）*L*-天冬氨酸经过*L*-天冬氨酸-*α*-脱羧酶（PanD/ADC；EC 4.1.1.11）的脱羧作用生成*β*-丙氨酸；3）在ATP和PanC的存在下，*β*-丙氨酸和*D*-泛解酸通过缩合反应生成*D*-泛酸，见图1。

利用BRENDA数据库并参考文献[9,19]评估了不同来源的AspA和PanC的比酶活。如图2所示，*Cg*AspA（来源于谷氨酸棒杆菌*Corynebacterium glutamicum*的AspA）表现出最高的比酶活。在5种PanC中，*Bb*PanC（来源于短芽孢杆菌*Bavibacillus brevis*的PanC）表现出最高的比酶活。因此，最终选择*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC这3种酶建立三酶级联反应体系。



(a) 不同来源的AspA



(b) 不同来源的PanC

图2 不同来源的AspA和PanC的比酶活比较

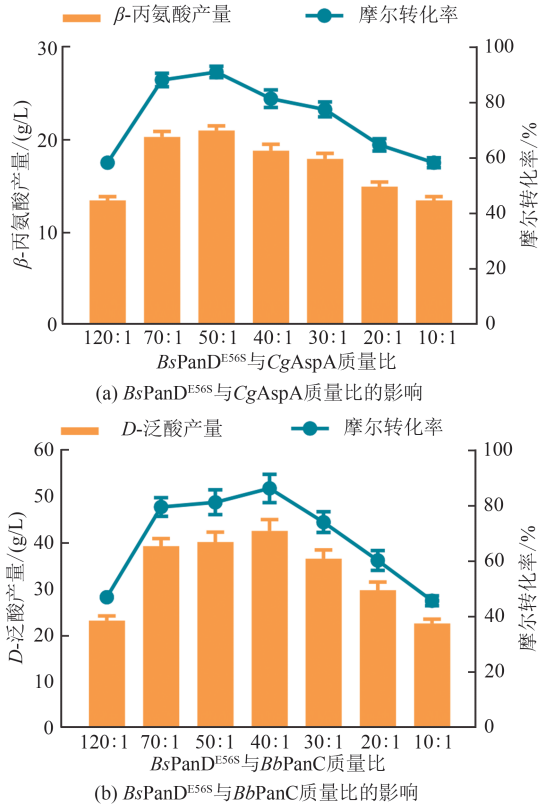
Fig. 2 Comparison on specific activity of AspA and PanC from different sources

2.2 *D*-泛酸生物合成途径的体外验证和优化

为了验证所构建*D*-泛酸生物合成途径的可行性，分别将*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC酶进行诱导表达并纯化。将这3种酶按质量比1∶1∶1

（*Bs*PanD^{E56S}活性控制在 15 U/mL）与 25 mmol/L 富马酸、25 mmol/L *D*-泛解酸、25 mmol/L ATP 在体外混合 6 h，得到 4.6 mmol/L 的 *D*-泛酸。结果证实，设计的 *D*-泛酸生物合成三酶级联反应体系能够将富马酸和 *D*-泛解酸转化为 *D*-泛酸。

为了优化该体系，调节了 3 种酶的配比。首先，以 258 mmol/L 富马酸为底物，将 *Cg*AspA 与 *Bs*PanD^{E56S}按不同质量比（从 120∶1 到 10∶1）组合，同时将 *Bs*PanD^{E56S}活性控制在 15 U/mL。结果如图 3 所示，当 *Bs*PanD^{E56S}与 *Cg*AspA 的质量比为 50∶1（即酶活比为 1.56∶1）时，*β*-丙氨酸产量最高，为 21.0 g/L，摩尔转化率为 91.2%。以 258 mmol/L *L*-天冬氨酸、258 mmol/L *D*-泛解酸、258 mmol/L ATP 为底物，将 *Bs*PanD^{E56S}活性控制在 15 U/mL。然后确定 *Bs*PanD^{E56S}与 *Bb*PanC 的最佳质量比为 40∶1（即酶活比为 1.47∶1），产生的 *D*-泛酸产量最高为 40.7 g/L，摩尔转化率为 87.3%。因此，*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}、*Bb*PanC 的最佳质量比为 1∶50∶1.25，对应的最佳酶活比为 1∶1.56∶1.06。



