

• 生物育种与工艺优化 •

毕赤酵母 Gpn12 异戊烯基转移酶 NovQ 催化合成 MK-3

吴锡华^{1,2}, 李哲敏¹, 刘会¹, 王鹏¹, 王丽¹, 方雪^{1,2}, 孙小雯^{1,2}, 倪文枫^{1,2}, 杨强^{1,2}, 郑之明¹, 赵根海¹

1 中国科学院合肥物质科学研究院 技术生物与农业工程研究所 强磁场与离子束物理生物学重点实验室, 安徽 合肥 230031

2 中国科学技术大学 研究生院, 安徽 合肥 230027

吴锡华, 李哲敏, 刘会, 等. 毕赤酵母 Gpn12 异戊烯基转移酶 NovQ 催化合成 MK-3. 生物工程学报, 2018, 34(1): 140–148.
Wu XH, Li ZM, Liu H, et al. Synthesis of vitamin K₂ by isopentenyl transferase NovA in *Pichia pastoris* Gpn12. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 140–148.

摘 要: 对异戊烯基转移酶 NovQ 在毕赤酵母 Gpn12 异源表达过程中诱导剂甲醇添加量进行了探究, 并以毕赤酵母 Gpn12 全细胞为酶源, 以甲萘醌、异戊烯醇为前体, 催化合成维生素 K₂ (MK-3)。每 24 h 添加 2% 甲醇时, NovQ 表达量提高约 36%。考察摇瓶中初始 pH、温度、甲醇添加量、前体 (甲萘醌、异戊烯醇) 添加量、催化时间、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 添加量等 7 个因素对 Gpn12 全细胞催化合成 MK-3 的影响, 发现催化温度、甲萘醌添加量、催化时间影响显著, 对 3 个显著因素进行响应面优化得出催化条件为: 催化温度 31.56 °C, 甲萘醌添加量 295.54 mg/L, 催化时间 15.87 h, 优化后的摇瓶 MK-3 产量达到 98.47 mg/L, 与响应面预测结果一致, 较优化前对照组提高了 35%。在 30 L 发酵罐进行生物催化实验, 催化时间 24 h, 细胞催化剂浓度 220 g (干重)/L, MK-3 产量达到 189.67 mg/L。该方法为 Gpn12 规模化生产 MK-3 奠定了一定的基础。

关键词: MK-3, 毕赤酵母, 全细胞催化, 优化

Received: April 13, 2017; **Accepted:** May 31, 2017

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021704), Anhui Provincial Natural Science Foundation (Nos. 1308085MA07, 1608085QC46), Research and Demonstration of Key Technology of High Value Bio-based Chemicals (STS Project) (No. KFJ-SW-ST-164).

Corresponding authors: Zhiming Zheng. Tel: +86-551-65593148; E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn

Genhai Zhao. Tel: +86-551-65593145; E-mail: zhgh327@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021704), 安徽省自然科学基金 (Nos. 1308085MA07, 1608085QC46), 中国科学院科技服务网络计划 (STS 项目) “高值生物基化学品关键技术研发及示范 (No. KFJ-SW-ST-164)”资助。

Synthesis of vitamin K₂ by isopentenyl transferase NovA in *Pichia pastoris* Gpn12

Xihua Wu^{1,2}, Zhemin Li¹, Hui Liu¹, Peng Wang¹, Li Wang¹, Xue Fang^{1,2}, Xiaowen Sun^{1,2}, Wenfeng Ni^{1,2}, Qiang Yang^{1,2}, Zhiming Zheng¹, and Genhai Zhao¹

¹ Key Laboratory of High Magnetic Field and Ion Beam Physics Biology, Institute of Technical Biology & Agricultural Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China

² Graduate School, University of Science & Technology China, Hefei 230027, Anhui, China

Abstract: The effect of methanol addition on the heterologous expression of isoprenyl transferase NovQ was studied in *Pichia pastoris* Gpn12, with menadione and isopentenol as precursors to catalyze vitamin K₂ (MK-3) synthesis. The expression of NovQ increased by 36% when 2% methanol was added every 24 h. The influence of initial pH, temperature, methanol addition, precursors (menadione, isopentenol) addition, catalytic time and cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) addition were explored in the *P. pastoris* whole-cell catalytic synthesis process of MK-3 in shaking flask. Three significant factors were then studied by response surface method. The optimal catalytic conditions obtained were as follows: catalytic temperature 31.56 °C, menadione 295.54 mg/L, catalytic time 15.87 h. Consistent with the response surface prediction results, the optimized yield of MK-3 reached 98.47 mg/L in shaking flask, 35% higher than that of the control group. On this basis, the production in a 30-L fermenter reached 189.67 mg/L when the cell catalyst of 220 g/L (dry weight) was used to catalyze the synthesis for 24 h. This method laid the foundation for the large-scale production of MK-3 by *P. pastoris* Gpn12.

