

文章编号: 1001-3555(2021)04-0328-07

类产碱假单胞菌 XW-40 发酵 - 生物转化级联产生 D- 脯氨酸

张凡凡¹, 夏仕文^{1*}, 谢永芳¹, 刘 姣¹, 林 晖²

(1. 重庆邮电大学 生物信息学院, 大数据生物智能重庆市重点实验室, 重庆 400065;

2. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 建立了一个新颖的用于产生 D- 脯氨酸的发酵 - 生物转化过程。发酵过程中, 以 DL- 脯氨酸为发酵前体, 类产碱假单胞菌 XW-40 利用 L- 对映体诱导产生脯氨酸脱氢酶, D- 对映体完全保留。在最优条件下, 发酵阶段产生 6 g/L D- 脯氨酸。生物转化过程中, 细胞不经分离, 发酵液直接作为反应介质。采用分批补料策略实现 DL- 脯氨酸中 L- 对映体的转化。DL- 脯氨酸单批补料浓度为 10 g/L, 补料次数达到 5 批。通过发酵和生物转化的级联, 累积的 D- 脯氨酸浓度达到 31 g/L, ee>99%。推测了生物转化过程中 D- 脯氨酸产生的反应机理。

关键词: 类产碱假单胞菌 XW-40; 发酵; 生物转化; D- 脯氨酸; 脯氨酸脱氢酶

中图分类号: O643

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2021.04.003

D- 脯氨酸是抗偏头痛药物依来曲普坦(Eletriptan)的关键手性中间体。D- 脯氨酸的制备方法主要包括: 1) 化学不对称转换法。该法以 L- 脯氨酸为原料, 正丁醛为催化剂, 正丁酸为溶剂, 与 L- 酒石酸反应制备 D- 脯氨酸·L- 酒石酸盐, 然后在甲醇中用氨水处理得到 D- 脯氨酸^[1]。该法是目前 D- 脯氨酸的工业生产方法, 但存在生产成本低, 环境污染大的缺点; 2) 生物法。Bernegger-Egli 等以 L- 精氨酸为原料通过重氮化合成 L-2- 氯精氨酸, 利用 *Pseudomonas aeruginosa* 自动突变体中的 L-2- 氯脒基水解酶将 L-2- 氯精氨酸水解为 (S)-2- 氯鸟氨酸, 然后自动反转、关环为 D- 脯氨酸^[2]。该法的总收率为 13%, ee>98%。日本协和发酵采用生物降解法制备 D- 脯氨酸。利用假丝酵母 PRD-234 菌株同化 L- 脯氨酸, 发酵液中 D- 脯氨酸浓度达到 50 g/L, ee 99.5%, 收率 47%^[3]。

脯氨酸脱氢酶是一种黄素酶, 广泛存在于人体、植物和微生物中^[4]。脯氨酸脱氢酶在 L- 脯氨酸的代谢途径中, 以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅酶催化 L- 脯氨酸脱氢为 Δ^1 - 吡咯啉-5- 羧酸(P5C)。目前对微生物脯氨酸脱氢酶的研究主要侧重于酶的分离纯化、结构表征和功能研究^[5-11], 脯氨酸脱氢酶的生物技术应用局限于构建生物传感器^[12-13]和生物燃料电池^[14], 用于 D- 脯氨酸的制备尚未见报道。

我们以 DL- 脯氨酸为发酵前体, 类产碱假单胞菌 XW-40 在发酵过程中利用其中的 L- 脯氨酸诱导产生胞内脯氨酸脱氢酶, D- 脯氨酸完全保留。发酵产生的细胞不经分离, 发酵液直接作为生物转化反应介质。生物转化阶段, 采用分批补料策略, 利用细胞中的脯氨酸脱氢酶催化 DL- 脯氨酸中的 L- 对映体转化。通过发酵和生物转化的级联实现 D- 脯氨酸的高效产生。

