

# 干酪乳杆菌 L-乳酸脱氢酶突变体在毕赤酵母中的表达及其不对称还原苯丙酮酸

张婷<sup>1</sup>, 李剑芳<sup>1</sup>, 胡蝶<sup>1,2</sup>, 李闯<sup>3</sup>, 胡博淳<sup>3</sup>, 邬敏辰<sup>2</sup>

1 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

张婷, 李剑芳, 胡蝶, 等. 干酪乳杆菌 L-乳酸脱氢酶突变体在毕赤酵母中的表达及其不对称还原苯丙酮酸. 生物工程学报, 2020, 36(5): 959–968.

Zhang T, Li JF, Hu D, et al. Expression of a *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase mutant in *Pichia pastoris* for asymmetric reduction of phenylpyruvate. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 959–968.

**摘要:** 为提高 L-苯乳酸 (L-phenyllactic acid, L-PLA) 的生产效率, 以干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* L-乳酸脱氢酶突变体 L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 为研究对象, 实现其在毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 中的分泌表达, 并与葡萄糖脱氢酶 SyGDH 偶联, 构建并优化体外辅酶循环体系, 不对称还原苯丙酮酸 (Phenylpyruvate, PPA) 制备 L-PLA。结果显示, 毕赤酵母重组酶 reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 的表观分子量为 36.8 kDa, 比活力为 270.5 U/mg, 是原酶的 42.9 倍。在 40 °C, 初始 pH 为 5.0, 底物 PPA、辅酶 NAD<sup>+</sup> 和葡萄糖浓度分别为 100、2 和 120 mmol/L, SyGDH 和 reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 添加量分别为 1 和 10 U/mL 的最优条件下, L-PLA 的产率可达 99.8%, 对映体过量 (ee) 值 > 99.9%, 时空产率和平均转化率分别高达 9.5 g/(L·h) 和 257.0 g/(g·h)。结果表明, reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 在不对称还原 PPA 制备 L-PLA 中生产效率高, 具有工业应用的潜力。

**关键词:** 乳酸脱氢酶, 毕赤酵母, 葡萄糖脱氢酶, 辅酶循环体系, L-苯乳酸

**Received:** August 26, 2019; **Accepted:** November 21, 2019

**Supported by:** China Postdoctoral Science Foundation (No. 2018M630522), Natural Science Foundation of Jiangsu Province for Youth of China (No. BK20180622).

**Corresponding author:** Minchen Wu. Tel: +86-510-85327662; E-mail: biowmc@126.com

中国博士后基金项目 (No. 2018M630522), 江苏省青年基金项目 (No. BK20180622) 资助。

网络出版时间: 2019-12-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191210.1016.001.html>

# Expression of a *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase mutant in *Pichia pastoris* for asymmetric reduction of phenylpyruvate

Ting Zhang<sup>1</sup>, Jianfang Li<sup>1</sup>, Die Hu<sup>1,2</sup>, Chuang Li<sup>3</sup>, Bochun Hu<sup>3</sup>, and Minchen Wu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>3</sup> School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** To improve the productivity of L-phenyllactic acid (L-PLA), L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup>, a *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase mutant, was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. An NADH regeneration system *in vitro* was then constructed by coupling the recombinant (re) LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> with a glucose 1-dehydrogenase for the asymmetric reduction of phenylpyruvate (PPA) to L-PLA. SDS-PAGE analysis showed that the apparent molecular weight of reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> was 36.8 kDa. And its specific activity was 270.5 U/mg, 42.9-fold higher than that of LcLDH1 (6.3 U/mg). The asymmetric reduction of PPA (100 mmol/L) was performed at 40 °C and pH 5.0 in an optimal biocatalytic system, containing 10 U/mL reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup>, 1 U/mL SyGDH, 2 mmol/L NAD<sup>+</sup> and 120 mmol/L D-glucose, producing L-PLA with 99.8% yield and over 99% enantiomeric excess (*ee*). In addition, the space-time yield (STY) and average turnover frequency (aTOF) were as high as 9.5 g/(L·h) and 257.0 g/(g·h), respectively. The high productivity of reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> in the asymmetric reduction of PPA makes it a promising biocatalyst in the preparation of L-PLA.