Keywords: vitamin K₂, *Pichia pastoris*, whole-cell catalysis, optimization

维生素 K(Vitamin K, VK) 是一族含有共同化学结构 2-甲基-1,4-萘醌环的物质统称。根据萘醌环 3' 位置连接侧链化学结构的不同又分为不同的类别。天然存在的维生素 K 包括 K₁ (Phylloquinone, PK) 和 K₂ (Menaquinone, MK), 后又人工合成了 K₃ 等。在动物体内, 维生素 K₁ 和维生素 K₃ 只有转化为维生素 K₂ 才具有生物活性^[1-2]。图 1 显示了维生素 K₁、K₂ 及 K₃ 的化学结构。维生素 K₂ 依据侧链异戊烯单元个数 n 的不同^[3-5], 可分为 14 种, 通常以 MK- n 表示, 例如, n 为 3 时称之为 MK-3。

维生素 K₂ 传统生理功能主要体现在促进凝

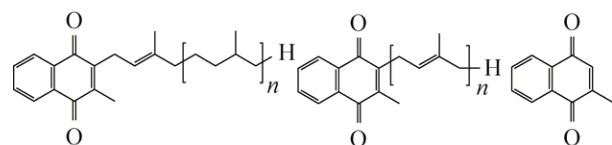


图 1 维生素 K₁、K₂ 和 K₃ (从左到右) 的化学结构式
Fig. 1 Chemical structures of vitamin K₁, K₂ and K₃ (from left to right).

血酶原的产生和增加骨钙素的合成^[6-7]。新近发现维生素 K₂ 在降低肝硬化转化为肝癌的风险等方面, 也有明显作用^[8]。维生素 K₂ 可以采用化学合成法和微生物发酵法制备, 化学法存在高能耗、高污染、副产物多和生物活性低等问题。而微生物法制备维生素 K₂ 条件温和、污染少、能耗低, 产品本身来源于生物, 具有高生物活性和高生物相容性。

目前报道生产维生素 K₂ 的菌株主要有黄杆菌 (*Flavobacterium* sp., 产 MK-4)^[9-12] 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis natto*, 产 MK-7)^[13-17]。维生素 K₂ 在生物合成时, 关键的萘醌母环异戊烯基化是由异戊烯基转移酶催化完成的。novQ 基因来源于球状链霉菌 *Streptomyces* sp. 和雪白链霉菌 *Streptomyces niveus*, 其产物 NovQ 是一种异戊烯基转移酶, 主要参与合成新生霉素的环 A 结构。NovQ 底物专一性不强, 能催化多种萘醌、氢醌、酚类等化合物的异戊烯基化反应^[18-19]。

巴斯德毕赤酵母作为一种成熟高效的基因工

程蛋白表达系统,具有操作简单、培养方便、生长速度快、蛋白表达量高、成本低廉的优点^[20-21]。作者实验室开展了采用毕赤酵母合成 MK-3 的研究工作^[22]。以来源于雪白链霉菌的 *novQ* 基因利用 pPIC9 载体在 GS115 毕赤酵母中实现了异源表达和优化,并证实了其能使毕赤酵母合成维生素 K₂,主要是 MK-3;虽然使用的是分泌型载体,然而在实验中发现重组毕赤酵母 Gpn12 在胞内产 MK-3 具有较大潜力,本研究在此基础上确定重组毕赤酵母全细胞催化合成 MK-3 的关键因素,优化催化条件,为该菌的进一步扩大生产提供一定的借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

重组巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* Gpn12 由本实验室保存^[22]。

1.1.2 主要试剂

维生素 K₂(MK-4)标品购自 Sigma 公司;甲萘醌、异戊烯醇等为国产分析纯试剂;色谱级甲醇和二氯甲烷购自上海生工。蛋白提取缓冲液:NaCl 0.5 mol/L,氨基丁三醇 0.2 mol/L, pH 7.4。无硫酸铵酵母无氨基酸氮源(YNB)10×母液:用蒸馏水配成 3.4%溶液,0.22 μm 滤膜过滤除菌后现用。生物素 500×母液:蒸馏水配成 0.02%溶液,0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。显影剂:0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5),0.2 mmol/L 对羟基苯丙烯酸,1.25 mmol/L 3-氨基苯二甲酰肼,需要时现加 0.024%过氧化氢。

1.1.3 培养基

MGY 培养基:甘油 1%,硫酸铵 1%,YNB 0.34%,生物素 0.000 04%;BMMY 培养基:酵母粉 1%,YNB 0.34%,生物素 4×10⁻⁵%,蛋白胨 1%,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0),甲醇 0.5%–3%,硫酸铵 1%;MD 固体培养基:YNB 0.34%,硫酸