1 实验部分

1.1 实验材料

类产碱假单胞菌 XW-40 系本实验室从土壤中筛选, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC NO:M2015521。D- 脯氨酸、L- 脯氨酸、DL- 脯氨酸为南京红杉生物科技有限公司馈赠, 乙酰葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, 其余试剂均为市售分析纯或化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基 培养基 1(g/L): 蛋白胨 5, 酵母膏 5, 氯化钠 1, pH 6.5; 培养基 2(g/L): 蛋白胨 3, 酵母膏 3, 氯化钠 5, 牛肉膏 1, DL- 脯氨酸 20, pH 7。培养基 3(g/L): 蛋白胨 3, 酵母膏 3, 氯化钠 5, 牛肉膏 1, L- 脯氨酸 10, pH 7。

收稿日期: 2021-05-15; 修回日期: 2021-06-20。

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目(CYS20270)(Chongqing Postgraduate Research and Innovation Project(CYS20270))。

作者简介: 张凡凡(1995-), 女, 硕士研究生, 生物催化与生物转化方向(Zhang Fan-fan(1995-), female, master degree, Biocatalysis and biotransformation)。

* 通讯联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn。

1.2.2 种子培养 取斜面保存的类产碱假单胞菌 XW-40 菌种接种于 5 mL 培养基 1 中, 30 ℃、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 48 h.

1.2.3 摇瓶发酵 将培养基 1 中培养液作为种子, 按 10% 接种量接种于 50 mL 培养基 2 中, 30 ℃、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 48 h.

1.2.4 生物转化 50 mL 发酵液, 用 2 mol/L 盐酸溶液调整 pH 至 7.5, 加入 0.5 g DL-Pro, 30 ℃、180 r/min 下反应, HPLC 检测反应过程.

1.2.5 L-脯氨酸转化产物的鉴定 将培养基 1 中培养液作为种子, 按 10% 接种量接种于 100 mL 培养基 3 中, 30 ℃、180 r/min 下恒温摇床振荡培养 48 h. 将发酵液离心, 弃上清, 保留细菌细胞. 将细菌细胞悬浮于 4 mL 100 mmol/L 磷酸盐(pH 7.5)中备用. 8 mL 100 mmol/L 磷酸盐(pH 7.5)中加入 2 mL 细胞悬浮液(130 mg 干重细胞)和 0.1 g L-脯氨酸, 30 ℃、180 r/min 下反应 60 h, HPLC 检测是否反应完全. 反应液留存备用.

2,4-二硝基苯肼显色法. 取上述反应液, 离心留上清. 取 1 mL 上清液与 1 mL 1 mmol/L 2,4-二硝基苯肼混合, 37 ℃下水浴加热 20 min, 冷却至室温. 加入 5 mL 1.5 mmol/L NaOH 溶液混匀并静置 5 min, 观察颜色变化.

薄层色谱法. 取上述反应液, 离心留上清. 加入 0.5 mL 30% 高氯酸, 离心, 去除上清液中的蛋白质. 上清液中加入 0.5 mL 30% 双氧水, 混合均匀. 用 2 mol/L K_2CO_3 溶液中和至 pH 7 左右. 在硅胶板上用苯酚: 水(75:25, v/v)展开, 茚三酮溶液显色. L-谷氨酸钠溶液作对照.

1.2.6 L-谷氨酸生物转化 8 mL 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中加入 2 mL 细胞悬浮液(130 mg 干重细胞)和 0.1 g L-谷氨酸钠, 30 ℃、180 r/min 下反应 60 h, HPLC 检测.