(a) *Bs*PanD^{E56S}与*Cg*AspA质量比的影响

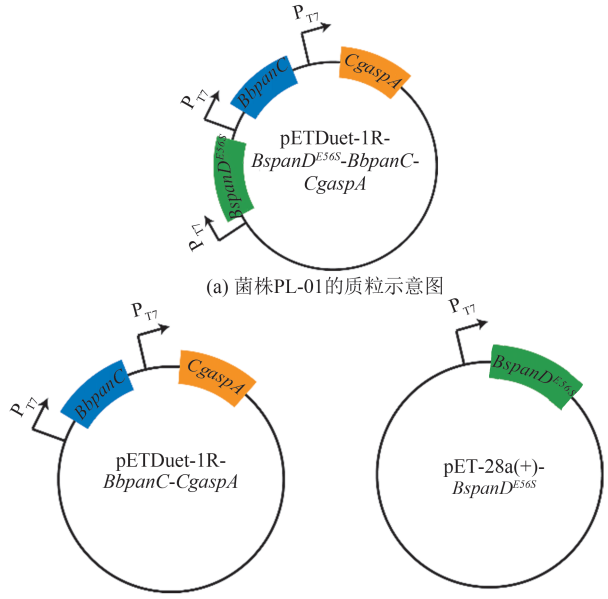
(b) *Bs*PanD^{E56S}与*Bb*PanC质量比的影响

图 3　酶的配比对产量和摩尔转化率的影响

Fig. 3　Effects of enzyme mass ratio on the yield and molar conversion rate

2.3　*D*-泛酸生物合成途径的体内重建

为了进一步简化三酶级联反应体系，将编码 *Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和 *Bb*PanC 的基因插入质粒 pETDuet-1R，然后转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3）中构建菌株 PL-01，见图 4。在 37 ℃下，全细胞催化剂质量浓度为 30 g/L 时，对菌株 PL-01 的转化性能进行探索，结果见图 5。随着底物浓度（0.1~0.3 mmol/L）的增加，*D*-泛酸的产量从 71 mmol/L 逐渐提高到 178 mmol/L。然而，在底物浓度大于 0.3 mmol/L 时，*D*-泛酸的产量并未随着底物浓度的增加而增加。而随着底物浓度从 0.1 mmol/L 提高到 0.6 mmol/L，级联中间体 *L*-天冬氨酸的产量从 29 mmol/L 提高到 437 mmol/L。此外，*Cg*AspA（728.6 U/mg）、*Bs*PanD^{E56S}（0.2 U/mg）和 *Bb*PanC（678.9 U/mg）的酶活比为 35.00∶1∶33.54。这些结果表明，3 种酶活性的不平衡导致了 *L*-天冬氨酸的积累，从而阻断了富马酸向 *D*-泛酸的持续转化。