铵 1%,生物素 0.000 04%,葡萄糖 2%,琼脂 2%;BMY 培养基:酵母粉 1%,蛋白胨 2%,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0),YNB 0.34%,硫酸铵 1%,生物素 0.000 04%;高密度发酵培养基:酵母粉 1%,蛋白胨 2%,甘油 4%,0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0),YNB 0.34%,硫酸铵 1%,生物素 0.000 04%。

1.1.4 主要仪器设备

G154TW 高压蒸汽灭菌锅,致微仪器有限公司;BSA124S 万分天平,赛多利斯公司;数显 PHS-25 型 pH 计,上海雷磁仪器厂;J2-HS 冷冻离心机,贝克曼库尔特公司;HZ200L 恒温摇床,瑞华仪器设备有限公司;Essential LC-6 高效液相色谱仪,岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 重组毕赤酵母 Gpn12 摇瓶培养

活化:28℃下在 MD 固体培养基上划线,静置培养至生长出明显菌落。挑取单菌落接种到含 MGY 培养基的三角瓶(25 mL/250 mL)中,28℃、200 r/min 培养 36 h。

诱导:按 10%接种量,接种到含 MGY 培养基的三角瓶中,28℃、200 r/min 培养 36 h 后,1 800 r/min 离心 5 min 后,弃上清,用同体积 BMMY 重悬,同样条件培养至发酵结束。

1.2.2 甲醇诱导对重组毕赤酵母 Gpn12 NovQ 表达优化

前期探究了初始 pH、诱导温度和诱导时间对表达优化的影响^[25]。其对照组条件为 pH 6.0、28℃、72 h、3%甲醇,本文在此条件下,继续考察甲醇添加量(0.5%–3.0%)对 NovQ 表达的影响。并将最优甲醇添加量结果用于前期研究获得的优化后条件(pH 8.0、25℃、96 h、3%甲醇)。NovQ 蛋白半定量以 NovQ 表达最高的条件为 100%,并设定为对照组。

1.2.3 30 L 细胞催化剂制备

见前期研究文献[22]。

1.2.4 NovQ 异戊烯基转移酶半定量

毕赤酵母采用冷冻研磨法破碎^[23]:取酵母培养物 5 mL 离心去除上清,用生理盐水洗涤 3 次,加入 3 mL 蛋白提取缓冲液于-20 °C 预冻 1 h 后,转至预冻过的研钵中,加入 3 g 石英砂研磨 10 min。

蛋白提取:转移酵母匀浆至 25 mL 离心管中,用 2 mL 蛋白缓冲液洗涤研钵,也并入离心管中。60 °C 水浴 30 min,然后 13 000 r/min 离心 5 min,上清转移到新离心管,加入 50 μ L 去氧胆酸溶液(2%),混匀后,4 °C 放置 30 min;加入 500 μ L 饱和三氯乙酸溶液,混匀后,4 °C 静置 6 h,13 000 r/min、4 °C 离心 10 min,弃上清;沉淀加 4 °C 丙酮 5 mL 重悬洗涤,13 000 r/min、4 °C 离心 10 min,弃上清,重复 3 次;通风橱中吹干后,加入 1 mL 去离子水溶解,即得含 NovQ 异戊烯基转移酶的胞内蛋白。

蛋白检测半定量:使用蛋白印迹技术对 NovQ 进行检测, Anti-6 \times his Tag 鼠单抗为一抗, Goat Anti-Mouse IgG H&L 为二抗。根据显色强度,对目标蛋白进行半定量。

1.2.5 重组毕赤酵母 Gpn12 全细胞催化合成 MK-3 条件单因素优化及响应面优化

全细胞催化对照组:发酵培养物 10% 装液量于 250 mL 三角瓶中,加入甲萘醌 200 mg/L、异戊烯醇 2 mL/L、甲醇 2%、表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 0.5%,在 pH 7.5、28 °C、200 r/min 条件下催化 24 h,离心收集菌体,冷冻干燥后甲醇萃取,检测 MK-3 产量。考察单因素为:1) 初始 pH 4.5–8.5,梯度为 1;2) 催化温度 20 °C、24 °C、28 °C、32 °C;3) 催化时间 0、12、24、36、48 h;4) 甲醇添加量 0、1%、2%、3%、4%;5) 甲萘醌添加量 0、50、100、200、300、400 mg/L;6) 异戊烯醇添加量 0、0.5、1、2、3、4 mL/L;7) CTAB 添加量 0、0.2%、0.5%、0.8%、1.0%;其他条件同对照组。在单因素试验基础上,根据高点附近单因素方差分析选出具有显著影响的因素($P<0.05$)进行 Box-Behnken 实验优化。

1.2.6 毕赤酵母 30 L 发酵罐催化合成 MK-3

在 30 L 发酵罐中先后考察催化时间和细胞催化剂浓度对 MK-3 产量的影响。1) 催化时间:0、12、18、24、30、36、42、48、60、72、84 h;2) 细胞催化剂浓度:100、140、180、220、260 g/L。毕赤酵母培养方法同 1.2.3。

