



产L-天冬氨酸 α -脱羧酶细菌的分离、鉴定及发酵条件优化

冯志彬^{1*}, 张娟², 陈国忠¹, 察亚萍¹, 刘进杰¹, 葛宜和¹, 程仕伟¹, 于波涛¹

¹ 鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025

² 鲁东大学农学院, 山东 烟台 264025

摘要: 【目的】从葡萄园土壤中分离L-天冬氨酸 α -脱羧酶的产生菌株, 对其进行分类鉴定, 优化其产生L-天冬氨酸 α -脱羧酶的发酵条件, 为 β -丙氨酸的生物合成提供基础。【方法】采用变色圈法和液体复筛培养基分离筛选具有L-天冬氨酸 α -脱羧酶活力的菌株, 对菌株进行形态、生理生化特征试验及16S rRNA序列同源性分析鉴定菌株的系统发育学地位, 采用单因素及正交设计试验优化培养基及发酵条件。【结果】筛选到一株L-天冬氨酸 α -脱羧酶高产菌株PanD37, 其亲缘关系和特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)较近, 且形态与培养特征、生理生化特性与特基拉芽孢杆菌基本相符。研究表明其最佳发酵配方和培养条件为: 蔗糖 22.5 g/L、富马酸 7.5 g/L、蛋白胨 20 g/L、L-天冬氨酸 6 g/L、Triton X-100 2 g/L, 起始pH为7.0, 装液量50 mL/500 mL, 摇床转速220 r/min, 种子液接种量为5% (V/V), 35 °C培养28 h。在最优条件下L-天冬氨酸 α -脱羧酶活力可达44.57 U/mL, 比初筛时提高2.57倍。【结论】分离并获得一株特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) PanD37, 经条件优化后具有较高的L-天冬氨酸 α -脱羧酶产生能力, 有望应用于 β -丙氨酸的工业生产。

关键词: L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 特基拉芽孢杆菌, 分离鉴定, 发酵条件优化, β -丙氨酸

β -丙氨酸是天然存在的唯一 β 型非蛋白氨基酸, 用于合成肌肽、泛酸钙、巴柳氮及帕米磷酸钠等医药产品, 用途非常广泛^[1-4]。目前 β -丙氨酸主要采用化学合成法, 存在成本高、条件及生产环境不友好等缺点, 开发绿色安全的生物法生产工艺将具有十分明显的经济和社会效益^[5]。L-天冬氨酸 α -脱羧酶(L-aspartate α -decarboxylase,

ADC, PanD)是微生物泛酸生物合成途径中的关键酶, 由panD基因编码, 以丙酮酰基为催化活性中心, 具有严格的底物特异性, 可以催化L-天冬氨酸脱 α 位羧基生成 β -丙氨酸, 利用该酶以L-天冬氨酸为原料可以实现 β -丙氨酸绿色生物制造^[6]。

利用微生物转化生产 β -丙氨酸的关键是筛选到L-天冬氨酸 α -脱羧酶的高产菌株。L-天冬氨酸

基金项目: 山东省农业重大应用技术创新项目(鲁财指2014-38)

*通信作者: Tel: +86-535-6681053; E-mail: zhibinfeng@126.com

收稿日期: 2015-04-10; 修回日期: 2015-06-08; 网络出版时间: 2015-07-09

α -脱羧酶在大肠杆菌^[7](*Escherichia coli*)、结核分枝杆菌^[8](*Mycobacterium tuberculosis*)、沙门氏菌^[9](*Salmonella typhimurium*)、谷氨酸棒杆菌^[10-11](*Corynebacterium glutamicum*)及幽门螺杆菌^[12](*Helicobacter pylori*)等微生物中均有存在, 针对以上微生物产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的研究较为广泛, 包括酶学性质、培养条件优化及工程菌构建等多个方面并取得了一定的成果。但由于产酶菌株产酶量较低、酶活性低, 难以规模化生产和广泛应用。因此获得产酶量高的菌株, 采用合适的产酶条件是充分发挥L-天冬氨酸 α -脱羧酶功能和 β -丙氨酸工业化生产的关键。

特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)是近年来新记录的枯草芽孢杆菌近缘种^[13], 国内外对该菌的开发利用尚处于起步阶段, 尚未见利用该菌产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的相关报道。本研究室从烟台地区葡萄园土壤中分离筛选到1株高产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*), 并对其产酶条件进行了优化, 旨在为生物合成 β -丙氨酸的工业化生产研究提供科学依据和技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 采集自烟台地区葡萄园土壤。

1.1.2 培养基: 分离平板培养基(g/L): 蛋白胨5, 酵母浸粉5, 牛肉膏5, NaCl 2.5, 葡萄糖5, Tween-80 1, MgSO₄ 0.2, MnSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.4, 柠檬酸二铵2, L-天冬氨酸10, 溴甲酚紫0.06, 琼脂20, pH 5.5。LB培养基(g/L): 酵母浸粉5, 蛋白胨10, NaCl 5, 琼脂20, pH 7.0。基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖20, 蛋白胨20, L-天冬氨酸10, MgSO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.5, pH 7.0。灭菌条件皆为: 121 °C灭菌20 min。

1.1.3 试剂与仪器: 本研究所用试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 细菌微量生化鉴定管购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、Taq DNA聚合酶均购自上海生工生物工程技术服务有限公司; AccQ·Fluor 试剂购自美国Waters公司; SPX-150B-Z生化培养箱购自广东省医疗器械厂; PCR仪购自美国Bio-Rad公司; ZWY-111G恒温振荡摇床购自上海智城分析仪器制造有限公司; LDZX-75KB高压灭菌锅购自上海申安医疗器械厂; TGL-16B高速离心机购自上海安亭科学仪器厂; 高效液相色谱仪购自美国Waters公司, 色谱柱为Waters AccQ-TagTM柱(150 mm×3.9 mm, 4.0 μ m)。