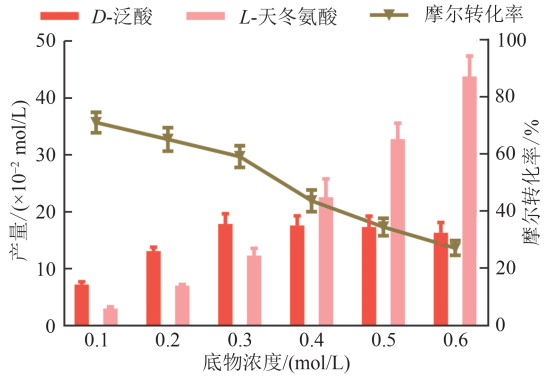
(a) 菌株PL-01的质粒示意图

(b) 菌株PL-02的质粒示意图

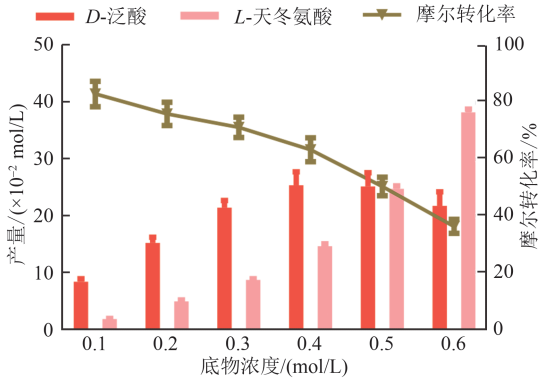
图 4　三酶级联反应体系构建示意图

Fig. 4　Schematic diagram of a three-enzyme cascade reaction system

质粒 pET-28a（+）的表达强度高于质粒 pETDuet-1R，且两者可在大肠杆菌中共表达[20]。故将酶活性较差的编码 *Bs*PanD^{E56S}的基因单独在 pET-28a（+）上进行表达，编码 *Cg*AspA 和 *Bb*PanC 的基因仍在质粒 pETDuet-1R 上进行表达，然后一起转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3）中，构建菌株 PL-02。在 37 ℃下，全细胞催化剂质量浓度为



(a) 菌株PL-01底物浓度对产量和摩尔转化率的影响



(b) 菌株PL-02底物浓度对产量和摩尔转化率的影响

图 5 底物浓度对菌株生物转化能力的影响

Fig. 5 Effect of substrate concentration on the biotransformation capability of the strain

30 g/L时，对菌株PL-02的转化性能进行探索。随着底物浓度（0.1~0.4 mmol/L）的增加，*D*-泛酸的产量从83 mmol/L增加到254 mmol/L。在底物浓度大于0.4 mmol/L时，*D*-泛酸的产量并未随着底物浓度的增加而增加。而随着底物浓度从0.1 mmol/L提高到0.6 mmol/L，级联中间体*L*-天冬氨酸的产量从17 mmol/L增加到383 mmol/L。此外，*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC的酶活比为5.60∶1∶5.61，表明与单质粒表达相比，双质粒共表达缩小了*Bs*PanD^{E56S}酶活性与*Cg*AspA和*Bb*PanC的差距，但是3种酶的催化活性仍不平衡，在生物转化过程中积累了高水平的*L*-天冬氨酸。因此还需要寻找一种有效的方法来平衡这3种酶的活性。

