

L-丙氨酸转化菌发酵条件的优化

徐慧¹, 崔颖¹, 王珊珊¹, 田延军¹, 贺强之¹, 韩延雷¹, 刘建军^{1*}, 朱坤福², 祝蕾², 姜国政³

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省食品发酵工业研究设计院, 山东 济南 250013; 2. 山东朱氏药业集团有限公司, 山东 菏泽 274300; 3. 烟台恒源生物股份有限公司, 山东 烟台 265709)

摘要: 产 L-天冬氨酸-β-脱羧酶(L-aspartate-β-decarboxylase, Asd)菌株以 L-天冬氨酸(L-aspartic acid, L-Asp)为底物转化生产 L-丙氨酸, 通过单因素及正交设计试验对产 L-丙氨酸菌株 HY-08D 培养基组成及发酵条件进行优化。结果表明, 最佳培养基组成: 富马酸 1.0%、L-Asp 1.0%、谷氨酸 1.0%、玉米浆干粉 0.6%、酵母粉 0.8%、氯化钠 0.7%、磷酸二氢钾 0.15%、硫酸镁 0.1%, pH 6.0。产酶菌株 HY-08D 转化用培养液采用三级扩培, 一级接二级使用 0.1% 低接种量, 二级接三级使用 10% 的接种量, 最适通气量为 10 L/min。优化后培养液中 HY-08D 菌体量和酶活较初始提高约 1 倍, 培养周期缩短 6 h~8 h。

关键词: L-丙氨酸; 产 L-丙氨酸菌株; 发酵条件; 酶活; 优化

Fermentation Conditions Optimization of L-Alanine-producing Bacteria

XU Hui¹, CUI Ying¹, WANG Shan-shan¹, TIAN Yan-jun¹, HE Qiang-zhi¹, HAN Yan-lei¹, LIU Jian-jun^{1*}, ZHU Kun-fu², ZHU Lei², JIANG Guo-zheng³

(1. Shandong Food Ferment Industry Research & Design Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250013, Shandong, China; 2. Shandong Zhushi Pharmaceutical Group Co., Ltd., Heze 274300, Shandong, China; 3. Yantai Hengyuan Bioengineering Co., Ltd., Yantai 265709, Shandong, China)

Abstract: The L-aspartate-β-decarboxylase (Asd)-producing strain transforms L-alanine with L-aspartic acid (L-Asp) as substrate. The single factor and orthogonal experiments were employed to optimize the culture medium and fermentation conditions for Asd production by *Comamonas testosteroni* HY-08D. The optimal fermentation medium consisted of the following: fumaric acid 1.0%, L-Asp 1.0%, glutamic acid 1.0%, corn starch powder 0.6%, yeast extract 0.8%, NaCl 0.7%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄ 0.1%, pH 6.0. The medium for the transformation of HY-08D strain was expanded in three-stage culture. A low inoculation amount of 0.1% was used from the first to the second stage. 10% quantity of inoculation was used from the second to the third stage. The optimal ventilatory capacity was 10 L/min. The biomass and enzyme activity of HY-08D in optimized medium had doubled, and the culture period was shortened by 6 h~8 h compared with the initial state.

Key words: L-alanine; *Comamonas testosteroni*; fermentation condition; enzyme activity; optimization

引文格式:

徐慧, 崔颖, 王珊珊, 等. L-丙氨酸转化菌发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 177-182.

XU Hui, CUI Ying, WANG Shanshan, et al. Fermentation Conditions Optimization of L-Alanine-producing Bacteria[J]. Food Research and Development, 2021, 42(7): 177-182.