**Keywords:** L-lactate dehydrogenase, *Pichia pastoris*, glucose 1-dehydrogenase, coenzyme regeneration system, L-phenyllactic acid

苯乳酸 (Phenyllactic acid, PLA) 是一种高附加值的天然有机酸, 具有广谱抑菌性, 可代替防腐剂应用于食品和饲料中<sup>[1]</sup>。L-PLA 和 D-PLA 是苯乳酸的两种对映异构体<sup>[2]</sup>, 它们具有不同的应用价值, D-PLA 可用于合成降血糖药物恩格列酮和驱肠虫药 PF1022A, 而 L-PLA 可用于合成非蛋白氨基酸 Statine 和新型生物可降解材料聚苯乳酸<sup>[3-5]</sup>。生物酶法合成光学纯 PLA 具有反应条件温和、光学纯度高及环境友好等优点而备受青睐<sup>[6]</sup>。

乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 分为 L-LDH (EC. 1.1.1.27) 和 D-LDH (EC. 1.1.1.28), 是以辅酶 NADH 或 NAD<sup>+</sup> 作为氢传递<sup>[7]</sup>, 在生物体内催化丙酮酸与乳酸之间的还原与氧化反应<sup>[8]</sup>。LDH 能够不对称还原潜手性  $\alpha$ -酮酸生成  $\alpha$ -羧基酸, 具有较广的底物谱, 对天然底物丙酮酸具有较高酶活力, 而对非天然底物苯丙酮酸 (Phenylpyruvate, PPA) 的酶活力较低。如来源于植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 的 L-LpLDH<sup>[9]</sup>、L-LpLDH1 和 L-LpLDH2<sup>[10]</sup>、巨大芽孢杆菌 *Bacillus*

*megaterium* 的 L-BmLDH<sup>[11]</sup>、嗜热脂肪土芽孢杆菌 *Geobacillus stearothermophilus* 的 L-BsLDH<sup>[12]</sup> 和凝结芽孢杆菌 *B. coagulans* 的 L-BcLDH<sup>[6,13]</sup> 催化 PPA 的比活力分别为 28.1、71.1、0.1、3.4、7.4 和 72.6 U/mg; 来源于 *L. plantarum* 的 D-LpLDH<sup>[10]</sup>、菊糖芽孢乳杆菌 *Sporolactobacillus inulinus* 的 D-SiLDH<sup>[14]</sup>、乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 的 D-PaLDH<sup>[15]</sup> 和戊糖片球菌 *P. pentosaceus* 的 D-PpLDH<sup>[16]</sup> 催化 PPA 的比活力分别为 215.8、4.3、140.0 和 116.0 U/mg。

目前, 采用微生物发酵法制备非光学纯 PLA 的 PPA 转化率及 PLA 产率均较低<sup>[17]</sup>。多种来源 L-LDH 和 D-LDH 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达, 并分别应用于制备光学纯 L-PLA 和 D-PLA。Wang 等<sup>[14]</sup>利用表达 D-SiLDH<sup>M307L</sup> 的 *E. coli* 全细胞, 采用体内辅酶循环体系催化 158.2 mmol/L PPA 制备 D-PLA (*ee*<sub>p</sub>>99.7%) 的产率为 82.3%; Zhu 等<sup>[9]</sup>将 L-LpLDH 与葡萄糖脱氢酶 (Glucose 1-dehydrogenase, GDH) 在 *E. coli* 中共表达, 全细