1.2 产L-天冬氨酸 α -脱羧酶菌株的分离筛选

1.2.1 分离: 称取采集到的土样5 g溶于100 mL无菌水中, 充分振荡摇匀, 梯度稀释后涂布于分离平板培养基上, 30 °C恒温培养48 h, 观察记录菌落周围有无蓝紫色变色圈生成, 挑选具有变色圈的菌落, 纯化后LB培养基划线培养后保藏。

1.2.2 初筛: 将分离纯化的单菌落分别挑接于含0.5 mL基础发酵培养基的96孔板, 30 °C下200 r/min振荡培养24 h, 加入1%的L-天冬氨酸并调节pH为7.0转化5 h, 高速离心机8000 r/min离心10 min, 取2 μ L点样于层析滤纸, 层析展开5 h (正丁醇:冰乙酸:乙醇:水=4:1:1:2), 晾干后喷茚三酮显色, 观察 β -丙氨酸色斑, 根据色斑大小与颜色深浅推测菌株产生L-天冬氨酸 α -脱羧酶的能力。

1.2.3 复筛: 分别挑取1环初筛菌株接种于装有100 mL液体发酵培养基的500 mL三角瓶中, 8层纱布封口, 每组3个平行, 于30 °C、200 r/min摇床振荡培养24 h, 测定L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株形态及生理生化鉴定: 肉眼观察细菌在分离培养基上的菌落形态、颜色等; 经过革兰

氏染色后, 在光学显微镜下观察和拍照。参照《常见细菌鉴定手册》^[14]和文献[15]中的生理生化鉴定指标, 对待测菌株进行VP试验、MR试验、耐盐性试验、接触酶试验、糖醇发酵实验、淀粉水解和明胶液化等生理生化指标测定。

1.3.2 分子生物学鉴定: 利用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株的基因组DNA, 并以此为模板采用16S rRNA基因的通用引物27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。反应条件为: 95 °C 5 min; 93 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 70 s, 25个循环; 72 °C 10 min^[15]。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测鉴定后, 交由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序结果经GenBank上利用BLAST程序进行相似性搜索, 选取相似性最高且是有有效发表的典型菌株的序列, 用ClustalX 1.83进行序列比对, 运用MEGA 5.0的Neighbor-Joining (NJ)方法构建系统发育树, 采用Bootstrap (重复抽样1000次)分析评估树的稳定性。

1.4 酶活力测定

酶反应体系: pH 7.0、50 mmol/L磷酸盐缓冲液2.0 mL、发酵液0.1 mL、L-天冬氨酸(200 g/L) 0.4 mL, 用NaOH调节pH使L-天冬氨酸溶解, 反应1 h, 按1:1比例加入10%三氯乙酸, 4 °C放置终止反应, AccQ·Tag法^[16]测酶活, 即使用Waters公司的AccQ·Fluor试剂盒柱前衍生HPLC检测β-丙氨酸含量。酶活定义: 在pH 7.0、温度37 °C的条件下, 每毫升发酵液每1 h转化生成产物β-Ala 1 μmol所需的酶量定义为1个酶活力单位μmol/(mL·h), 简称为U/mL。

1.5 发酵条件优化

1.5.1 不同碳氮源、L-天冬氨酸及表面活性剂对菌株PanD37产L-天冬氨酸α-脱羧酶的影响: 在基础发酵培养基其余组分和培养条件保持不变的情况下, 以20 g/L的比例, 分别添加葡萄糖、蔗

糖、麦芽糖、富马酸、丁二酸、柠檬酸及甘油作为发酵产酶的碳源; 以20 g/L的比例, 分别添加酵母粉、蛋白胨、豆粕水解液、玉米浆、硫酸铵、氯化铵及硝酸铵作为发酵的氮源; 以最适碳氮源为基础, 改变L-天冬氨酸的加量, 共设置2、4、6、8、10 g/L 5个浓度梯度, 以不加L-天冬氨酸的基础发酵培养基为对照组; 另在基础发酵培养基中分别加入不同表面活性剂吐温-20 (1、5、10 g/L)、吐温-80 (1、5、10 g/L)、SDS (0.1、0.5、1.0 g/L)及曲拉通X-100 (0.1、1、5 g/L), 设置不同浓度梯度, 以不添加表面活性剂的基础发酵培养基为对照, 重复3次, 确定最适碳氮源、L-天冬氨酸和表面活性剂。

1.5.2 营养条件的正交试验: 选择最佳碳源(蔗糖富马酸复合碳源)、氮源(蛋白胨)、底物(L-天冬氨酸)、表面活性剂(曲拉通X-100)共4个因素, 设置3个水平, 如表1所示。酶活力按照1.4方法测定, 发酵试验设计3次重复, 取3次实验的平均值作为发酵配方的试验结果。

1.5.3 培养条件优化: 在优化培养基的基础上, 测定在不同培养条件下所得发酵液的L-天冬氨酸α-脱羧酶酶活。(1)起始pH值对菌株PanD37产L-天冬氨酸α-脱羧酶的影响: 在其它培养条件一致的情况下, 将培养基的起始pH值分别调至6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0, 接种后30 °C、200 r/min下振荡培养24 h, 检测L-天冬氨酸α-脱羧酶酶活力, 确定最适pH值。(2)温度对菌株PanD37产L-天

表1. $L_9(3^4)$ 正交试验因素和水平

Table 1. Factors and levels in orthogonal experiment $L_9(3^4)$

Factors/(g/L)	Levels		
	1	2	3
Carbon source A	20	30	40
Nitrogen source B	15	20	25
L-aspartic acid C	4	5	6
Triton X-100 D	1	2	3