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY010341); 山东省泰山产业领军人才建设项目(鲁政办字<2019>190号); 山东省中央引导地方科技发展资金项目(YDZX20203700003052)

作者简介: 徐慧(1980—), 女(汉), 研究员, 博士, 研究方向: 应用微生物。

* 通信作者: 刘建军(1962—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 微生物资源利用。

L-丙氨酸,又名L-2-氨基丙酸,是一种具有重要生理功能的非必需氨基酸,在食品、医药等领域具有广泛的应用,并有日益增长的趋势^[1-2]。食品应用方面,L-丙氨酸具有甜味与鲜味,被用于食品添加剂,改善食品风味并强化营养,此外其还具有较强的防腐保鲜功能,被用作防腐剂^[3-6]。医药应用方面,L-丙氨酸是复合氨基酸注射液的组成成分之一,是合成维生素B₅、维生素B₆、L-氨基丙醇(盐酸左氧氟沙星)和抗癌药4-羟基水杨醛丙氨酸合锌的前体物质^[7-8]。此外,L-丙氨酸可用于合成具有光学活性的聚合物,在生物医学、液晶、手性催化等领域具有重要的价值^[9]。

L-丙氨酸可以通过提取法、化学合成法和生物转化法进行制备。其中,酶法转化是目前工业上的主要生产方法,即利用L-天冬氨酸- β -脱羧酶(L-aspartate- β -decarboxylase, Asd)以L-天冬氨酸(L-aspartic acid, L-Asp)为原料经脱羧生成L-丙氨酸。1951年,MEISTER等^[10]首次发现了韦尔奇梭菌(*Clostridium welchii*)能催化L-Asp合成L-丙氨酸。随后国内外很多研究人员对此法生产L-丙氨酸进行了深入的研究。SHIBATANI等^[11]以*Pseudomonas dacunhae*为产酶菌株,研究不同氨基酸作为氮源对产酶的影响,结果发现L-谷氨酸诱导后产酶量是未添加L-谷氨酸的2倍。徐虹等^[12]通过诱变育种获得一株高Asd活性的菌株*Pseudomonas* NX-1,每升培养液可转化L-Asp达1.4 kg,L-丙氨酸含量可达到90%以上,摩尔转化率接近100%。储瑞嵩等^[13]对产酶菌株*P. dacunhae* CPU9001进行了固定化,并优化了其催化L-Asp合成L-丙氨酸的发酵条件,每1 kg固定化细胞可转化2 kg底物,转化率大于98%,产物收率大于85%,固定化细胞酶活半衰期大于80 d,产品纯度大于98.5%。周丽等^[14]以大肠杆菌为出发菌株,敲除编码乳酸、甲酸、乙酸、乙醇、琥珀酸和丙氨酸消旋酶的基因,导入嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)来源的L-丙氨酸脱氢酶基因(*alaD*),构建的重组菌以初始浓度30 g/L的葡萄糖作碳源,经补料发酵得到67.2 g/L L-丙氨酸。徐友强等^[7]将来源于鞣丸酮丛毛单胞菌的Asd基因克隆至大肠埃希氏菌CICC11022S中,构建了一株转化富马酸生产L-丙氨酸的重组工程菌,该菌9 h转化富马酸生成112.7 g/L产物,生产速率为12.5 g/(L·h),转化率为93.8%。

Asd是至今在自然界中唯一的氨基酸- β -脱羧酶,以5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)为辅酶因子,是L-丙氨酸合成的关键酶^[15]。汪芳^[16]实现了*P. dacunhae*来源的Asd(*aspD*)基因在大肠杆菌中的

异源表达,通过定点突变改善了该酶在酸性环境中的催化能力,获得组合突变体酶N34D/L484M,酶比活力达116.27 U/mg,比原始酶提高了76.30%。于封印等^[17]首次在大肠杆菌中异源表达不动杆菌来源Asd,对其酶学性质进行分析,为工业生产L-丙氨酸提供参考。Asd在德阿昆哈假单胞菌(*Pseudomonas dacunhae*)^[18]、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)^[19]、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)^[20]、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)^[21]、小球诺卡氏菌(*Nocardia globetula*)^[22]等微生物中均有存在,但由于产酶菌株产酶量低、酶活性低,难以实现规模化生产,因此,选育Asd高产菌株、优化发酵条件和提高酶活力是酶转化生产L-丙氨酸的关键。

本研究在前期通过菌种诱变选育出一株高产Asd的L-丙氨酸转化菌,本文对其产酶条件进行优化,旨在为生物合成L-丙氨酸的工业化生产研究提供科学依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及培养基