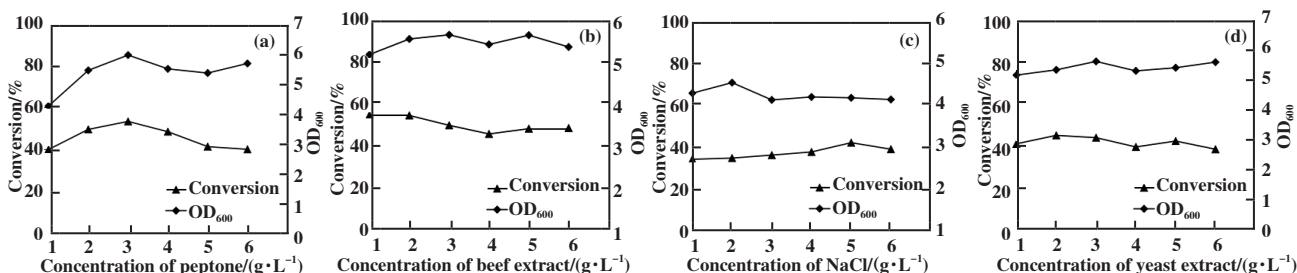


图1 培养基组分对细胞生长和转化率的影响

Fig.1 Effect of medium component on cell growth and conversion

Except for variables, other conditions are the same as the experimental section

a. peptone; b. beef extract; c. NaCl; d. yeast extract

1.2.7 分析方法 发酵液中的生物质浓度采用分光光度法在 600 nm 处测量. 1 个 OD_{600} 相当于 0.43 mg 干重细胞.

发酵和生物转化过程中 L-Pro、D-Pro 和转化产物, L-Pro 转化率采用柱前手性衍生-HPLC 分离和测定. 取 1 mL 发酵液或转化液, 12 000 r/min 离心 1 min 弃细胞. 取 100 μ L 上清液, 加入 150 μ L 水, 250 μ L 三乙胺乙腈溶液(4 g/L)和 500 μ L 乙酰葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)乙腈溶液(2 g/L), 30 ℃下衍生 30 min, 离心. 上清液采用 HPLC 法在 Alltech 高效液相色谱仪上测定. 色谱柱: Sepax MAH-C₁₈ (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 0.1% 三氟乙酸水溶液/甲醇(49/51, v/v), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 254 nm, 柱温: 25 ℃. L-Pro·GITC、D-Pro·GITC 的保留时间分别为 14.9、17.8 min. L-脯氨酸转化率 = $(1 - A_L/A_D \times 1.5) \times 100\%$, D-脯氨酸的对映体过量(ee) = $(A_D - A_L)/(A_D + A_L) \times 100\%$. 其中 A_L 、 A_D 分别为 L-Pro·GITC 和 D-Pro·GITC 的峰面积. DL-Pro 中 L-Pro·GITC 和 D-Pro·GITC 的峰面积比为 1:1.5.

2 结果与讨论

2.1 类产碱假单胞菌 XW-40 发酵

采用单因素法对类产碱假单胞菌 XW-40 的培养基组分进行优化. 考察了蛋白胨、牛肉膏、酵母膏和 NaCl 对细胞生长和 DL-脯氨酸中 L-对映体转化率的影响. 结果如图 1. 结果表明, 各个组分的最适浓度分别为: 蛋白胨 3 g/L, 牛肉膏 1 g/L, 氯化钠 5 g/L, 酵母膏 3 g/L.

2.2 培养条件优化

2.2.1 初始 pH 值和温度对细胞生长和转化率的影响 考察了培养基初始 pH 对类产碱假单胞菌 XW-

40 细胞生长和DL-脯氨酸中L-对映体转化率的影响. 由图2a可知, 当pH过高或是过低都不利于类产碱假单胞菌XW-40细胞的生长和L-脯氨酸的转化. 当初始pH值为7时, 细胞生长最好, L-脯氨酸转化率最高. 考察了培养温度对类产碱假单胞菌 XW-40

的生长以及L-脯氨酸转化率的影响(图2b). 由图2b可知, 从20℃开始, 细胞生物量和转化率随温度的升高而升高, 在30℃达到最大值; 超过30℃, 细胞生物量和转化率迅速降低. 为此选择30℃作为类产碱假单胞菌 XW-40的发酵温度.