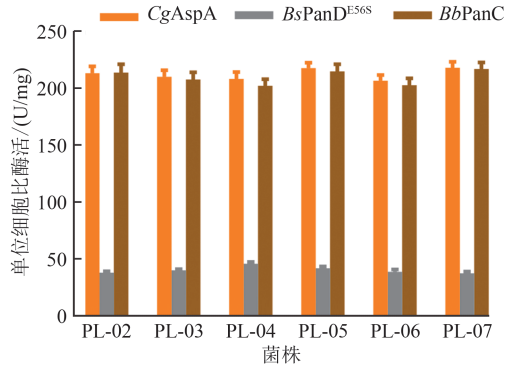
2.4 优化3种酶配比以高效生产*D*-泛酸

研究表明[15]，通过改造T7启动子和翻译起始区（TIR）可明显提高蛋白质表达量。作者通过改进pET表达质粒来提高大肠杆菌中蛋白质产量，并对菌株PL-02进行改造，以提高*Bs*PanD^{E56S}的表达量。将T7启动子恢复为T7pCONS，将TIR改造为TIR-1和TIR-2，并构建了它们与T7pCONS的组合改造质粒，分别命名为T7pCONS、TIR-1、TIR-2、T7pCONS+TIR-1、T7pCONS+TIR-2，得到相应菌株PL-03、PL-04、PL-05、PL-06、PL-07。探究6种菌株在不同底物浓度（0.1~0.6 mol/L）下的最高产量。如图6所示，6种菌株均在底物浓度0.4 mol/L下表现出最高产量，其中，PL-04的效果最好。通过比较发现，对质粒进行改造后，T7启动子的严密性降低，未添加诱导剂时就开始诱导蛋白质表达，导致菌株生长受到一定的抑制。相对于PL-02，PL-04组中*Cg*AspA活性降低了2.27%，*Bb*PanC活性降低了5.38%，*Bs*PanD^{E56S}活性提高了20.90%。这可能是由于pET-28a(+)表达上调导致资源重新分配，引起了*Cg*AspA和*Bb*PanC的表达下调，导致*D*-泛酸的最大产量为281 mmol/L（是PL-02菌株的1.11倍），但摩尔转化率仍然很低，为70.3%，见图7。同时，*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}、*Bb*PanC的酶活比从5.60∶1∶5.61变为4.52∶1∶4.39。这些结果表明，将富马酸持续转化为*D*-泛酸的关键是解决*Bs*PanD^{E56S}活性不足的问题。

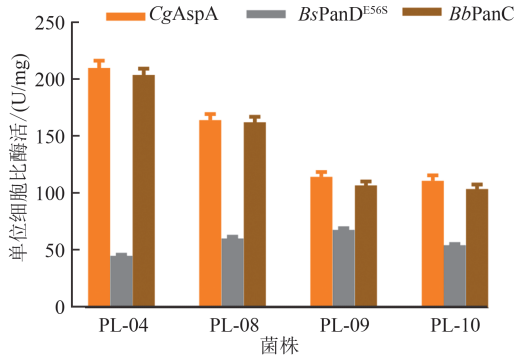
为了克服上述问题，作者采用基因复制修饰来调节限速酶*Bs*PanD^{E56S}的表达。已有研究证明了该策略的有效性，其通过复制编码限速酶肌醇3-磷酸合酶的基因*IPS*，优化了3种酶的酶活比，将摩尔转化率提高至96.0%，且没有任何中间产物的积累[10]。作者把*BspanD*^{E56S}基因的重复数从2提高到4，得到菌株PL-08、PL-09、PL-10。*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}、*Bb*PanC的最终酶活比分别为2.67∶1∶2.64、1.67∶1∶1.56和2.01∶1∶1.88。PL-09中*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}、*Bb*PanC酶活比与体外测量的最佳比率（1∶1.56∶1.06）基本一致。当全细胞生物催化剂为30 g/L、底物浓度为0.4 mol/L时，使用菌株PL-04、PL-08、PL-09、PL-10进行全细胞转化试验，见图7（b）。PL-09的最大*D*-泛酸产量达到375 mmol/L，摩尔转化率为93.8%，*L*-天冬氨酸的积累量仅为25 mmol/L，表明*Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S}和*Bb*PanC之间的平衡几乎没有受到影响。因此，选择菌株PL-09进行后续试验。