鞣丸酮丛毛单胞菌株HY-08D(CGMCC No. 6083):烟台恒源生物股份有限公司。

1.1.2 培养基

斜面及平板培养基:蛋白胨1%,酵母膏0.5%,牛肉膏0.5%,氯化钠0.5%,琼脂2%,pH 7.0~7.2。

液体培养基:玉米浆干粉0.8%,蛋白胨0.8%,磷酸二氢钾0.15%,氯化钠0.5%,硫酸镁0.1%,pH 7.0~7.2。

1.1.3 试剂

酵母膏、牛肉膏、玉米浆、蛋白胨:北京奥博星生物技术有限公司;玉米浆干粉(生化试剂):山东康源生物科技有限公司;富马酸(分析纯):烟台恒源生物有限公司;氯化钠、硫酸镁、磷酸二氢钾、葡萄糖(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

XNP-9052BS-III生化培养箱、XL-YC恒温摇床:上海馨朗电子科技有限公司;722型分光光度计:上海天普分析仪器有限公司;LDZX-75KBS立式压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂;PY-P10 pH计、BSA124S-C电子分析天平:德国赛多利斯公司。

1.3 试验方法

1.3.1 种子培养及发酵培养

种子培养:接一环生长良好的斜面种子至500 mL(装液量50 mL)锥形瓶中,180 r/min,30℃,培养12 h~

24 h。

摇瓶培养:将种子液按 2%(体积分数)接种量转接至 500 mL(装液量 50 mL)锥形瓶中,180 r/min,培养 12 h~24 h。

发酵罐培养:将种子液按 0.1%~10%(体积分数)接种量转接至发酵罐(装液量 70%)中,150 r/min,培养 12 h~24 h。

1.3.2 菌株生长情况测定

发酵液稀释 10 倍,在 640 nm 测定吸光度值,以 OD_{640} 代表菌株生长情况。

1.3.3 酶活的测定

取 25 mL 发酵液,加入 1 g L-Asp,用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 5.0,在 37 ℃水浴摇床中振荡 30 min,微波炉加热 1 min,终止反应,利用纸层析法分析反应液中 L-丙氨酸的含量,计算酶活。每小时催化消耗 1 μ mol L-Asp 的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.3.4 培养基组分及培养条件优化

1.3.4.1 碳源优化

基础发酵培养基其余组分和培养条件不变的情况下,以 1%的比例,分别添加富马酸、L-Asp、谷氨酸和葡萄糖作为发酵产酶的碳源,以原始培养基为对照考察其对菌株 HY-08D 生长及产酶的影响。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对以上 4 种碳源添加量进行优化。正交试验设计因素与水平如表 1 所示。

表 1 菌株 HY-08D 碳源正交试验因素与水平
Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment of carbon sources by HY-08D strain

水平	因素			
	A 富马酸添 加量/%	B L-Asp 添 加量/%	C 谷氨酸添 加量/%	D 葡萄糖添 加量/%
1	0.5	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.5	1.5	1.5	1.5

1.3.4.2 氮源、氯化钠和 pH 值优化

在优化碳源基础上,控制其它条件不变,以 0.8%的比例,分别添加玉米浆干粉、酵母粉和蛋白胨作为发酵的氮源,考察其对菌株 HY-08D 生长及产酶的影响。通过正交试验对 2 种氮源添加量、氯化钠添加量和 pH 值的水平进行优化。正交试验设计因素与水平如表 2 所示。

1.3.4.3 扩培级数和接种量优化

采用三级扩培,一级采用摇瓶培养,二级采用 2 m³ 发酵罐,二级培养液分别按 0.1%、1.0%、5.0%和 10%(体积分数)接种量转接至 20 m³ 发酵罐(装液量为

表 2 菌株 HY-08D 氮源、氯化钠和 pH 值正交试验因素与水平
Table 2 Factors and levels in orthogonal experiment of nitrogen sources, NaCl and pH by HY-08D strain

水平	因素			
	A 玉米浆干粉添 加量/%	B 酵母粉添 加量/%	C 氯化钠添 加量/%	D pH 值
1	0.6	0.6	0.3	5.5
2	0.8	0.8	0.5	6.0
3	1.0	1.0	0.7	6.5