冬氨酸 α -脱羧酶的影响：在其它培养条件一致的情况下，分别在25、28、30、33、35、37、40 °C下振荡培养24 h，检测L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力，确定最适发酵温度。(3)装液量对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：在其它培养条件一致的情况下，装液量分别为500 mL摇瓶装液25、50、75、100、150 mL，培养24 h后，检测L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力，确定最佳装液量。(4)转速对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：在其它培养条件一致的情况下，将培养基在150、180、200、220、240 r/min条件下摇床培养24 h后，检测L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力，确定摇床转速。(5)接种量对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：在其它培养条件一致的情况下，将种子液以1%、3%、5%、7%、9%的比例加入到发酵培养基中，振荡培养24 h，检测L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力，确定最适接种量。(6)发酵时间对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：在其它培养条件一致的情况下，摇床振荡培养16、20、24、28、32 h后检测L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力，确定最适发酵时间。全部测定数据均重复3次取平均值。

2 结果和分析

2.1 产L-天冬氨酸 α -脱羧酶菌株的分离

以L-天冬氨酸为诱导物和底物，以溴甲酚紫为显色剂对土壤样本进行分离，当L-天冬氨酸脱羧基后培养基体系pH上升，形成蓝紫色的变色圈，此法可以粗略分离L-天冬氨酸 α -脱羧酶的产生菌株，但不具备专一性。将分离得到的菌株采用96孔板发酵初筛，可以快速处理大量的微生物，加L-天冬氨酸转化5 h，用纸色谱法检测催化产物 β -丙氨酸，通过 R_f 值和产物斑点色度分析，对菌株产生L-天冬氨酸 α -脱羧酶的能力做初步的

定性和半定量分析(图1)，初筛得到的7株较优菌株采用摇瓶发酵测定酶活，发现菌株PanD37酶活力最高，为17.34 U/mL，进一步对该菌株进行鉴定和优化产酶条件。

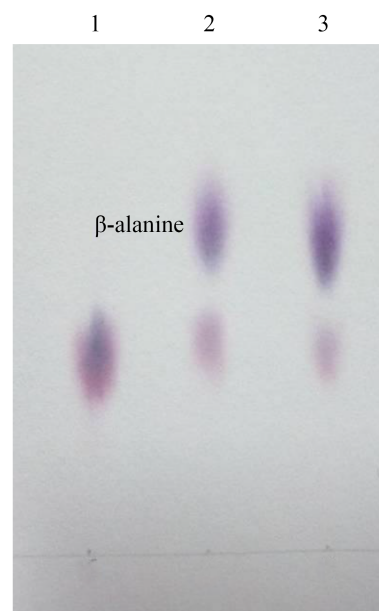


图1. 菌株PanD37转化产物TLC检测

Figure 1. TLC test of transformation products from strain PanD37. Lane 1 is the bioconversion medium without inoculated strain PanD37; lane 2 and lane 3 is the bioconversion medium with inoculated strain PanD37.

2.2 菌株PanD37菌株的鉴定

2.2.1 菌体及菌落形态鉴定：PanD37菌株在分离培养基上能产生明显的变色圈，菌落呈乳白色、近圆形、表面干燥、不透明、有褶皱、无光泽、边缘不规则成裂叶状、易挑取(图2)；通过显微镜观察，杆状、单个不成链、革兰氏阳性，培养48 h后观察芽孢着生在菌体侧端位置或游离存在，不膨大，椭圆形或柱形(图3)。

2.2.2 生理生化指标鉴定：生理生化检测结果表明，菌株PanD37 MR试验、吡啶和硫化氢产生试验、溶血反应、卵磷脂酶及脲酶试验呈阴性，能同化利用大多数的糖醇，不水解淀粉，在2%

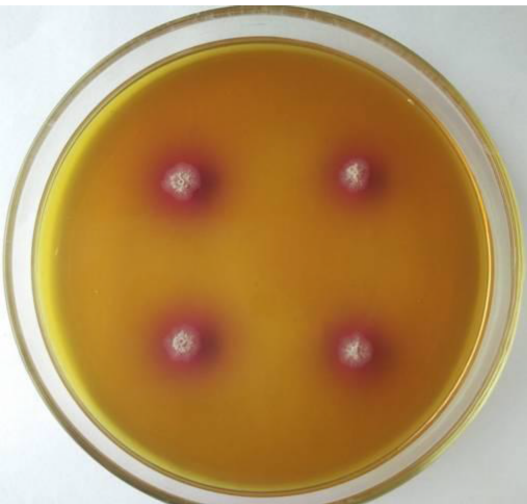


图2. 菌株PanD37 菌落形态
Figure 2. Colonial morphology of strain PanD37.

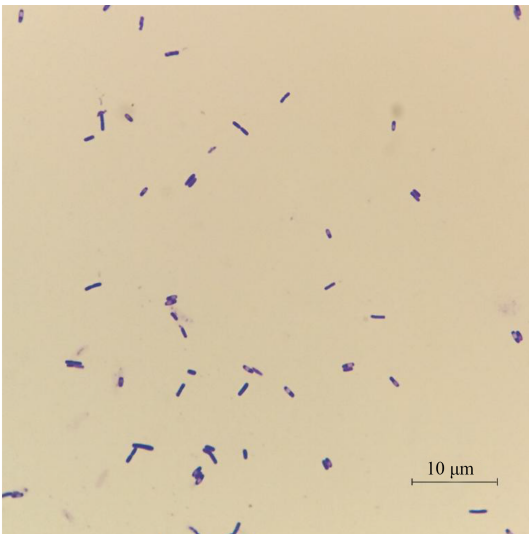


图3. 菌株PanD37革兰氏染色图(×1000)
Figure 3. Gram stain of strain PanD37 (×1000).