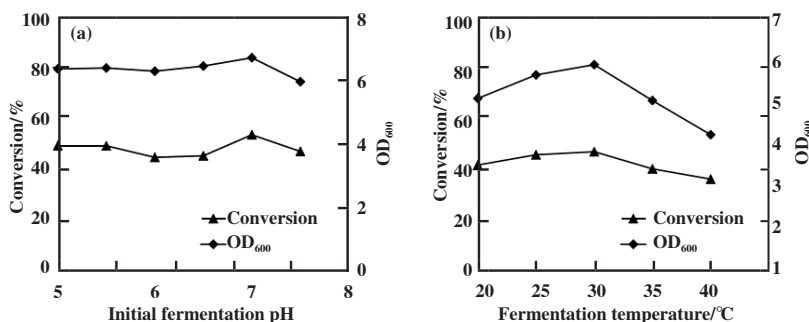


图2 初始pH和温度对转化率和细胞生长的影响

Fig.2 Effect of initial pH (a) and temperature (b) on conversion and cell growth

a. Fermentation broth(50 mL) contained 3 g/L yeast extract, 1 g/L beef extract, 3 g/L peptone, 5 g/L NaCl, 20 g/L DL-Pro. pH 5.0~7.5, 30 °C, 48 h, 180 r/min; b. Fermentation broth(50 mL) contained 3 g/L yeast extract, 1 g/L beef extract, 3 g/L peptone, 5 g/L NaCl, 20 g/L DL-Pro. pH 7.0, 20~40 °C, 48 h, 180 r/min

2.2.2 发酵时间对细胞生长和L-脯氨酸转化的影响 对菌体生长及L-脯氨酸转化曲线的测定有利于确定最佳发酵时间. 由图3可知发酵时间为48 h时, 细胞生长基本停止, 但L-脯氨酸的转化率仍在上升. 当发酵时间为72 h时, 转化率接近100%. 提示细胞在生长过程中产生胞内脯氨酸脱氢酶. 细胞停止生长后, 胞内脯氨酸脱氢酶继续催化L-脯氨酸降解.

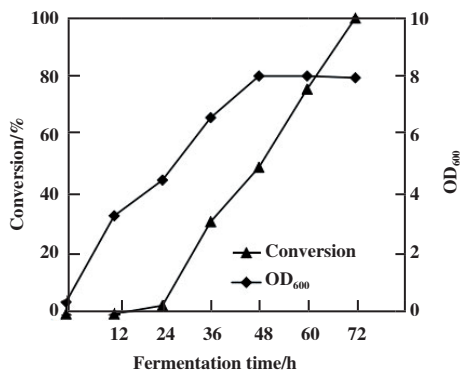


图3 发酵过程中细胞生长和DL-脯氨酸转化的时间进程

Fig.3 Time course of cell growth and conversion of

DL-Pro in fermentation

Fermentation broth(50 mL) contained 3 g/L yeast extract, 1 g/L beef extract, 3 g/L peptone, 5 g/L NaCl, 20 g/L DL-Pro. pH 7.0, 30 °C, 180 r/min

2.3 发酵和生物转化级联

2.3.1 发酵前体浓度优化 在发酵过程中, 当发酵前体DL-脯氨酸浓度小于12 g/L时, L-脯氨酸的转化率没有明显下降, 可见在此发酵前体浓度下, 细胞生长和脯氨酸脱氢酶的产生不受D-脯氨酸的抑制. 当发酵前体浓度大于12 g/L时, 细胞生长受到抑制, L-脯氨酸转化率随发酵前体浓度增大逐渐下降(图4). 为此, 选择12 g/L为发酵前体DL-脯氨酸浓度.

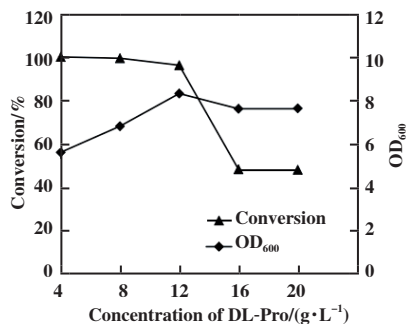


图4 DL-脯氨酸浓度对转化率和细胞生长的影响

Fig.4 Effect of DL-proline concentration on conversion and cell growth

Fermentation broth(50 mL) contained 3 g/L yeast extract, 1 g/L beef extract, 3 g/L peptone, 5 g/L NaCl, 4~20 g/L DL-Pro. pH 7.0, 30 °C, 48 h, 180 r/min

2.3.2 发酵液pH对生物转化的影响 类产碱假单

胞菌 XW-40 在发酵过程中产氨, 发酵液 pH 上升至 9.0, 该 pH 非生物转化的最适 pH. 为此, 我们考察了发酵液 pH 对生物转化的影响(图 5). 从图 5 可知, 生物转化的最适 pH 为 7.5.