70%)中,150 r/min,30 ℃,培养 24 h,每 2 h 取样测定 OD_{640} 和酶活。

1.3.4.4 通气量优化

按照优化后配方配制培养基,培养液按 10%(体积分数)接种量转接至 50 L(装液量 42.5 L)发酵罐中培养,150 r/min,30 ℃,用氢氧化钠调节初始 pH 6.0,设置通气量分别为 6、8、10、12、14 L/min,考察其对菌株 HY-08D 生长和产酶的影响。

1.4 统计学分析

正交试验采用正交设计助手 V3.1 软件通过直观分析对菌株 HY-08D 培养基组分及培养条件进行优化,其它数据采用 Origin8.1 软件处理。

2 结果与分析

2.1 碳源优化

2.1.1 碳源种类对菌株 HY-08D 生长及产酶的影响

碳源种类对菌株 HY-08D 生长及产酶的影响见图 1。

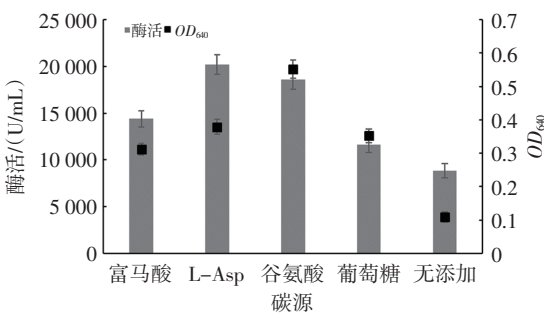


图 1 碳源对菌株 HY-08D 生长及产酶的影响
Fig.1 Effect of carbon source on the growth and enzyme production by HY-08D strain

从图 1 可以看出,在添加量相同的条件下,选择富马酸、L-Asp、谷氨酸和葡萄糖作为碳源, OD_{640} 均有所增加,以谷氨酸为碳源时菌体生长最好,以 L-Asp 为碳源时,酶活最高。

2.1.2 正交试验结果

正交试验结果见表 3。

表3 菌株HY-08D碳源添加正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of carbon sources addition by HY-08D strain

试验号	A 富马酸添加量	B L-Asp 添加量	C 谷氨酸添加量	D 葡萄糖添加量	OD ₆₄₀	酶活/(U/mL)
1	1	1	1	1	0.189	28 571
2	1	2	2	2	0.522	53 571
3	1	3	3	3	0.366	33 929
4	2	1	2	3	0.445	42 857
5	2	2	3	1	0.388	50 000
6	2	3	1	2	0.231	25 000
7	3	1	3	2	0.324	25 000
8	3	2	1	3	0.333	42 857
9	3	3	2	1	0.322	26 786
OD ₆₄₀	k ₁	0.359	0.319	0.251	0.300	
	k ₂	0.355	0.414	0.430	0.359	
	k ₃	0.326	0.306	0.359	0.381	
	R	0.033	0.108	0.179	0.081	
酶活	k ₁	38 690	32 143	32 143	35 113	
	k ₂	39 286	48 809	41 071	34 524	
	k ₃	31 548	28 572	36 310	39 881	
	R	7 738	20 237	8 928	5 357	

从表3可以看出,影响菌株HY-08D生长的因子顺序为:谷氨酸添加量>L-Asp添加量>葡萄糖添加量>富马酸添加量,影响菌株HY-08产酶的因子顺序为:L-Asp添加量>谷氨酸添加量>富马酸添加量>葡萄糖添加量;结合k值,适合菌株HY-08D生长的最佳组合为A₁B₂C₂D₃;适合菌株HY-08D产酶的最佳组合为A₂B₂C₂D₃。葡萄糖添加量对菌株产酶影响最小,不再考虑添加,而富马酸添加量对菌株产酶的影响比其对生长的影响要大,综合考虑,最佳碳源组合为A₂B₂C₂,即富马酸1%,L-Asp 1%,谷氨酸1%。在最佳碳源组合下进行验证试验,OD₆₄₀达到0.536,酶活达到53 927 U/mL,均高于正交试验中各试验组,表明优化后碳源有利于菌株生长和产酶。