NaCl的培养基中不能生长、不耐盐，试验结果详见表2。综合上述试验结果，结合形态学特征，依据《常见细菌系统鉴定手册》，初步将菌株PanD37鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

2.2.3 菌株分子生物学鉴定：将菌株PanD37的16S rRNA进行PCR扩增，得到了一条1500 bp左右大小的条带，测序得到1459 bp的16S rRNA序列，将序列相关信息提交到GenBank，获得登录号

表2. 菌株PanD37的生理生化特征

Table 2. Physiological and biochemical characters of bacillus strain PanD37

Index	PanD37	Index	PanD37
Lactose	+	VP test	+
Sucrose	+	MR test	–
Arabinose	+	Oxidase activity	+
Sorbitol	+	Catalase test	+
Starch hydrolysis	–	Citrate utilization test	+
Heamolytic activity	–	Growth on culture medium with 2% NaCl	–
Urease activity	–	Malonate utilization test	+
Gelatin hydrolysis	+	Indole production	–
Nitric acid reduction	+	H ₂ S production	–
Lecithin hydrolysis	–	Casein decomposition test	+

+: Positive or can be used; –: Negative or can not be used.

KP635214，利用BLAST程序与GenBank中已登录的基因序列进行比对，发现与已知菌株*Bacillus tequilensis*(JX412373)的同源性达到99%以上，选取同源性高且已定名的菌株的相关序列信息，用ClustalX 1.83进行序列比对，用MEGA 5.0中的Neighbor-Joining法构建系统发育树并采用Bootstrap (重复抽样1000次)分析评估树的稳定性(图4)，可以看出，菌株PanD37和*Bacillus tequilensis*的遗传进化距离最近。结合形态学、生理生化特性及16S rRNA基因序列的比对结果，鉴定菌株PanD37为特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)。

2.3 发酵条件优化

2.3.1 碳源对PanD37菌株产L-天冬氨酸α-脱羧酶的影响：菌株PanD37以选定的7种碳源(图5-A)进行发酵试验均可检测到L-天冬氨酸α-脱羧酶酶活，其中以蔗糖为碳源的发酵液酶活最高，为23.18 U/mL，其次是富马酸、麦芽糖、葡萄糖、甘油及丁二酸，柠檬酸产酶效果最差，不到蔗糖

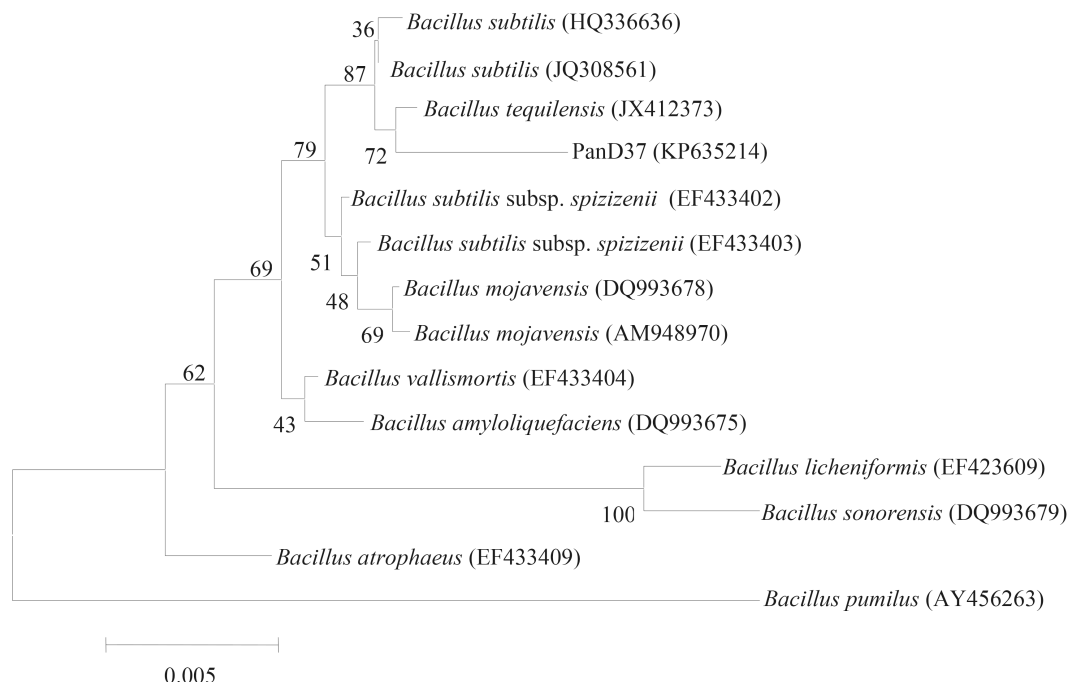


图4. 基于16S rRNA序列的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences similarity of selected strains. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by boot strap. Bar, 0.5% sequence divergence.