2.5 引入ATP循环再生系统增强细胞内ATP供应

在*Bb*PanC合成*D*-泛酸的过程中需要消耗大量的ATP[20]。一般的解决方法是使用生长中的细胞进行生物催化转化[9]，但也造成了产物纯度低



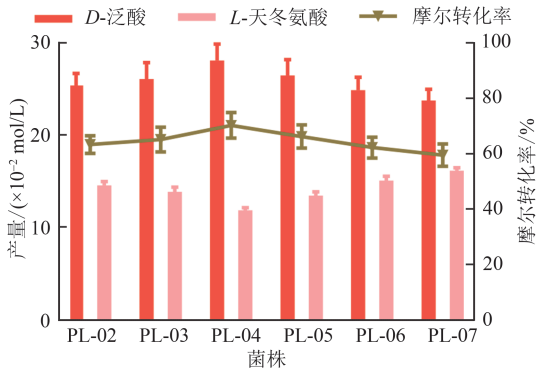
(a) 表达质粒的改造方法对单位细胞比酶活的影响



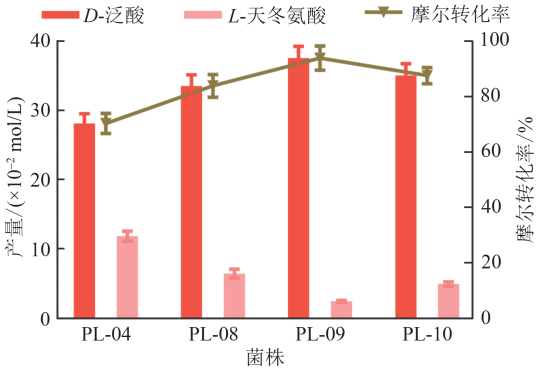
(b) *Bs*PanD^{E56S}重复数对单位细胞比酶活的影响

图 6　表达质粒的改造方法和 *Bs*PanD^{E56S} 重复数对单位细胞比酶活的影响

Fig. 6　Effects of expression plasmid modifications and *Bs*PanD^{E56S} repeats on enzyme activity of per unit cell



(a) 表达质粒的改造方法对0.4 mol/L底物产生的*D*-泛酸产量的影响



(b) *Bs*PanD^{E56S}重复数对0.4 mol/L底物产生的*D*-泛酸产量的影响

图 7　表达质粒的改造方法和 *Bs*PanD^{E56S} 重复数对 0.4 mol/L 底物产生的 *D*-泛酸产量的影响

Fig. 7　Effects of expression plasmid modifications and *Bs*PanD^{E56S} repeats on the production of *D*-pantothenic acid with 0.4 mol/L substrate

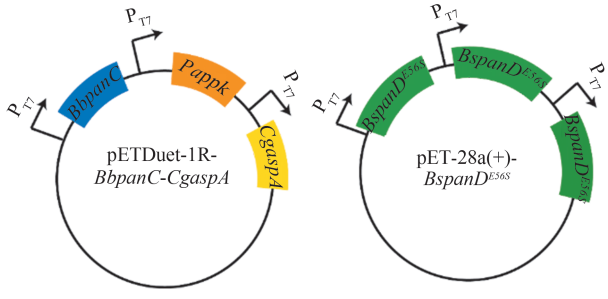


图 8　PL-11 菌株的质粒示意图

Fig. 8　Plasmid diagrams of PL-11 strain

和反应效率低的问题。因此，作者引入 ATP 循环再生系统以增强细胞内 ATP 供应[21]。选择铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）来源的 *Pa*PPK 用于构建菌株 PL-11，见图 8。当全细胞生物催化剂为 30 g/L、底物浓度为 0.4 mol/L 时进行全细胞转化试验，使用不添加 ATP 和添加足量 ATP 的 PL-09 菌株作为对照，见图 9。PL-11 的 *D*-泛酸产量在转化 30 h 时达到最高，为 74.5 g/L，摩尔转化率为 84.9%，比改造前菌株达到最高产量的时间提前，且产量明显提高，说明改造有效。与添加足量 ATP 的 PL-09 菌株相比，最高产量和摩尔转化率仍有明显差距，还需进一步优化。

2.6　生产 *D*-泛酸的体系优化及放大生产

为了进一步增加 *D*-泛酸的产量，在 5 L 生物反应器中进行了体系的优化。首先，将底物浓度控制在 0.6 mol/L，测试了不同质量浓度的全细胞催化剂对 PL-11 合成 *D*-泛酸的影响，见图 10（a）。随着 PL-11 菌体质量浓度（10~50 g/L）的增加，*D*-泛酸产量从 23.2 g/L 逐渐提高到 106.5 g/L。使用 30 g/L 全细胞催化剂时，*D*-泛酸产量与 PL-11 质量浓度的最高比率（*P*/*C*）达到 2.78。在此基础上，进一步优化了 pH 和温度等其他生物转化条件。在 pH 7.0 时，*D*-泛酸产量最大，为 94.7 g/L，见图 10（b）。转化温度为 35 ℃时显示出最高的 *D*-泛酸产量，为 106.8 g/L，此时摩尔转化率为 81.2%，见图 10（c）。