2.2 氮源、氯化钠和pH值优化结果

2.2.1 氮源种类对菌株HY-08D生长及产酶的影响

氮源种类对菌株HY-08D生长及产酶的影响见图2。

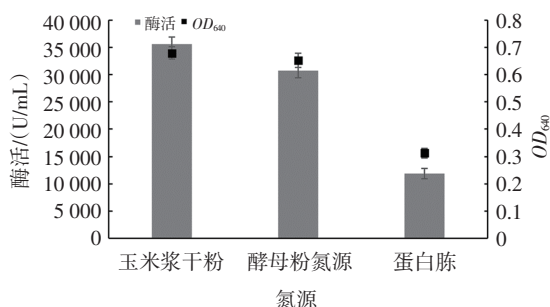


图2 氮源对菌株HY-08D生长和产酶的影响

Fig.2 Effect of nitrogen source on the growth and enzyme production by HY-08D strain

从图2可以看出,在添加量相同的条件下,单独添加蛋白胨不利于菌株生长,酶活力较低;单独添加玉米浆干粉和酵母粉,OD₆₄₀和酶活相对较高,因此,针对两者复合的添加量做了进一步分析以确定最佳配比。除了培养基组分外,适宜的初始pH值也是十分重要的。Asd进行脱羧反应时,酸性底物(如L-Asp)的加入会引起反应液pH值升高,不利于菌株生长,导致酶活力下降甚至失活。

2.2.2 正交试验结果

正交试验结果见表4。

从表4可以看出,影响菌株HY-08D生长的因子顺序为:pH值>玉米浆干粉添加量>氯化钠添加量>酵母粉添加量;影响菌株HY-08D产酶的因子顺序为:pH值>氯化钠添加量>酵母粉添加量>玉米浆干粉添加量。结合k值,适合菌株HY-08D生长的最佳组合为A₁B₁C₁D₂;适合菌株HY-08D产酶的最佳组合为A₃B₂C₃D₂。玉米浆干粉添加量对菌株生长的影响比其对产酶的影响较大,而酵母粉和氯化钠添加量对菌株产酶的影响比其对生长的影响较大,综合考虑,最佳氮源、氯化钠添加量及pH值组合为A₁B₂C₃D₂,即玉米浆干粉0.6%,酵母粉0.8%,氯化钠0.7%,pH 6.0。在最佳培养基组合下进行验证试验,OD₆₄₀达到0.698,酶活达到54 837 U/mL,均高于正交试验中各试验组,表明优化后的培养基可以提高单位体积培养液中菌体浓度和酶活力。

2.3 扩培级数和接种量优化

不同接种量下菌株HY-08D三级培养液的生长曲线和酶活曲线分别见图3和图4。

表 4 菌株 HY-08D 氮源、氯化钠和 pH 值的正交试验结果
Table 4 Orthogonal test results of nitrogen sources, NaCl and pH by HY-08D strain

试验号	A 玉米浆干粉添加量	B 酵母粉添加量	C 氯化钠添加量	D pH 值	OD ₆₄₀	酶活/(U/mL)
1	1	1	1	1	0.437	38 176
2	1	2	2	2	0.507	54 000
3	1	3	3	3	0.450	51 725
4	2	1	2	3	0.529	47 473
5	2	2	3	1	0.364	47 077
6	2	3	1	2	0.603	47 077
7	3	1	3	2	0.561	50 736
8	3	2	1	3	0.642	45 791
9	3	3	2	1	0.393	47 769
OD ₆₄₀	k ₁	0.610	0.509	0.561	0.398	
	k ₂	0.499	0.504	0.476	0.557	
	k ₃	0.532	0.482	0.458	0.540	
	R	0.111	0.027	0.103	0.159	
酶活	k ₁	47 967	45 462	43 681	44 341	
	k ₂	47 209	48 956	49 747	50 604	
	k ₃	48 099	48 857	49 846	48 330	
	R	890	3494	6 165	6 263	