胞催化 186.2 mmol/L PPA 的转化率为 89.2%，L-PLA ( $ee_p=99.7\%$ ) 产率仅为 55.7%。Zhu 等<sup>[9,18]</sup>研究表明，*E. coli* 全细胞自身代谢酶在催化 PPA 过程中产生副产物，如图 1 所示，转氨酶可将 PPA 转化为苯丙氨酸 (Phe)，且葡萄糖参与细胞新陈代谢生成乳酸，造成 PLA 产率低且分离困难。巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 本身不分泌内源蛋白，外源蛋白可通过信号序列进行胞外分泌表达。近年，来源于肠系膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* 的 D-LmLDH<sup>[19]</sup> 和 *L. plantarum* D-LpLDH<sup>Y52L</sup> 突变体<sup>[20]</sup> 在 *P. pastoris* 胞内表达，分别利用重组 *P. pastoris* 全细胞生成 D-乳酸和 (R)-2-羟基-4-苯基丁酸。

本研究室前期从干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* CICIM B1192 基因组中克隆出一种编码 L-LDH 的基因 *lclhd1* (GenBank 登录号 CAP07851)，并实现其在 *E. coli* 中表达<sup>[21]</sup>，通过定点和迭代饱和和突变构建 L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 突变体，显著提高其催化 PPA 的酶活力。为避免副产物形成，提高 L-PLA 产率，本研究利用 *P. pastoris* GS115 分泌表达 L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 突变体，并与嗜酸热原体 *Thermoplasma acidophilum* 葡萄糖脱氢酶 SyGDH 构建体外辅酶 NADH 循环体系，通过进一步优化 reLcLDH01<sup>Q88A/I229A</sup> 和 SyGDH 双酶偶联不对称还

原 PPA 的催化条件，实现高效制备 L-PLA。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

重组菌 *E. coli*/pET-22b-*lclhd1*、*E. coli*/pET-22b-*lclhd1*<sup>Q88A/I229A</sup>、*E. coli*/pET-22b 和 *E. coli*/pET-28a-*sygdh*，表达宿主 *E. coli* JM109 和 *P. pastoris* GS115 和表达质粒 pPIC9K 均由实验室保藏；克隆载体 pUCm-T 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；T4 DNA 连接酶、内切酶 *EcoR* I、*Not* I 和 *Sal* I，购自大连 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒和 *ES Taq* Master Mixture 购自江苏康为世纪公司；苯丙酮酸钠、D-/L-苯乳酸和苯丙氨酸均购于美国 Sigma-Aldrich 公司；还原型辅酶 I NADH 和氧化型辅酶 I NAD<sup>+</sup> 购自上海阿拉丁公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组表达质粒的构建

根据乳酸脱氢酶 L-LcLDH1 基因及酵母表达载体 pPIC9K 多克隆位点，设计上游和下游引物 (L9K-F: 5'-CTCGAGAAAAGAGTGGCAAGTATTACGG-3'; L9K-R: 5'-GCGGCCCGCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTGACGAGTTTCGATG-3')，酶切位点为 *EcoR* I 和 *Not* I (下划线表示)，并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

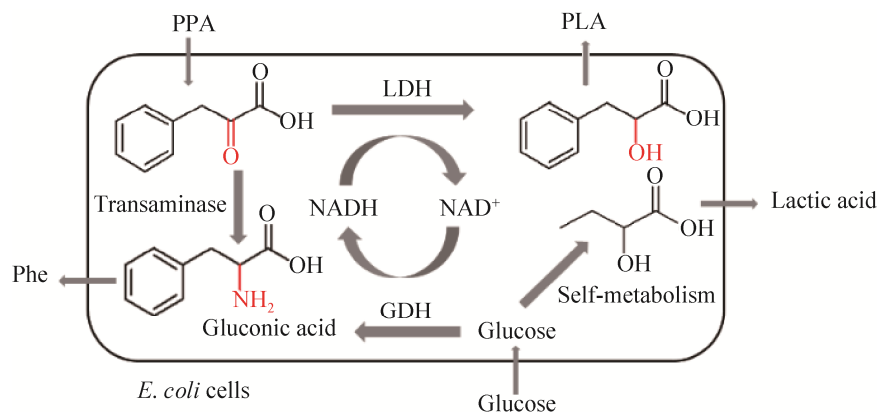


图 1 LDH 和 GDH 双酶共表达大肠杆菌全细胞不对称还原 PPA 制备 PLA<sup>[9,18]</sup>

Fig. 1 Asymmetric reduction of PPA to PLA by co-expressing LDH and GDH in *E. coli* cells<sup>[9,18]</sup>.