在 1 L 反应体系中，采用最佳条件（菌株 PL-11 30 g/L、Tris-HCl 缓冲液 50 mmol/L、AMP

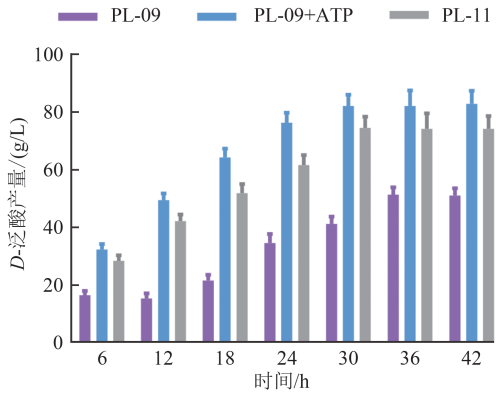
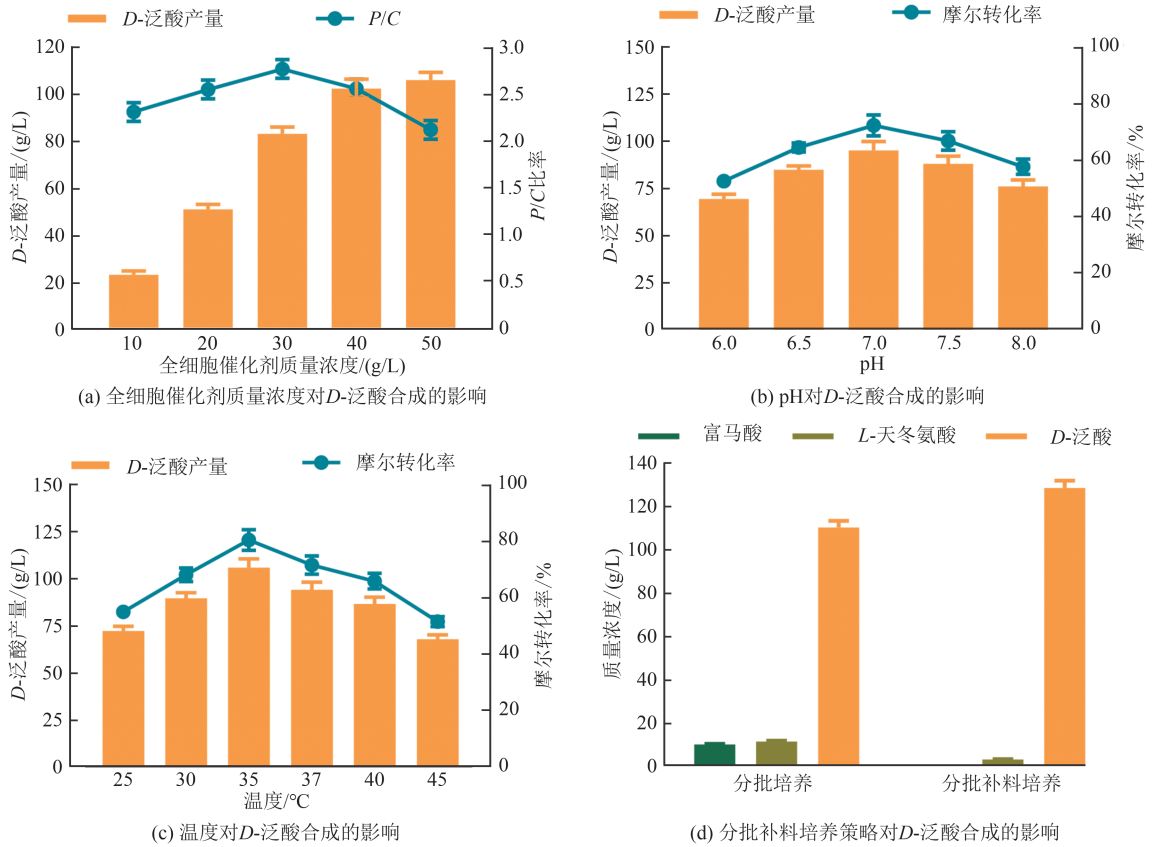