1.2.7 MK-3 检测方法

见前期研究文献[22]。

2 结果与分析

2.1 甲醇诱导条件对 Gpn12 表达 NovQ 的影响

诱导剂对诱导型转录表达有直接影响,甲醇是重组毕赤酵母 Gpn12 的诱导剂和诱导阶段的碳源。在前期实验对照组条件下,甲醇浓度对 NovQ 异戊烯基转移酶的表达影响如图 2 所示,NovQ 表达量随着甲醇添加量的增加而增多,当甲醇添加量超过 2% 时,NovQ 表达量反而降低,高浓度甲醇可能影响了毕赤酵母的生长代谢进而抑制 NovQ 的表达。图中 3% 甲醇添加量的条件与前期实验对照组条件完全相同。

基于前期实验优化条件,NovQ 表达的差异如图 3 所示,甲醇浓度为 2% 时,NovQ 表达量提高了 36% 左右。

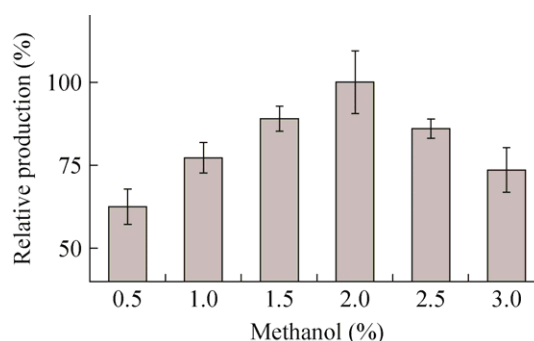


图 2 甲醇诱导剂添加量对 NovQ 异戊烯基转移酶表达的影响

Fig. 2 Effect of methanol on the expression of NovQ prenyltransferase in shake flask fermentation.

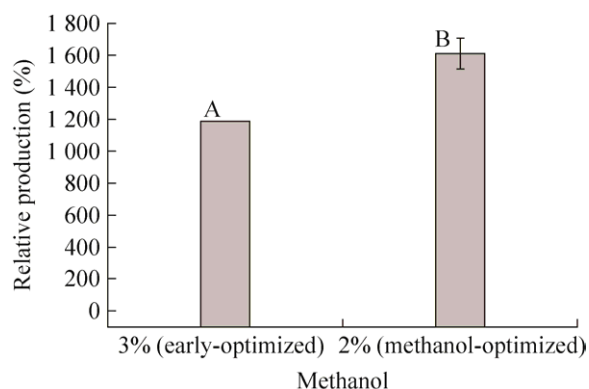


图3 不同甲醇诱导条件下 NovQ 表达结果比较 (A: 前期优化的 NovQ 表达; B: A 基础上甲醇优化后的 NovQ 表达)
Fig. 3 Comparison of NovQ expression results under different methanol-induced conditions. A: novQ expression of early optimization; B: novQ expression after methanol optimization based on A.

2.2 Gpn12 全细胞催化合成 MK-3 条件优化

2.2.1 初始 pH 对 MK-3 产量影响

在活细胞催化实验中, pH 同时影响着酶活性和细胞状态。初始 pH 对 MK-3 产量影响如图 4 所示, 在 pH 5.5–8.5 范围, 随着 pH 上升, MK-3 产量增加; 到 pH 7.5 时, MK-3 达到高点, 之后 MK-3 产量随 pH 上升反而降低。

2.2.2 催化温度对 MK-3 产量影响

温度是影响酶催化反应的重要因素之一。如图 4 所示, 催化温度 28 °C 以下时, MK-3 产量随温度升高而降低, 28 °C 时 MK-3 产量仅为 75 mg/L 左右。随着催化温度升高至 32 °C, MK-3 产量达到 88 mg/L 左右, 与 20 °C 催化时 MK-3 产量大致相当。在 BRENDA 酶数据库中查到, NovQ 异戊烯基转移酶 (EC 2.5.1.111) 最适温度是 30 °C。结合实验结果, 选定了与 NovQ 最适温度较为接近且 MK-3 产量较高的 32 °C 作为下一步探索条件。