以重组质粒 pET-22b-*lcl dh1* 或 pET-28a-*lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup> 为模板, L9K-F 和 L9K-R 为引物, 通过 PCR 扩增出目的基因 (*lcl dh1* 和 *lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup>), 与 pUCm-T 载体连接构建克隆质粒 pUCm-T-*lcl dh1* 和 pUCm-T-*lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup>, 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切的克隆质粒与经同样双酶切的 pPIC9K 连接后, 转化 *E. coli* JM109, 构建重组菌 JM109/pPIC9K-*lcl dh1* 和 JM109/pPIC9K-*lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup>。

### 1.2.2 重组毕赤酵母转化子的筛选和表达

提取 pPIC9K、pPIC9K-*lcl dh1* 和 pPIC9K-*lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup> 质粒, 经 *Sal* I 线性化后, 电转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 构建重组 *P. pastoris* 菌 GS115/*lcl dh1* 和 GS115/*lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup>。参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册, 补料添加 1% (V/V) 的甲醇在 30 °C 诱导培养 72 h, 收集发酵液, 以经同样条件诱导的 GS115/pPIC9K 作为阴性对照, SDS-PAGE 分析重组酶表达。

### 1.2.3 酶活力的测定及检测方法

LDH 酶活力测定: 1 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.5), 加入 10 mmol/L PPA, 2 mmol/L NADH, 混匀后 35 °C 保温 5 min, 加入适量酶液反应 5 min, 加入 2 mL 甲醇终止反应, 采用反相 HPLC 色谱分析 PLA 生成量。在上述条件下, 每分钟生成 1 μmol 的 PLA 定义为 1 个 LDH 活力单位 (U)。GDH 酶活力测定参照文献报道<sup>[22]</sup>, 反应温度和 pH 修改为 35 °C 和 5.5。

反相 HPLC 分析方法: 采用 HPLC 为 Waters e2695 系统, 二极管阵列 (PDA) 检测器和 ProntoSIL C18 AQ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱进行样品分析。检测条件为: 流动相为水/甲醇 (62 : 38, V/V, 含 0.05% 三氟乙酸), 流速 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 色谱柱温度为 30 °C, 检测波长 210 nm。Phe、PPA 和 PLA 的保留时间分别是 4.52、9.23 和 10.9 min。

正相 HPLC 分析方法: 采用 Daicel OD-H (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱分析 PLA 的光学纯度。检测条件为: 流动相为正己烷/异丙醇 (98 : 2,

V/V, 含 0.05% 三氟乙酸), 其他条件与反相 HPLC 相同。D-PLA 和 L-PLA 的保留时间分别是 25.7 和 28.1 min。L-PLA 的对映体过量值 ( $ee_p$ ) 计算公式为:

$$ee_p(\%) = \frac{A_L - A_D}{A_L + A_D} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_L$  和  $A_D$  分别表示 L-PLA 和 D-PLA 的峰面积。

### 1.2.4 辅酶 NADH 循环体系的构建和验证

重组葡萄糖脱氢酶 SyGDH (GenBank 登录号 AL445065) 的诱导表达及纯化参考文献报道<sup>[22]</sup>, 纯化 SyGDH 后经冷冻干燥制得 SyGDH 酶粉。构建不同辅酶 NADH 循环体系 (表 1), 催化体系中参数分别为 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5), 10 mmol/L PPA, 2 mmol/L NADH 或 NAD<sup>+</sup>, 15 mmol/L 葡萄糖, 0.2 U/mL reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 和 0.2 U/mL SyGDH; 以 *E. coli/lcl dh1*<sup>Q88A/I229A</sup> 全细胞催化作对照, 反应体系中包含 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 6.0), 10 mmol/L PPA, 15 mmol/L 葡萄糖和 50 mg/mL *E. coli/LcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 湿菌体, 反应条件均为 35 °C、220 r/min 反应 2 h, 按照 1.2.3 反相 HPLC 色谱测定 L-PLA 的产量。