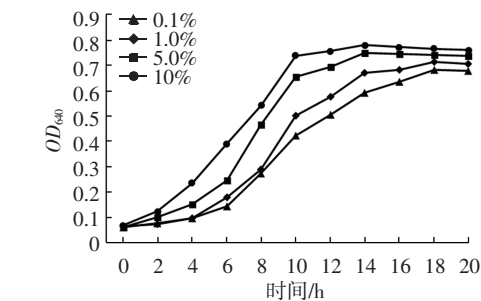


图 3 不同接种量下菌株 HY-08D 三级培养液生长曲线
Fig.3 The growth curve of the third stage culture solution by HY-08D strain

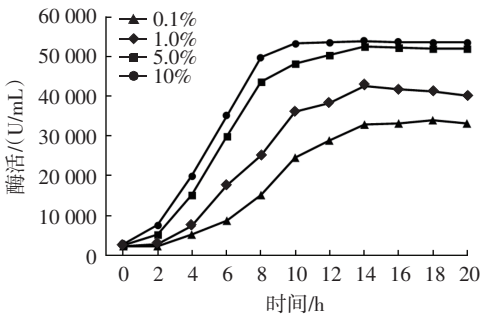


图 4 不同接种量下菌株 HY-08D 三级培养液酶活曲线
Fig.4 The enzyme activity curve of the third stage culture solution by HY-08D strain

微生物发酵种子培养通常采用逐级扩培的方式，但在实际生产中，为了降低接种过程染菌风险，通常采用二级或三级放大。目前，丙氨酸生产中，产酶菌株

HY-08D 转化用培养液采用二级培养，一级利用摇瓶培养，二级利用发酵罐培养，接种量只有 0.1%，培养周期需要 16 h~20 h。因此，本研究对扩培级数和接种量进行了优化，从图 3 和图 4 可以看出，增加接种量不仅可以缩短菌株生长周期，还可以提高单位发酵液中的 Asd 酶活。在整个培养阶段，接种量为 10 %时，培养周期相较于二级扩培缩短了 6 h~8 h，酶活提高了约 1 倍。

2.4 通气量优化

通气量对菌株 HY-08D 发酵过程的影响见表 5。

表 5 通气量对菌株 HY-08D 发酵过程的影响
Table 5 Effects of aeration on the fermentation of HY-08D strain

通气量/ (L/min)	培养周期 /h	OD ₆₄₀	pH 值	酶活/ (U/mL)
6	11	0.695	8.2	38 475
8	12	0.776	8.4	45 468
10	11	0.764	8.6	55 100
12	12	0.711	8.9	54 042
14	12	0.759	9.1	53 109

L-丙氨酸转化菌是好氧菌，需通气培养，通气量主要影响培养液的溶氧，进而影响菌株生长代谢。从表 5 可以看出，通气量对菌株 HY-08D 培养周期和 OD 值影响不明显，而对 pH 值和酶活影响显著。通气量为 10 L/min 时，酶活达到 5.51×10⁴ U/mL，但继续增加通气量并不会提高酶活力。因此，菌株 HY-08D 发酵过程中最适通气量为 10 L/min。