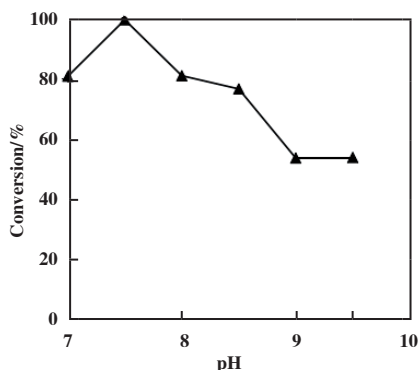


图 5 生物转化阶段 pH 对转化率的影响

Fig.5 Effect of pH on conversion in biotransformation
Fermentation broth (10 mL), pH 7.0~9.5, 10 g/L DL-Pro,
30 °C, 48 h, 180 r/min

2.3.3 分批补料产生 D-脯氨酸 为提高类产碱假单胞菌 XW-40 细胞的利用率和 D-脯氨酸的产生效率, 采用分批补料的策略产生 D-脯氨酸(图 6). 以 12 g/L DL-脯氨酸为发酵前体, 类产碱假单胞菌 XW-40 发酵 48 h 后, 调整发酵液的 pH 为 7.5, 补料 10 g/L DL-脯氨酸. 每批补料的 L-脯氨酸转化完全后, 继续补料. 分批补料 5 批, 累计加入 DL-脯氨酸 50 g/L. L-脯氨酸转化完全, 累积的 D-脯氨酸浓度达到 31 g/L, ee 大于 99%. 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞在长达

384 h 的操作时间里表现出高的脯氨酸脱氢酶活性, 有待进一步深入研究.

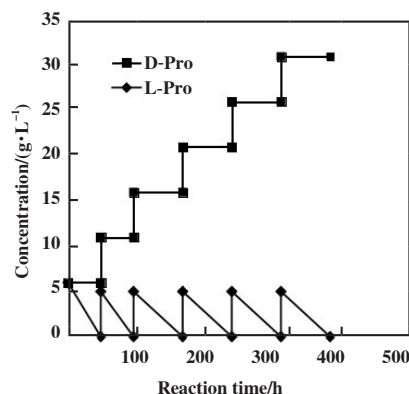


图 6 分批补料产生 D-Pro

Fig.6 Fed-batch production of D-Pro from DL-Pro in fermentation-biotransformation cascade Fermentation broth (10 mL), 12 g/L DL-Pro, pH 7.5, 30 °C, 180 r/min. 10 g/L DL-Pro was fed at the indicated time intervals

2.4 生物转化反应机理推测

采用柱前手性衍生 HPLC 对类产碱假单胞菌 XW-40 细胞催化 L-脯氨酸的转化产物和 L-4-氨基丁酸、L-谷氨酸进行了对照. 转化产物既不是 L-4-氨基丁酸, 也不是 L-谷氨酸, 证明 L-脯氨酸的转化途径中没有脯氨酸氧化酶参与.

采用 2,4-二硝基苯肼显色法对转化产物进行鉴定, 发现显色液呈红棕色, 表明 L-脯氨酸的转化产物含有醛基或酮基(图 7a). 进一步地, 转化产物

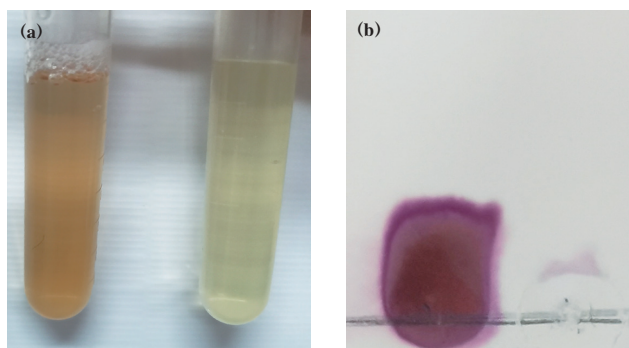


图 7 L-脯氨酸转化产物的 2,4-二硝基苯肼显色和双氧水氧化产物的薄层色谱

Fig.7 Chromogenic reaction of GSA with DNP and TLC of oxidizing product of GSA by H₂O₂
a. GSA-DNP (left), control (right); b. L-Glu(left), oxidizing product of GSA by H₂O₂ (right)