2.2.3 催化时间对 MK-3 产量影响

活细胞催化时间对 MK-3 产量的影响如图 4 所示, MK-3 产量在催化进行 12 h 达到高点, 之后无明显上升。时间过长时, 细胞活力降低, 合成速

率低于分解速率, 导致 MK-3 产量下降。36、48 h 数据波动可能与液体蒸发有一定关系。

2.2.4 甲醇添加量对 MK-3 产量影响

如图 5 所示, 甲醇添加量在 2% 以下时, MK-3 产量呈微小上升趋势, 而后随着甲醇添加量上升, MK-3 产量略微下降。维生素 K₂ 类化合物生物合

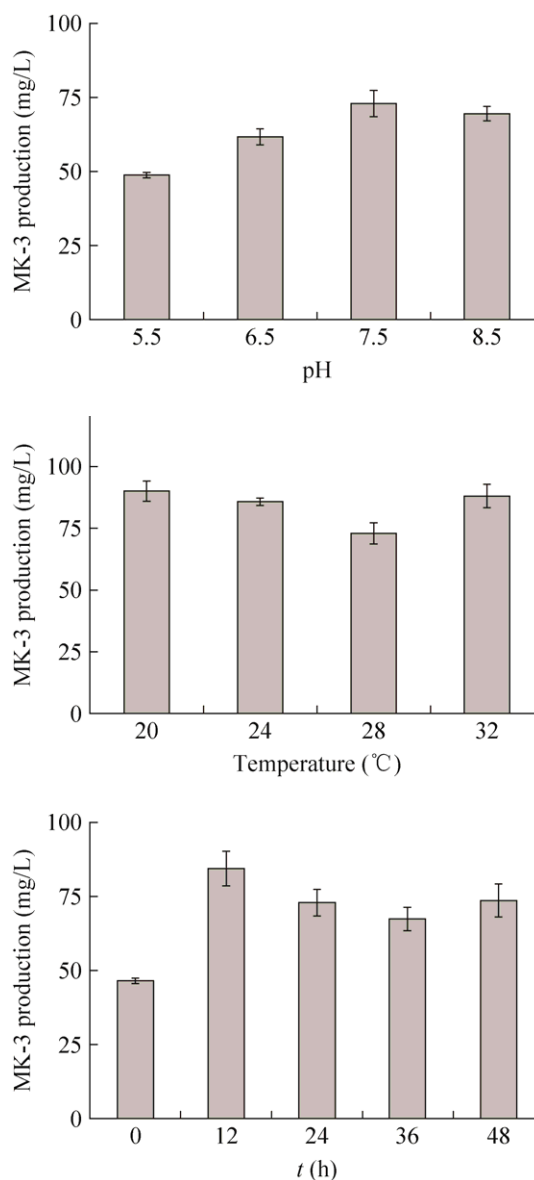


图4 初始 pH、催化温度和时间对 MK-3 产量的影响
Fig. 4 Effect of initial pH, catalytic temperature and time on MK-3 production.

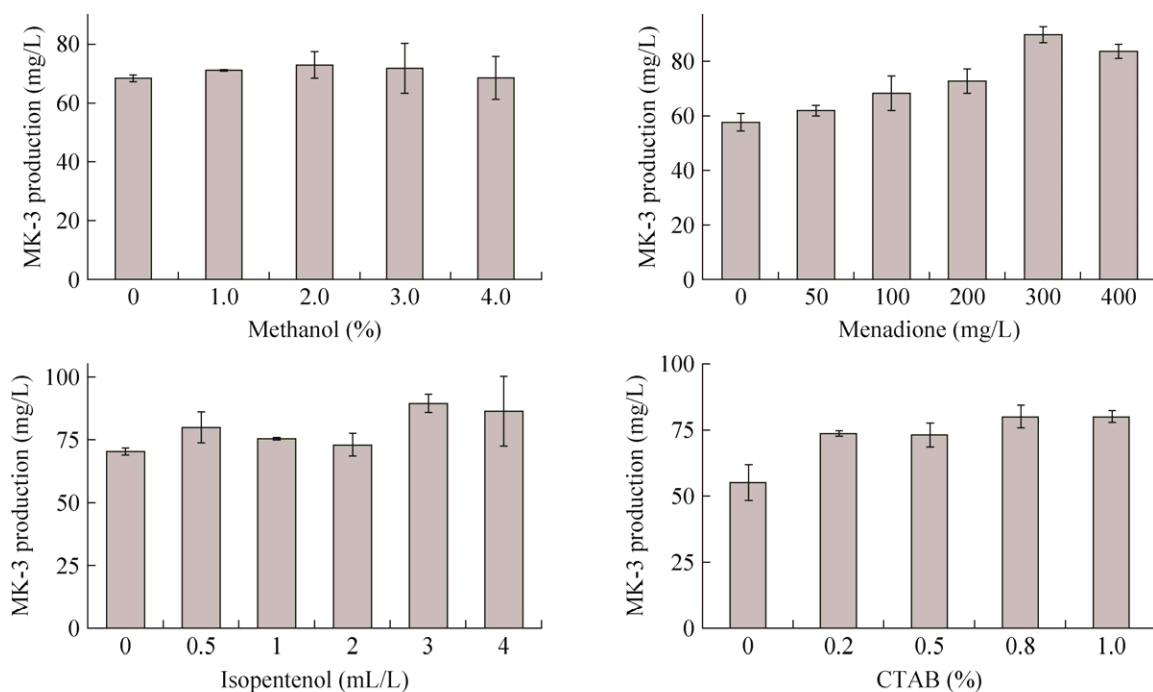


图5 甲醇、甲萘醌、异戊烯醇和 CTAB 对 MK-3 产量的影响

Fig. 5 Effect of methanol, menadione, isopentenol and CTAB on MK-3 production.