作碳源酶活的50%，同时发现使用不同碳源发酵结束时最终pH存在较大差异，葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及甘油偏酸性，富马酸、丁二酸及柠檬酸偏碱性，为平衡发酵体系的pH，选择产酶效果较好的蔗糖和富马酸作为发酵的复合碳源。保持碳源总浓度为20 g/L，分别将蔗糖和富马酸的比例设为1:1、2:1、3:1、4:1及5:1，进行发酵实验，结果发现采用复合碳源后酶活较单一碳源有所提高，但各试验组差别不大，其中以3:1的比例L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活最高，且最终发酵pH基本维持在中性范围(图5-B)。

2.3.2 氮源对PanD37菌株产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：氮源主要用于构成菌体细胞物质氨基酸、蛋白质、核酸以及含氮代谢物，其中有机氮源还含有部分微生物生长所需的生长因子及合成酶的诱导物质，对微生物生长发育和代谢意义重大。由图6可以看出，PanD37菌株对有机氮源利

用效果较好，其中以蛋白胨做氮源时，L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活最高，达到27.73 U/mL，无机氮源产酶活力均低于有机氮源，不再考虑添加，故选择蛋白胨为发酵培养基的氮源。

2.3.3 L-天冬氨酸对PanD37菌株产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响：L-天冬氨酸 α -脱羧酶是诱导酶，培养基中存在L-天冬氨酸方可产生，Yoshihisa等^[17]在培养基中添加1.5%浓度的L-天冬氨酸成功提高了大肠杆菌中L-天冬氨酸 α -脱羧酶的表达量。在优化碳氮源的基础发酵培养基中添加不同浓度的L-天冬氨酸进行发酵产酶，结果发现L-天冬氨酸的浓度对酶活影响较为显著，图7显示对照组酶活最低，仅为5.31 U/mL，随着L-天冬氨酸浓度的增加酶活逐渐提高，且在L-天冬氨酸浓度低于4 g/L时酶活提升较为迅速，这也说明培养基中有机氮源水解产生的少量L-天冬氨酸对于L-天冬氨酸 α -脱羧酶的诱导产生是远远不够的，必须额

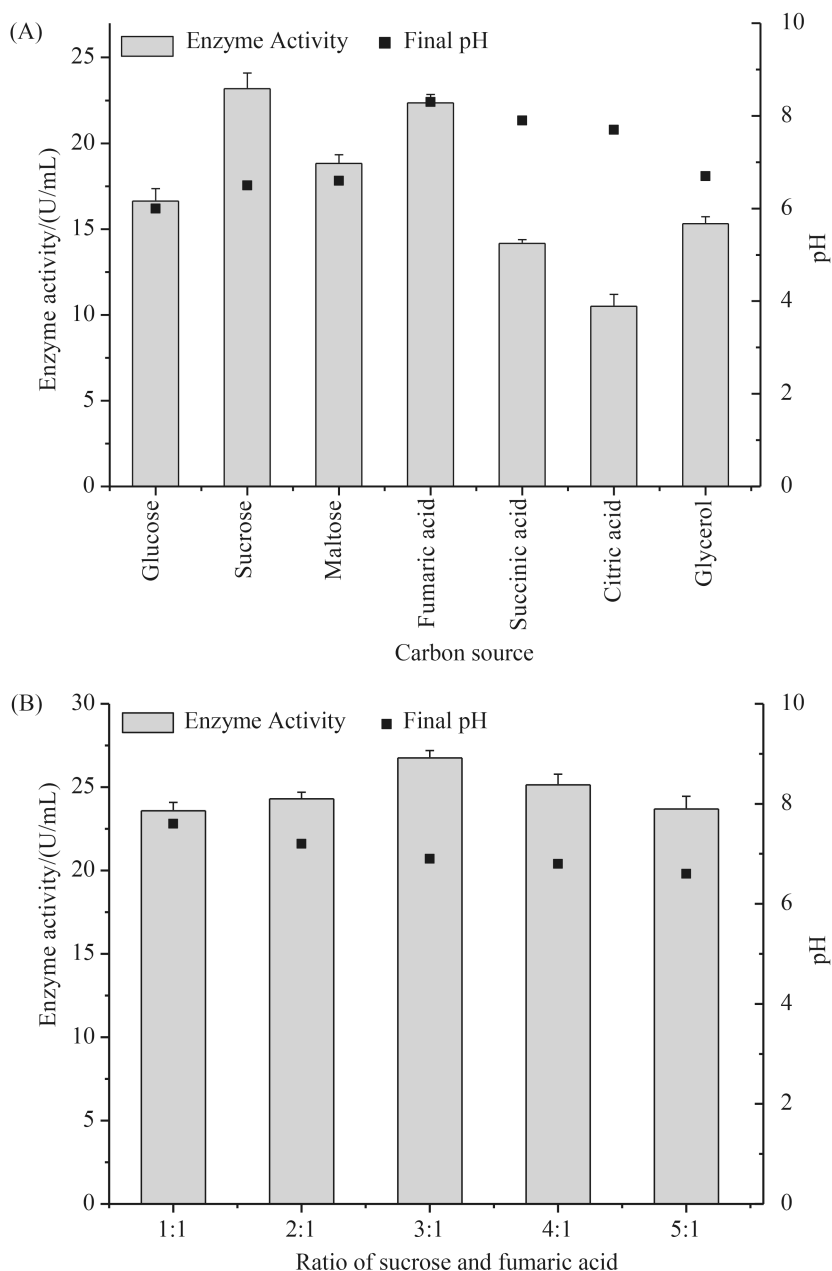


图5. 碳源对菌株PanD37产L-天冬氨酸- α -脱羧酶的影响

Figure 5. Effect of carbon sources on L-aspartate α -decarboxylase activity of submerged cultured PanD37. A: type of carbon sources; B: ratio of sucrose and fumaric acid.