图 9　全细胞转化试验结果

Fig. 9　Whole-cell transformation assay results

10 mmol/L、六偏磷酸钠 100 mmol/L，pH 7.0，温度 35 ℃）生产 *D*-泛酸，加入 70 g/L 富马酸和 89 g/L *D*-泛解酸，30 h 内产生了 110.8 g/L 的 *D*-泛酸，摩尔转化率为 83.8%，见图 10（d）。然而，在生物转化结束时富马酸的残留量高达 5.8 g/L，从而影响了从富马酸到 *D*-泛酸的有效转化。为了解决这个问题，采用分批补料培养策略将富马酸质量浓度控制在 14 g/L 以下。最后，用 70 g/L 富马酸和 89 g/L 的 *D*-泛解酸产生了 128.6 g/L 的 *D*-泛酸，摩尔转化率为 97.3%，转化产物中检测到的富马酸残留量小于 1.0 g/L，见图 10（d）。



(a) 全细胞催化剂质量浓度对*D*-泛酸合成的影响　(b) pH对*D*-泛酸合成的影响

(c) 温度对*D*-泛酸合成的影响　(d) 分批补料培养策略对*D*-泛酸合成的影响

图 10　PL-11 生物转化条件的优化

Fig. 10　Optimization of PL-11 biotransformation conditions

3　结论

作者设计了一个由 *Cg*AspA、*Bs*PanD^{E56S} 和 *Bb*PanC 组成的三酶级联反应体系，通过双质粒表达、*Bs*PanD^{E56S} 表达质粒的改进和重复基因策略解决了级联反应协同性差的问题，克服了 *D*-泛酸生产过程中的中间体过度积累问题。通过引入 ATP 循环再生系统，在最佳转化条件下，实现了菌株 PL-11 的高效率转化，*D*-泛酸产量为 128.6 g/L，摩尔转化率为 97.3%。作者用低成本底物富马酸大规模生产 *D*-泛酸，提供了一种高效、绿色的替代方法。今后的研究应侧重于引入高效的 *D*-泛解酸生产途径，从而实现更低成本的全细胞转化。

参考文献

[1] YAO C X，CHOU J D，WANG T，et al.　Pantothenic acid，

vitamin C，and biotin play important roles in the growth of *Lactobacillus helveticus*[J]. Frontiers in Microbiology，2018，9：1194.

[2] 韩钱松，沈健增，蔡宇杰，等. 维生素对竹黄菌发酵产苝醌类色素的影响[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(2)：119-123.
HAN Q S，SHEN J Z，CAI Y J，et al. Effect of vitamins on perylenequinones production of *Shiraia bambusicola*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2013，32(2)：119-123.(in Chinese)

[3] ZHANG B，ZHANG X M，WANG W，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *D*-pantothenic acid production[J]. Food Chemistry，2019，294：267-275.

[4] BOURGIN M，KEPP O，KROEMER G. Immunostimulatory effects of vitamin B_5 improve anticancer immunotherapy[J]. Oncoimmunology，2022，11(1)：2031500.

[5] PATASSINI S，BEGLEY P，XU J S，et al. Cerebral vitamin B_5 (*D*-pantothenic acid) deficiency as a potential cause of metabolic perturbation and neurodegeneration in Huntington's disease[J]. Metabolites，2019，9(6)：113.