成中异戊烯基焦磷酸合成需要能量,甲醇是催化过程中毕赤酵母的碳源和诱导剂,但其添加量对于 MK-3 产量的影响不明显。

2.2.5 甲萘醌对 MK-3 产量的影响

重组毕赤酵母 Gpn12 通过芳香族异戊烯基转移酶 NovQ 催化萘醌环异戊烯基化。维生素 K₂ 类化合物前体甲萘醌对 MK-3 产量的影响如图 5 所示, MK-3 产量随着甲萘醌添加量上升基本呈现上升趋势,当甲萘醌添加量达 300 mg/L 时达到高点,随后呈下降趋势。

2.2.6 异戊烯醇对 MK-3 产量的影响

Gpn12 能自身通过复杂不明确的过程转化异戊烯醇合成寡聚异戊二烯^[24],作为 MK-*n* (*n*<4) 的 R 基侧链。异戊烯醇对 MK-3 的影响如图 5 所示,在其添加量达到 3 mL/L 时, MK-3 产量达到高点。

2.2.7 CTAB 对 MK-3 产量的影响

表面活性剂 CTAB 对 MK-3 产量影响如图 5 所

示,随着 CTAB 添加量增加, MK-3 产量上升,在 CTAB 达到 0.8% 后不再增加。可能原因是在 CTAB 达到临界胶束浓度之前,在水中呈单分子状态,不形成胶团,浓度上升可加大对细胞膜磷脂分子层的破坏,提高细胞膜的通透性,使前体进入细胞中,促进 MK-3 的合成,而随着浓度达到临界胶束浓度,继续增加浓度只会形成胶团,憎水基团隐藏在胶团内核,不具备继续增加细胞膜通透性的作用。

2.2.8 响应面优化

在单因素结果高点附近进行单因素方差分析,发现温度、甲萘醌添加量、催化时间具有显著影响 ($P < 0.05$),对这 3 个显著因素继续进行响应面分析。表 1 所示为响应面设计实验因素水平和编码。

根据 Design-Expert 进行 Box-Behnken 设计,以 MK-3 产量为响应值,温度(A)、甲萘醌添加量(B)、催化时间(C)为自变量,进行三因素三水平实验。实验设计及结果如表 2 所示。

表 1 响应面设计实验因素水平及编码

Table 1 Experimental level and coding of response surface design

Factor	Level		
	-1	0	1
A (°C)	30	32	34
B (h)	6	12	18
C (mg/L)	250	300	350

表 2 响应面设计及 MK-3 产量

Table 2 Response surface design and MK-3 production

Trail	A	B	C	Yield (mg/L)
1	-1	-1	0	86.04
2	0	-1	-1	83.15
3	0	-1	1	93.55
4	1	-1	0	80.18
5	-1	0	1	89.92
6	-1	0	-1	81.29
7	0	0	0	93.82
8	0	0	0	94.85
9	0	0	0	94.87
10	0	0	0	95.84
11	0	0	0	92.08
12	1	0	1	82.81
13	1	0	-1	72.51
14	-1	1	0	87.21
15	0	1	1	91.52
16	0	1	-1	79.57
17	1	1	0	74.96

得到回归方程为：

$$Y=94.29-4.25A-1.21B+5.16C-1.60AB+0.42AC+0.39BC-8.75A^2-3.44B^2-3.90C^2, R^2=0.9878.$$

由表 3 方差分析结果可知,模型拟合程度极显著($P<0.001$), $R^2=0.9878$,表明模型与实际拟合良好; $\text{Adj-}R^2=97.22\%$,表明模型对 MK-3 产量变化可以很好解释;失拟不显著($P=0.7678$),表明模型不需要添加项,与实验拟合较好。

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

Source	MS	F-value	P value	
Model	95.17	63.21	<0.0001	Significant
A	144.50	95.97	<0.0001	
B	11.66	7.75	0.0272	
C	213.00	141.47	<0.0001	
AB	10.21	6.78	0.0352	
AC	0.70	0.46	0.5181	
BC	0.60	0.40	0.5477	
A ²	322.72	214.33	<0.0001	
B ²	49.82	33.09	0.0007	
C ²	64.20	42.64	0.0003	
Lack of Fit	0.79	0.39	0.7678	Not significant

用 Design-Expert 预测 MK-3 在三因素-1 到 1 水平内最大值为 96.475 mg/L。对应温度为 31.6 °C, 甲萘醌添加量为 295.59 mg/L,催化时间为 15.87 h。三个平行实验验证 MK-3 产量为 98.29、99.39、97.73 mg/L, 平均产量为 98.47 mg/L, 与 MK-3 最大预估值相对误差为 2.07%。