采用双氧水氧化, 经 TLC 分析, 证实其氧化产物为 L-谷氨酸(图 7b). 因此, 推断 L-脯氨酸在类产碱假单胞菌 XW-40 细胞中的脯氨酸脱氢酶(ProDH)作用下转化为 γ -谷氨酸半醛(γ -glutamic semialdehyde,

GSA).

以 L-谷氨酸为底物, 采用类产碱假单胞菌 XW-40 细胞转化时, 转化产物与 L-脯氨酸的转化产物相同, 均为 GSA, 但未观察到 L-脯氨酸的形成(图

8). 说明 L- 谷氨酸在 γ - 谷氨酸半醛合成酶(亦称为吡咯啉-5- 羧酸合成酶, P5CS)作用下转化为 GSA. 转化产物中没有 L- 脯氨酸存在, 一个可能的

原因是 ProDH 活性远高于吡咯啉-5- 羧酸还原酶 (P5CR) 活性.

类产碱假单胞菌 XW-40 细胞中存在 L- 脯氨酸

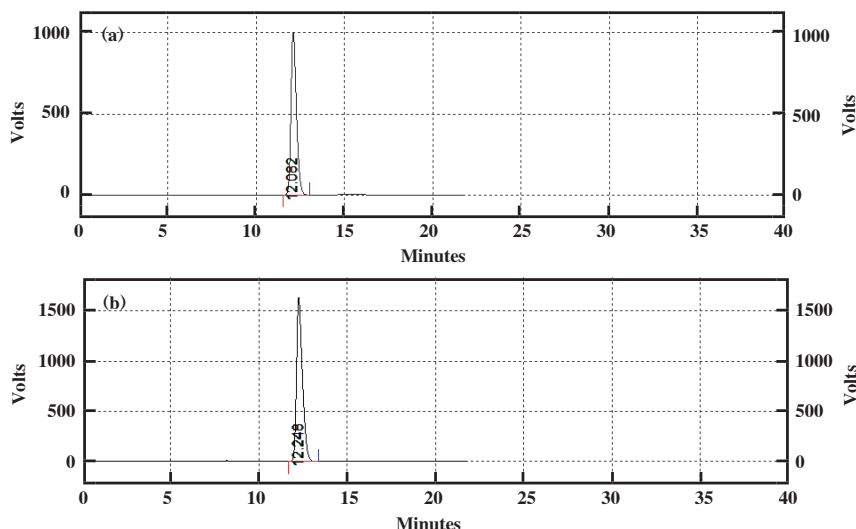
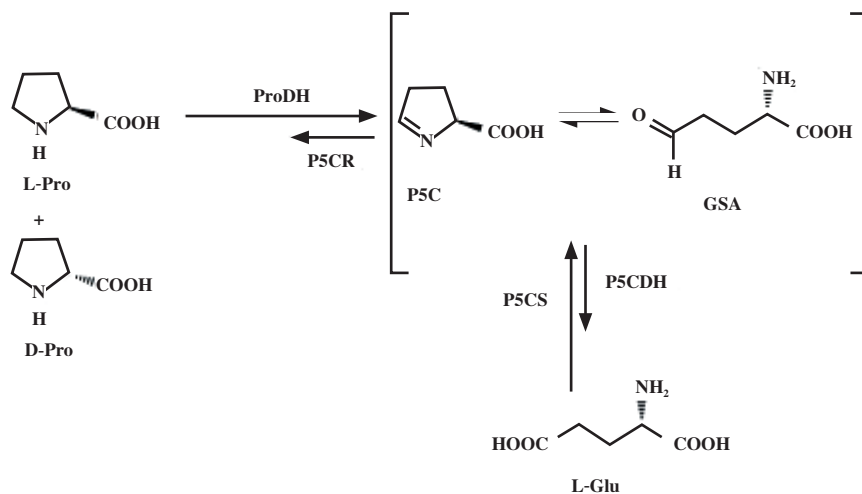