3 结论

本研究通过单因素及正交试验对羧基酮丛毛单胞菌 HY-08D 培养基进行优化, 获得最佳培养基配方: 富马酸 1.0%, L-Asp 1.0%, 谷氨酸 1.0%, 玉米浆干粉 0.6%, 酵母粉 0.8%, 氯化钠 0.7%, 磷酸二氢钾 0.15%, 硫酸镁 0.1%, pH 6.0。通过转接试验, 确定了菌株 HY-08D 转化液采用三级扩培, 三级种子的最佳接种量为 10%, 发酵过程中最适通气量为 10 L/min。在上述最佳培养基及培养条件下, 优化后培养液中 HY-08D 菌体量和酶活较初始提高约 1 倍, 培养周期缩短 6 h~8 h, 为实现 L-丙氨酸的高效转化和产业化生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] 付刚, 付相敏, 刘枣, 等. 大肠杆菌 JH-B2 产 L-丙氨酸发酵工艺的研究[J]. 湖北工业大学学报, 2017, 32(1): 116-120.
- [2] 田宋魁, 郭恒华, 张冬竹, 等. L-丙氨酸生产工艺的研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2017, 25(8): 12-14.
- [3] 郭媛, 王丽娟, 邱婷, 等. L-丙氨酸在食品工业中的应用潜力[J]. 中国调味品, 2017, 42(7): 177-180.
- [4] BACHMANOV A A, BOSAK N P, GLENDINNING J I, et al. Genetics of amino acid taste and appetite[J]. Advances in Nutrition, 2016, 7(4): 806S.
- [5] LEE M, SMITH G M, EITEMAN M A, et al. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli aceF IdhA* mutants expressing the *Bacillus sphaericus alaD* gene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 56-60.
- [6] HERBERT J, MARK S, HARGROVE. Essentials of Biochemistry [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2012: 279-292.
- [7] 徐友强, 马玉岳, 姚栗, 等. 重组大肠杆菌转化富马酸生产 L-丙氨酸[J]. 生物加工过程, 2016, 14(2): 7-11.
- [8] 王贝贝, 曹恒霞, 张建嵩, 等. 膜技术在 L-丙氨酸提纯工艺中的应用研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(9): 101-103.
- [9] 翟宁, 牛小玲. 氢键型 N-马来酰-L-丙氨酸/PVA 旋光性聚合物的合成[J]. 合成树脂及塑料, 2016, 33(5): 26-28.
- [10] MEISTER A, SOBER H A, TICE S V. Enzymatic decarboxylation of aspartic acid to α -alanine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 189(2): 577.
- [11] SHIBATANI T, KAKIMOTO T, CHIBATA I. Stimulation of L-aspartate β -decarboxylase formation by L-glutamate in *Pseudomonas dacunhae* and improved production of L-alanine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(3): 359-364.
- [12] 徐虹, 王雪根. L-丙氨酸酶法工业生产的研究 [J]. 工业微生物, 1997, 27(2): 17-20.
- [13] 储瑞嵩, 吕炜锋, 吴梧桐. L-天冬氨酸- β -脱羧酶高活力菌株的培养[J]. 药物生物技术, 1994, 1(1): 14-17.
- [14] 周丽, 邓璨, 崔文璟, 等. 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 L-丙氨酸[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2272-2281.
- [15] PHILLIPS R S, LIMA S, KHRISTOFOROV R, et al. Insights into the mechanism of *Pseudomonas dacunhae* aspartate β -decarboxylase from rapid-scanning stopped-flow kinetics [J]. Biochemistry, 2010, 49(24): 5066-5073.
- [16] 汪芳. *Pseudomonas dacunhae* L-天冬氨酸- β -脱羧酶的耐酸性分子改造及催化合成 L-丙氨酸研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018: 17-33.
- [17] 于佳印, 赵庭, 刘中美, 等. 不动杆菌来源 L-天冬氨酸- β -脱羧酶的表达与酶学性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(12): 8-13.
- [18] WANG N C, LEE C Y. Molecular cloning of the aspartate 4-decarboxylase gene from *Pseudomonas* sp. ATCC19121 and characterization of the bifunctional recombinant enzyme[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(3): 339-348.
- [19] NISHIMURA J S, MANNING J M, MEISTER A. Studies on the mechanism of activation of aspartic acid β -decarboxylase by α -Ketocarboxylic acids and pyridoxal 5'-phosphate [J]. Biochemistry, 2002, 1(3): 442-447.
- [20] CHEN C C, CHOU T L, LEE C Y. Cloning, expression and characterization of L-aspartate β -decarboxylase gene from *Alcaligenes faecalis* CCRC11585[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(3): 132-140.
- [21] LEE D G, SONG T Y, KIM N Y, et al. Cloning, purification and characterization of novel L-Aspartate β -decarboxylase from *Enterococcus faecalis* [J]. Journal of Life Science, 2006, 16(1): 44-48.
- [22] CRAWFORD L V. Studies on the aspartic decarboxylase of *Nocardia globetula* [J]. Biochemical Journal, 1958, 68(2): 221-225.

加工编辑:王艳

收稿日期:2020-06-03