[6] HUANG J，HUANG L，LIN J P，et al. Organic chemicals from bioprocesses in China[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology，2010，122：43-71.

[7] ACEVEDO-ROCHA C G，GRONENBERG L S，MACK M，et al. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins[J]. Current Opinion in Biotechnology，2019，56：18-29.

[8] WANG P，ZHOU H Y，ZHOU J P，et al. Module engineering coupled with omics strategies for enhancing *D*-pantothenate production in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology，2022，352：127024.

[9] TIGU F，ZHANG J L，LIU G X，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，2018，102：6039-6046.

[10] WANG J P，CHENG H，ZHAO Z H，et al. Efficient production of inositol from glucose *via* a tri-enzymatic cascade pathway[J]. Bioresource Technology，2022，353：127125.

[11] 旋凯昂，张荣珍，饶俊超，等. 脱氧核糖醛缩酶与醇脱氢酶共催化合成(3*R*，5*S*)-6-氯-2，4，6-三脱氧己内酯[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(2)：25-31.
XUAN K A，ZHANG R Z，RAO J C，et al. Co-catalysis of deoxyribose aldolaseand alcohol dehydrogenase to generate (3*R*，5*S*)-6-chloro-2，4，6-trideoxy-erythro-hexonolactone[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(2)：25-31.(in Chinese)

[12] QIAN Y Y，LIU J，SONG W，et al. Production of β-alanine from fumaric acid using a dual-enzyme cascade[J]. ChemCatChem，2018，10(21)：4984-4991.

[13] WANG J，MA D，MAI D D，et al. β-Alanine production by *L*-aspartate-α-decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* and variants with reduced substrate inhibition[J]. Molecular Catalysis，2022，522：112246.

[14] CHEN J J，ZHU R S，ZHOU J P，et al. Efficient single whole-cell biotransformation for *L*-2-aminobutyric acid production through engineering of leucine dehydrogenase combined with expression regulation[J]. Bioresource Technology，2021，326：124665.

[15] SHILLING P J，MIRZADEH K，CUMMING A J，et al. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*[J]. Communications Biology，2020，3(1)：214.

[16] ZHANG T H，ZHANG R Z，XU M J，et al. Glu56Ser mutation improves the enzymatic activity and catalytic stability of *Bacillus subtilis L*-aspartate α-decarboxylase for an efficient β-alanine production[J]. Process Biochemistry，2018，70：117-123.

[17] LIU H，SONG R R，LIANG Y，et al. Genetic manipulation of *Escherichia coli* central carbon metabolism for efficient production of fumaric acid[J]. Bioresource Technology，2018，270：96-102.

[18] MO Q，MAO A，LI Y R，et al. Substrate inactivation of bacterial *L*-aspartate α-decarboxylase from *Corynebacterium jeikeium* K411 and improvement of molecular stability by saturation mutagenesis[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology，2019，35：62.

[19] SCHUBERT C，ZEDLER S，STRECKER A，et al. *L*-aspartate as a high-quality nitrogen source in *Escherichia coli*：regulation of *L*-aspartase by the nitrogen regulatory system and interaction of *L*-aspartase with GlnB[J]. Molecular Microbiology，2021，115(4)：526-538.

[20] ZHENG R，BLANCHARD J S. Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase[J]. Biochemistry，2001，40(43)：12904-12912.

[21] 林军，廖鲜艳，堵国成，等. 提高耦合系统ATP再生效率促进谷胱甘肽合成的研究[J]. 食品与生物技术学报，2010，29(2)：258-264.
LIN J，LIAO X Y，DU G C，et al. Enhancement of glutathione synthesis by improving ATP-regenerating efficiency in the coupled system[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2010，29(2)：258-264.(in Chinese)

（责任编辑：史润东东）