外添加L-天冬氨酸才能保证L-天冬氨酸 α -脱羧酶的有效合成，加量应不低于4 g/L。

2.3.4 表面活性剂对PanD37菌株产L-天冬氨酸- α -脱羧酶的影响：表面活性剂有利于增加微生物细胞膜的通透性，促使胞内产物外渗，消除代谢

产物的负反馈作用，有效提高产物的合成效率^[18]。

表3显示了添加不同表面活性剂对发酵的影响，加入少量阴离子表面活性剂SDS对L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活有轻微的促进作用，当添加量超过0.5 g/L时对酶的合成有明显的抑制作用，同时发现菌体

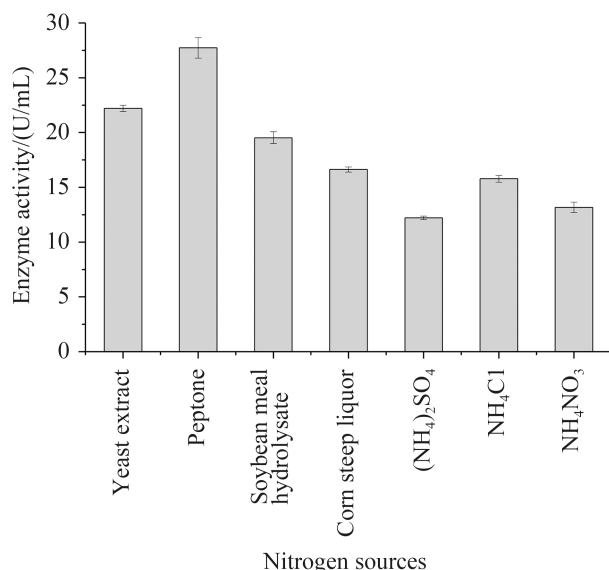


图6. 氮源对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响

Figure 6. Effect of different nitrogen sources on L-aspartate α -decarboxylase activity of submerged cultured PanD37.

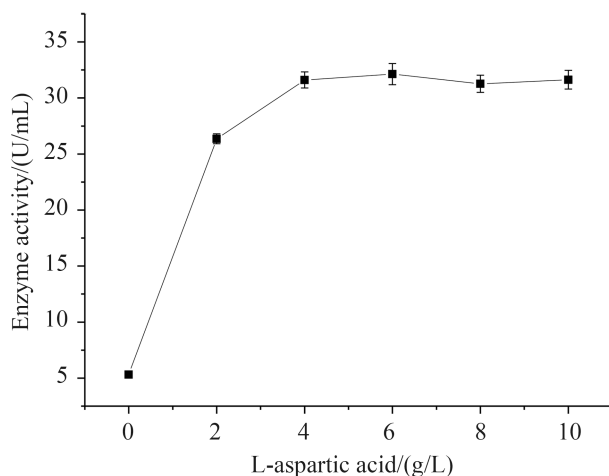


图7. L-天冬氨酸对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响

Figure 7. Effect of L-aspartic acid on L-aspartate α -decarboxylase activity of submerged cultured PanD37.

生长也受到了一定程度的抑制(数据未显示);不同浓度的吐温-20的加入对酶的合成基本无影响,而合适浓度的吐温-80和曲拉通X-100均明显的促进了L-天冬氨酸 α -脱羧酶的合成,尤以曲拉通X-

表3. 不同表面活性剂对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响

Table 3. Effect of different surfactants on L-aspartate α -decarboxylase activity of submerged cultured PanD37

Surfactants	Concentration/(g/L)	Enzyme activity/(U/mL)
Control	0	30.23±0.54
	1.0	30.31±0.63
Tween-20	5.0	31.45±0.56
	10.0	31.27±0.65
	1.0	30.64±0.45
Tween-80	5.0	34.25±0.98
	10.0	32.53±0.79
	0.1	31.44±0.66
SDS	0.5	25.69±0.97
	1.0	16.45±0.37
	0.1	31.22±1.10
Triton X-100	1.0	36.22±1.03
	5.0	29.80±0.77

100的效果最好,添加量为1 g/L时L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活达到了36.22 U/mL。

2.3.5 营养条件的正交试验:对复合碳源(A)、氮源(B)、L-天冬氨酸(C)和曲拉通X-100 (D)进行正交设计试验,进一步确定菌株发酵产酶各因子的最佳配比,结果见表4, R 值(极差)的大小次序($R_A > R_D > R_B > R_C$)说明,影响PanD37菌株发酵生产酶的因子强度顺序依次为复合碳源、曲拉通X-100、氮源及L-天冬氨酸,复合碳源是影响发酵产酶结果的最重要因素。 K 值大小可以反映每个因素在3个不同水平中产酶的能力,单个因素水平上最大均值组合为最佳组合。结合 K 值,适合菌株发酵PanD37产酶的最佳组合为 $A_2B_2C_3D_2$,即复合碳源30 g/L (其中蔗糖22.5 g/L、富马酸7.5 g/L)、蛋白胨20 g/L、L-天冬氨酸6 g/L、曲拉通X-100 2 g/L。

2.3.6 培养条件优化:在确定发酵培养基配方的基础上,通过单因素试验对培养条件进行了优化,结果如表5,除接种量对L-天冬氨酸 α -脱羧酶

表4. 菌株PanD37发酵培养基正交设计 $L_9(3^4)$ 及试验结果
Table 4. Optimization of culture medium of PanD37 by the orthogonal design $L_9(3^4)$

Group	A	B	C	D	Enzyme activity/(U/mL)
1	1	1	1	1	28.09±0.37
2	1	2	2	2	33.12±0.52
3	1	3	3	3	32.43±0.44
4	2	1	2	3	29.92±0.29
5	2	2	3	1	34.82±0.61
6	2	3	1	2	37.31±0.55
7	3	1	3	2	25.44±0.22
8	3	2	1	3	24.95±0.33
9	3	3	2	1	22.51±0.19
K1	31.213	27.817	30.117	28.473	
K2	34.017	30.963	28.517	31.957	
K3	24.300	30.750	30.897	29.100	
R	9.717	3.146	2.380	3.484	