2.3 毕赤酵母 30 L 发酵罐催化结果分析

2.3.1 催化时间对 MK-3 产量的影响

毕赤酵母于发酵罐中培养诱导之后,在搅拌速率 500 r/min、pH 7.5、温度 31.6 °C、甲醇 2%、CTAB 0.8%、异戊烯醇 3 mL/L、甲萘醌 295.6 mg/L 催化条件下,催化时间对 MK-3 的影响如图 6 所示。催化开始, MK-3 含量迅速增加,在 24 h 达到高点,之后呈下降趋势。在相同时间内,发酵罐中产物积累快于摇瓶中积累,高点产量提高,时间延后。可能原因是在发酵罐中, pH、溶氧等条件维持稳定,细胞活力保持较长时间,利于 MK-3 合成。

2.3.2 细胞催化剂浓度对 MK-3 产量的影响

催化时间 24 h、其他同 2.3.1 催化条件下,毕赤酵母细胞催化剂浓度对 MK-3 的影响如图 6 所示。随着细胞催化剂浓度升高, MK-3 产量呈上

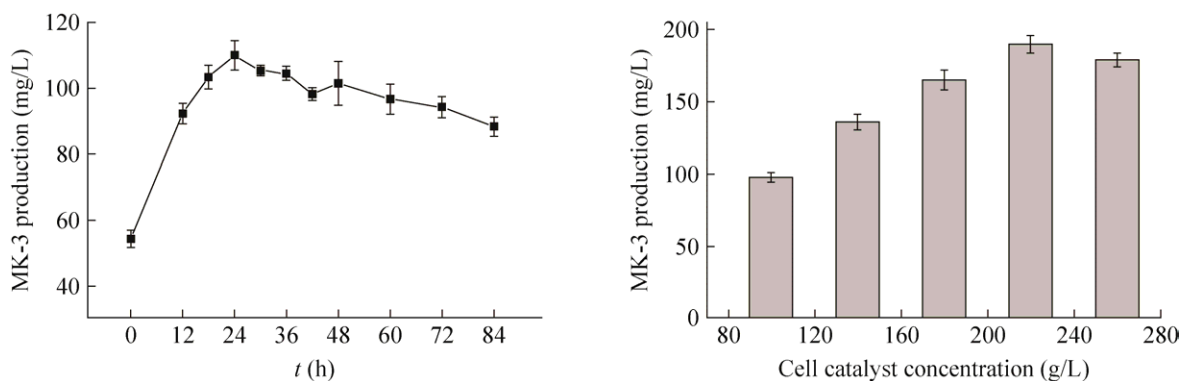


图6 催化时间和细胞催化剂浓度对发酵罐中 MK-3 产量的影响

Fig. 6 Effect of catalytic time and cell catalyst concentration on MK-3 production in fermenter.

升趋势,在细胞催化剂浓度 220 g/L 时达到高点 189.67 mg/L,随后不再继续升高。可能原因是细胞催化剂在一定范围内浓度升高有利于 MK-3 的合成,但是浓度过高会使细胞生存环境恶化,不利于细胞活力的维持。

3 结论

重组毕赤酵母 Gpn12 能异源表达异戊烯基转移酶基因 *novQ*,并催化 MK-3 的合成。在 NovQ 表达上,本研究对甲醇添加量进行探究,发现在 2%甲醇添加量时,NovQ 表达比之前的研究提高了 36%左右。在 MK-3 合成条件优化方面,在摇瓶中探究了催化时间、催化温度和甲醇添加量等 7 个因素对 MK-3 产量的影响,并对单因素方差分析筛选出的初始 pH、催化温度和甲萘醌添加量 3 个因素进行了响应面优化,最终优化后条件为初始 pH 7.5、催化温度 31.6 °C、甲醇添加量 2%、甲萘醌 295.59 mg/L、异戊烯醇 3 mL/L、催化时间 15.87 h 和 CTAB 0.8%,此时 MK-3 产量达到 98.47 mg/L,比优化前提高了 35%;30 L 发酵罐中催化合成 MK-3,发现在细胞催化剂初始浓度 220 g/L 和催化时间 24 h 时,MK-3 产量达到 189.67 mg/L,比前期研究结果提高了 1 倍以上,表明高浓度细胞催化明显提高产量,有利于提高设备利用,提升生产

强度。鉴于目前毕赤酵母表达和发酵的成熟工艺,本研究可显著推进异戊烯基转移酶 NovQ 产业化生产及应用进程。

REFERENCES

- [1] Dam H. The antihæmorrhagic vitamin of the chick: occurrence and chemical nature. *Nature*, 1935, 135(3417): 652–653.
- [2] Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P. Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. *Planta*, 1996, 198(3): 385–396.
- [3] Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev*, 1982, 46(3): 241–280.
- [4] Collins MD. Isoprenoid quinines//Goodfellow M, O'Donnell AG. *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. New York: John Wiley & Sons, 1994: 265–309.
- [5] Collins MD, Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev*, 1981, 45(2): 316–354.
- [6] Lei Z, Fu ZQ, Mu XY, et al. Vitamin K₂ — a new drug of osteoporosis prevention and treatment. *Chin J Osteoporos*, 2010, 16(1): 60–63 (in Chinese).
雷泽,付正启,木晓云,等.维生素 K₂——新型骨质疏松防治药物. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(1): 60–63.