图8 L-脯氨酸(a)和L-谷氨酸(b)转化产物的HPLC图谱

Fig.8 HPLC profile of GSA from L-Pro (a) and L-Glu(b)

合成和降解酶系. L-脯氨酸在 ProDH 作用下转化为 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸(P5C), P5C 与 GSA 处于平衡中. P5C 在 P5CR 作用下还原为 L-脯氨酸. 相对于 L-脯氨酸脱氢途径, 还原途径的反应是限速步骤; P5C 在吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(P5CDH)作用下, 转化为

L-谷氨酸. L-谷氨酸在 P5CS 作用下转化为 P5C. 相对于 P5C 合成途径, 其脱氢途径的反应是限速步骤. 结合 L-脯氨酸在植物和微生物中的合成和代谢途径^[15-16], 推测其反应机理如下(Scheme 1).



图示1 类产碱假单胞菌XW-40催化DL-脯氨酸产生D-脯氨酸的反应机理推测

Scheme 1 Postulated mechanism for the production of D-proline from DL-Proline by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40

3 结论

以 DL- 脯氨酸为发酵前体, 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞在发酵过程中利用 L- 脯氨酸诱导产生胞内

脯氨酸脱氢酶, D- 脯氨酸完全保留. 类产碱假单胞菌 XW-40 发酵的最适培养基成分为: 蛋白胨 3 g/L, 牛肉膏 1 g/L, 氯化钠 5 g/L, 酵母膏 3 g/L, DL- 脯氨酸 (发酵前体) 12 g/L. 最适培养条件为: 初始 pH 7.0, 温

度 30 ℃, 发酵时间 48 h. 发酵液中的细胞不经分离, 直接用于生物转化. 生物转化阶段的最适 pH 值为 7.5, DL-脯氨酸的单批补料浓度为 10 g/L, 分批补料批次达到 5 批. 采用发酵-生物转化级联方式和转化阶段分批补料策略, D-脯氨酸累积量达到 31 g/L, ee 值大于 99%. 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞中存在同时 L-脯氨酸合成酶系和降解酶系, 其中脯氨酸脱氢酶和 P5C 合成酶占主导地位. 我们建立的方法为 D-脯氨酸的生物法工业化制备提供了一条新颖的途径.

参考文献:

- [1] a. Hong Yong-yu(洪镛裕), Liao Ben-ren(廖本仁), Liu Si-bing(刘思斌), *et al.* Facile production of D-proline by asymmetric transformation of L-proline(不对称转换法合成 D-脯氨酸) [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2001, **32**(11): 515–516.
b. Cheng Rui-chen(程瑞琛), Liu Yan-li(刘艳丽), Dai Da-zhang(戴大章). Recent progress in computer-aided design and engineering of glycosidases(计算机辅助糖苷酶分子设计与改造研究进)[J]. *J Mol Catal(China)*(分子催化), 2020, **34**(5): 475–483.
c. Zhang Can(张灿), Jiang Guo-fang(姜国芳), Yang Jiang-nan(杨江楠), *et al.* Research progress of immobilized lipase on porous materials(多孔材料固定化脂肪酶的研究进展) [J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2020, **34**(4): 378–396.
d. Liu Qing-yun(刘青云), Xin Jia-ying(辛嘉英), Sun Li-rui(孙立瑞), *et al.* Research progress of nanogold particles-enzyme biohybrid(纳米金杂化酶研究进展) [J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2020, **34**(3): 252–260.
- [2] Bernegger-Egli C, Etter K S, Studer F, *et al.* Production of D-proline from L-arginine using *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 1999, **6**(3): 359–367.
- [3] Yagasaki M, Ozaki A. Industrial biotransformations for the production of D-amino acids [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 1998, **5**(4): 1–11.
- [4] Liu L K, Becker D F, Tanner J J. Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, **632**: 142–157.
- [5] Meile L, Leisinger T. Purification and properties of the bifunctional proline dehydrogenase/l-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Eur J Biochem*, 1982, **129**: 67–75.
- [6] Kawakami R, Sakuraba H, Tsuge H, *et al.* A second novel dye-linked L-proline dehydrogenase complex is present in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3 [J]. *FEBS J*, 2005, **272**: 4044–4054.
- [7] Mohammadi H S, Omidinia E. Isolation, purification and characterization of proline dehydrogenase from a *Pseudomonas putida* POS-F84 isolate [J]. *Iran J Biotechnol*, 2012, **10**(2): 111–119.
- [8] Satomura T, Zhang X D, Hara Y. Characterization of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from an aerobic hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum caldifontis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**: 1075–1082.
- [9] Sakuraba H, Satomura T, Kawakami R, *et al.* Crystal structure of novel dye-linked L-proline dehydrogenase from *Hyperthermophilic Archaeon Aeropyrum pernix* [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(24): 20070–20080.
- [10] Sakuraba H, Takamatsu Y, Satomura T, *et al.* Purification, characterization, and application of a novel dye-linked L-proline Dehydrogenase from a Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus profundus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1470–1475.
- [11] Deutch C E. L-Proline catabolism by the high G + C Gram-positive bacterium *Paenarthrobacter aureus* strain TC1 [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, **112**: 237–251.
- [12] Hasanzadeh M, Hassanpour S, Nahar A S, *et al.* Proline dehydrogenase-entrapped mesoporous magnetic silica nanomaterial for electrochemical biosensing of L-proline in biological fluids [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2017, **105**: 64–76.
- [13] Hasanzadeh M, Nahar A S, Hassanpour S, *et al.* Immobilization of proline dehydrogenase on functionalized silica mesoporous nanomaterial towards preparation of a novel thermostable enzyme biosensor [J]. *J Nanosci Nanotech*, 2018, **18**(1): 7786–7796.
- [14] Tonooka A, Komatsu T, Tanaka S, *et al.* A L-proline/O₂ biofuel cell using L-proline dehydrogenase (LPDH) from *Aeropyrum pernix* [J]. *Mol Biol Rep*, 2018, **45**: 1821–1825.
- [15] Campbell A C, Bogner A N, Mao Y, *et al.* Structural analysis of prolines and hydroxyprolines binding to the l-glutamate- γ -semialdehyde dehydrogenase active site of bifunctional proline utilization A [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, **698**: 108727.
- [16] Xu Xiang-ming(许祥明), Ye He-chun(叶和春), Li Guo-feng(李国凤). Progress in synthesis and metabolism of

proline and its relationship with osmotolerance of plants
(脯氨酸代谢与植物抗渗透胁迫的研究进展) [J].

Chin Bull Botany(植物学通报), 2000, 17(6): 536–542.

Fermentation-biotransformation Cascade for the Production of D-proline by *Pseudomonas pseudocaligenes* XW-40

ZHANG Fan-fan¹, XIA Shi-wen^{1*}, XIE Yong-fang¹, LIU Jiao¹, LIN Hui²

(1. Chongqing Key Laboratory of Big Data for Bio-intelligence, College of Bioinformatics,
Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China;
2. School of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A novel fermentation-biotransformation cascade was developed for the production of D-proline. In the fermentation process with DL-proline as the precursor, the L-enantiomer was used to induce the production of proline dehydrogenase by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40, while the D-enantiomer was completely retained. Under the optimal conditions, 6 g/L D-proline was produced in the fermentation stage. In the biotransformation process, the fermentation broth is directly used as the reaction medium without further separation of cells. The conversion of L-enantiomer in DL-proline was realized by fed-batch strategy. The feeding concentration of DL-proline in a single batch was 10 g/L, and the feeding times reached 5 batches. Through the cascade of fermentation and biotransformation, the D-proline was accumulated with 31 g/L and more than 99% enantiomeric excess. The mechanism of D-proline production in biotransformation was also postulated.

Key words: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40; fermentation; biotransformation; D-proline; proline dehydrogenase