酶活影响不显著外，其他条件均对发酵结果有较大影响。在35 °C条件下菌株产酶活力最高，低于或高于此温度均不利于酶的合成。培养基的起始pH在中性范围内发酵液的酶活力最高，降低或升高pH导致发酵酶活力大幅度衰减，尤其在pH达到9.0时酶活力尚不到最适pH时酶活力的40%。提高转速和减少装瓶量可以提高发酵体系的溶氧浓度，对L-天冬氨酸 α -脱羧酶的合成非常有利，在二者分别为220 r/min和50 mL/500 mL时酶活力最高，说明充足的溶氧对L-天冬氨酸 α -脱羧酶的合成十分必要，但过高的溶氧对发酵存有负效应，继续提高转速或减少装瓶量酶活力会下降。培养16 h L-天冬氨酸 α -脱羧酶已经多量合成，且酶活力随着培养的进行逐步提高，在28 h时达到峰值，继续培养营养条件恶化，菌体生长停滞甚至自溶，酶活力降低。接种量对发酵结果影响不大，在接种量为5%时酶活力稍高。综上所述，培养温度35 °C，培养基起始pH为7.0，装瓶量50

mL/500 mL，摇床转速220 r/min，种子液接种量为5%及振荡培养28 h是菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的最佳培养条件。

2.3.7 发酵条件优化后的验证试验：利用确定的发酵培养基配方和优化后的培养条件，对菌株PanD37发酵，重复3次，测定发酵液中L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力验证优化试验结果。结果(图8)：优化后菌株PanD37所产L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力(44.57 U/mL)明显大于优化前利用基础发酵培养基所产生的酶活力(17.34 U/mL)，酶活力提高了2.57倍，表明此优化的发酵培养基和培养条件有利于L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力的提高。

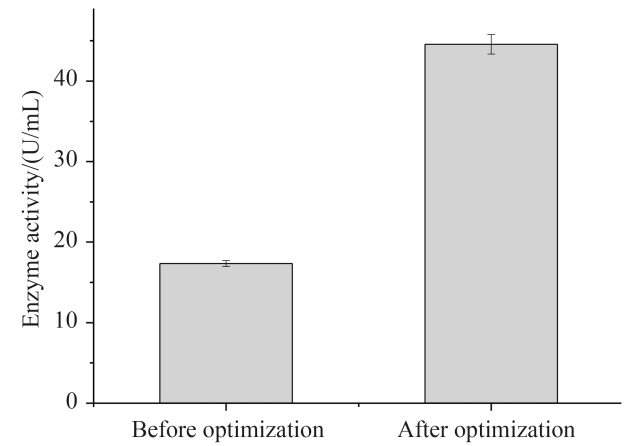


图8. 发酵条件优化前后菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力对比

Figure 8. Comparison of L-aspartate α -decarboxylase activity of PanD37 before and after fermentation optimization.

3 结论

生物酶催化反应条件温和，具有严格的对应或区域选择性，在工业化学合成中应用十分广泛，有机化学品的制造逐渐向生物法靠拢^[19]。目前国内外仍采用化学合成法生产 β -丙氨酸，污染严重、能耗高、低转化率、产物分离困难，产业

表5. 不同培养条件对菌株PanD37产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的影响Table 5. Effect of different culture conditions on L-aspartate α -decarboxylase activity of submerged cultured PanD37

Culture condition	Value	Enzyme activity/(U/mL)	Culture condition	Value	Enzyme activity/(U/mL)
pH	6.0	17.21 \pm 0.12	Temperature/ $^{\circ}$ C	25	22.90 \pm 0.24
	6.5	29.93 \pm 0.36		28	24.36 \pm 0.19
	7.0	38.32 \pm 0.46		30	28.32 \pm 0.35
	7.5	35.74 \pm 0.43		33	32.94 \pm 0.39
	8.0	30.13 \pm 0.37		35	35.23 \pm 0.42
	8.5	23.45 \pm 0.20		37	32.42 \pm 0.51
	9.0	14.51 \pm 0.11		40	21.53 \pm 0.19
Bottle filling volume/mL	25	37.71 \pm 0.53	Rotate/(r/min)	160	24.46 \pm 0.25
	50	37.91 \pm 0.42		180	31.71 \pm 0.35
	75	33.36 \pm 0.37		200	36.71 \pm 0.28
	100	26.63 \pm 0.28		220	39.43 \pm 0.41
	150	19.31 \pm 0.18		240	38.92 \pm 0.49
Inoculation amount/%	1	27.12 \pm 0.3	Inoculation time/h	16	28.17 \pm 0.21
	3	29.32 \pm 0.21		20	32.32 \pm 0.42
	5	31.78 \pm 0.38		24	38.72 \pm 0.32
	7	30.06 \pm 0.26		28	41.76 \pm 0.46
	9	30.48 \pm 0.33		32	40.36 \pm 0.51

技术亟待升级, 寻求生物法生产 β -丙氨酸是未来的必然之路^[20], 筛选高效的L-天冬氨酸 α -脱羧酶产生菌株成为了研究的热点。本文自烟台地区葡萄园土壤中筛选到一株L-天冬氨酸 α -脱羧酶高产菌株PanD37, 其亲缘关系和特基拉芽孢杆菌较近, 且形态与培养特征、生理生化特性与特基拉芽孢杆菌基本相符, 是特基拉芽孢杆菌产生L-天冬氨酸 α -脱羧酶的首次报道, 拓宽了微生物产L-天冬氨酸 α -脱羧酶的菌种范围, 为生产 β -丙氨酸的生物合成提供了新的选择。

在对菌株PanD37培养条件优化研究中发现培养基中添加22.5 g/L蔗糖、7.5 g/L富马酸、20 g/L蛋白胨、6 g/L L-天冬氨酸、2 g/L Triton X-100, 控制起始pH为7.0, 35 $^{\circ}$ C, 装液量50 mL/500 mL, 220 r/min, 接种量为5%的条件下摇瓶振荡培养