- [7] Schapira D, Linn S, Sarid M, et al. Calcium and vitamin D enriched diets increase and preserve vertebral mineral content in aging laboratory rats. *Bone*, 1995, 16(5): 575–582.
- [8] Habu D, Shiomi S, Tamori A, et al. Role of vitamin K₂ in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA*, 2004, 292(3): 358–361.
- [9] Taguchi H, Kita S, Tani Y. Enzymatic alteration in the shikimate pathway during derivation of menaquinone-4- producing mutants of *Flavobacterium* sp. 238-7. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(3): 769–773.
- [10] 田口 久貴, 谷 吉樹. ビタミン K の菌体外生産. バイオサイエンスとインダストリー, 1991, 49(5): 510–512 (in Japanese).
- [11] Tan M, Liu H, Li ZM, et al. Optimization medium composition for vitamin K₂ by *Flavobacterium* sp. using response surface methodology and addition of *Arachis hypogaea*. *Braz Arch Biol Technol*, 2016, 59: e16150343.
- [12] Taguchi H, Shibata T, Tani Y. Selective release of menaquinone-4 from cells of a mutant of *Flavobacterium* sp. 238-7 with a detergent. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(6): 1137–1138.
- [13] Mahanama R, Berenjian A, Valtchev P. Enhanced production of menaquinone 7 via solid substrate fermentation from *Bacillus subtilis*. *Int J Food Eng*, 2011, 7(5), doi: 10.2202/1556-3758.2314.
- [14] Mahanama R, Berenjian A, Regtop H, et al. Modeling menaquinone 7 production in tray type solid state fermenter. *Anziam J*, 2012, 53: C354–C372.
- [15] Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, et al. Advances in menaquinone-7 production by *Bacillus subtilis natto*: fed-batch glycerol addition. *Am J Biochem Biotechnol*, 2012, 8(2): 105–110.
- [16] Song JY, Liu HX, Wang L, et al. Enhanced production of vitamin K₂ from *Bacillus subtilis (natto)* by mutation and optimization of the fermentation medium. *Braz Arch Biol Technol*, 2014, 57(4): 606–612.
- [17] Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(3): 1347–1357.
- [18] Ozaki T, Mishima S, Nishiyama M, et al. NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J Antibiot*, 2009, 62(7): 385–392.
- [19] Winkelblech J, Fan AL, Li SM. Prenyltransferases as key enzymes in primary and secondary metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(18): 7379–7397.
- [20] Zhu TC, Li Y. Recent development of *Pichia pastoris* system: current status and future perspective. *Chin J Biotech*, 2015, 31(6): 929–938 (in Chinese). 朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势. *生物工程学报*, 2015, 31(6): 929–938.
- [21] Li SY, Zhao GP, Wang J. Enabling technologies in synthetic biology—DNA synthesis, assembly and editing. *Chin J Biotech*, 2017, 33(3): 343–360 (in Chinese). 李诗渊, 赵国屏, 王金. 合成生物学技术的研究进展——DNA 合成、组装与基因组编辑. *生物工程学报*, 2017, 33(3): 343–360.
- [22] Li ZM, Zhao GH, Liu H, et al. Biotransformation of menadione to its prenylated derivative MK-3 using recombinant *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(7): 973–985.
- [23] Kong MH, Cao ZW, Xu F. A simple and efficient method to break yeast cell by dry-frozen grinding. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(29): 16124–16126 (in Chinese). 孔明惠, 曹佐武, 徐放. 一种高效干冻研磨破碎酵母细胞的方法. *安徽农业科学*, 2010, 38(29): 16124–16126.
- [24] Henry LK, Gutensohn M, Thomas ST, et al. Orthologs of the archaeal isopentenyl phosphate kinase regulate terpenoid production in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(32): 10050–10055.
- [25] Li WN, Shang ZF, Duan ZG, et al. Production of gastric-mucosa protective collagen III by *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2017, 33(4): 672–682 (in Chinese). 李伟娜, 尚子方, 段志广, 等. 毕赤酵母高密度发酵产Ⅲ型类人胶原蛋白及其胃粘膜修复功能. *生物工程学报*, 2017, 33(4): 672–682.

(本文责编 郝丽芳)