28 h, L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力最高可以达到44.57 U/mL, 高于以往报道的野生细菌及大部分工程菌的发酵水平, 说明该菌株是一株具有应用价值的高产菌株, 具有工业化应用的潜力。若经过菌种诱变或构建工程菌株后, L-天冬氨酸 α -脱羧酶酶活力仍有进一步提高的可能, 相关研究正在深入进行中。

参考文献

- [1] Cronan JE Jr. β -Alanine synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1980, 141(3): 1291–1297.
- [2] Decker EA, Livisay SA, Zhou S. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. *Biochemistry (Moscow)*, 2000, 65(7): 766–770.
- [3] Gopalakrishnan J, Decker EA, Means WJ. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts. *Meat Science*, 1999,

- 52(1): 101–110.
- [4] Nozaki S, Webb ME, Niki H. An activator for pyruvoyl-dependent L-aspartate α -decarboxylase is conserved in a small group of the γ -proteobacteria including *Escherichia coli*. *Microbiology Open*, 2012, 1(3): 298–310.
- [5] Shen Y, Zhao LZ, Li YR, Zhang L, Shi GY. Synthesis of β -alanine from L-aspartate using L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(8): 1681–1686.
- [6] Gao LJ, Qiu JP. Research advances in L-aspartate decarboxylase. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(5): 54–58. (in Chinese)
高丽娟, 裘娟萍. L-天冬氨酸脱羧酶研究进展. *工业微生物*, 2007, 37(5): 54–58.
- [7] Williamson JM, Brown GM. Purification and properties of L-aspartate- α -decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of β -alanine in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(16): 8074–8082.
- [8] Gopalan G, Chopra S, Ranganathan A, Swaminathan K. Crystal structure of uncleaved L-aspartate- α -decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65(4): 796–802.
- [9] Ortega MV, Cárdenas A, Ubiera D. PanD, a new chromosomal locus of *Salmonella typhimurium* for the biosynthesis of β -alanine. *Molecular and General Genetics*, 1975, 140(2): 159–164.
- [10] Dusch N, Pühler A, Kalinowski J. Expression of the *Corynebacterium glutamicum* panD gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1530–1539.
- [11] Cui WJ, Shi ZX, Fang YQ, Zhou L, Ding N, Zhou ZM. Significance of Arg3, Arg54, and Tyr58 of L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in the process of self-cleavage. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(1): 121–126.
- [12] Lee B II, Suh SW. Crystal structure of the schiff base intermediate prior to decarboxylation in the catalytic cycle of aspartate α -decarboxylase. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(1): 1–7.
- [13] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart ME. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1475–1484.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 43–65, 364–398.
- [15] Cao FM, Yang XH, Ma MC, Chen HJ, Shen DL, Li J. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species. *Microbiology China*, 2014, 41(5): 968–974. (in Chinese)
曹凤鸣, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(5): 968–974.
- [16] Zhao LZ, Zhang L, Shi GY. Expression of L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* and its application in enzymatic synthesis of β -alanine. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2161–2170. (in Chinese)
赵连真, 张梁, 石贵阳. 谷氨酸棒杆菌L-天冬氨酸 α -脱羧酶在大肠杆菌中的表达及酶转化生产 β -丙氨酸. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2161–2170.
- [17] Nakano Y, Kitaoka S. L-Aspartate α -decarboxylase in a cell-free system from *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*, 1971, 70(2): 327–334.
- [18] Ballesteros I, Olivia JM, Carrasco J, Cabañas A, Navarro AA, Ballesteros M. Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 70–72(1): 369–381.
- [19] Ogawa J, Shimizu S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17(1): 13–20.
- [20] 高丽娟. L-天冬氨酸 α -脱羧酶生产 β -丙氨酸的研究. 浙江工业大学硕士学位论文, 2007.

Isolation, identification and fermentation optimization of *Bacillus tequilensis* PanD37 producing L-aspartate α -decarboxylase

Zhibin Feng^{1*}, Juan Zhang², Guozhong Chen¹, Yaping Cha¹, Jinjie Liu¹, Yihe Ge¹, Shiwei Cheng¹, Botao Yu¹

¹ College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, Shandong Province, China

² College of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] We screened bacteria producing L-aspartate α -decarboxylase from grapery soil and optimized the fermentation conditions. [Methods] L-aspartate α -decarboxylase producing bacteria were screened by color-changing circle and liquid secondary screening culture media. Combination of morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis were used to identify the bacteria. Fermentation conditions were optimized by single factor test and orthogonal experiment. [Results] Strain PanD37 showed high L-aspartate α -decarboxylase producing property and was identified as *Bacillus tequilensis*. The optimum fermentation conditions of PanD37 were liquid volume of 50 mL in 500 mL flask, 220 r/min at 35 °C, inoculation amount of 5% for 28 h with a medium of 22.5 g/L sucrose, 7.5 g/L fumaric acid, 20 g/L peptone, 6 g/L L-aspartic acid, 2 g/L Triton X-100, at initial pH of 7.0. Under the optimal fermentation conditions, the highest L-aspartate α -decarboxylase activity reached 44.57 U/mL, which was 2.57 folds higher than that obtained before optimization. [Conclusion] Strain PanD37 was identified as *Bacillus tequilensis* which was capable of highly producing L-aspartate α -decarboxylase under the optimal fermentation conditions.

Keywords: L-aspartate α -decarboxylase, *Bacillus tequilensis*, isolation and identification, optimization of fermentation conditions, β -alanine

(本文责编: 李磊)

Supported by the Innovation Fund of Agriculture Major Applied Technology of Shandong Province (2014-38)

*Corresponding author. Tel: +86-535-6681053; E-mail: zhibinfeng@126.com

Received: 10 April 2015; Revised: 8 June 2015; Published online: 9 July 2015