### 1.2.5 双酶偶联不对称还原苯丙酮酸催化条件的优化

温度和 pH 对催化反应的影响: 构建包含 10 mmol/L PPA、0.5 mmol/L NAD<sup>+</sup>、20 mmol/L 葡萄糖、0.2 U/mL reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 和 0.2 U/mL SyGDH 的催化体系, 分别在不同反应温度 (20–60 °C) 和 pH 5.5 缓冲液或者不同 pH (3.5–7.0) 缓冲液和 40 °C 条件下进行催化反应, 反应 20 min 后测定 L-PLA 的产量。

PPA 浓度对催化反应的影响: 构建包含不同底物浓度 PPA (20–300 mmol/L)、葡萄糖浓度为 PPA 1.5 倍、2.5 mmol/L NAD<sup>+</sup>、15 U/mL reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 和 1 U/mL SyGDH 的催化体系, 在 40 °C 和 pH 5.0 条件下反应不同时间取样, 测定 L-PLA 的产量。

酶添加量对催化反应的影响: 构建包含 100 mmol/L PPA、150 mmol/L 葡萄糖、2.5 mmol/L

的  $\text{NAD}^+$ 、不同酶量 (0.5–15 U/mL)  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  和 1 U/mL SyGDH 的催化体系, 在 40 °C 和 pH 5.0 条件下反应 2 h 后, 分别测定 L-PLA 的产量。

$\text{NAD}^+$  浓度对催化反应的影响: 构建包含 100 mmol/L PPA、150 mmol/L 葡萄糖、不同浓度 (0.2–2.5 mmol/L) 的  $\text{NAD}^+$ , 10 U/mL 的  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  和 1 U/mL SyGDH 的催化体系, 在 40 °C 和 pH 5.0 条件下反应 2 h 后, 分别测定 L-PLA 的产量。

葡萄糖浓度对催化反应的影响: 构建包含 100 mmol/L PPA, 不同浓度 (80–200 mmol/L) 葡萄糖, 2.0 mmol/L  $\text{NAD}^+$ , 10 U/mL  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  和 1 U/mL SyGDH 的催化体系, 在 40 °C 和 pH 5.0 条件下反应 2 h 后, 分别测定 L-PLA 的产量。

### 1.2.6 双酶偶联不对称还原苯丙酮酸的反应进程

在 25 mL 双酶偶联催化体系, 包含 50 mmol/L 醋酸-醋酸钠 (pH 5.0)、100 mmol/L PPA、120 mmol/L 葡萄糖, 2.0 mmol/L  $\text{NAD}^+$ 、10 U/mL  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  和 1 U/mL SyGDH 的催化体系, 在 40 °C、220 r/min 条件下反应不同时间取样, 按照 1.2.3 反相 HPLC 测定 PPA 的转化率和 L-PLA 的产量, 正相 HPLC 检测 L-PLA 的对映体过量值, 并计算出时空产率 (Space time yield, STY) 和平均转化率 (Average turnover frequency, aTOF), 其计算公式为:

$$\text{STY}(\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})) = \frac{C_p}{t} \quad (2)$$

$$\text{aTOF}(\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})) = \frac{C_p}{t \times C_e} \quad (3)$$

式中:  $c_p$  为 L-PLA 的产量 (g/L),  $t$  为反应时间 (h),  $c_e$  为酶蛋白添加量 (g/L)。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组毕赤酵母的构建及表达

重组酵母 GS115/*lclDH1* 和 GS115/*lclDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 经甲醇诱导收集发酵液, SDS-PAGE 分析表明 *reLcLDH1* 和 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 均在约 36.8 kDa 处有明显特异性条带, 与 *E. coli/lclDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 表达

*reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 的目的条带大小一致 (图 2)。以 PPA 为底物, *reLcLDH1* 和 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 的比活力分别为 6.3 U/mg 和 270.5 U/mg, *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 比活力明显高于其他来源天然 L-LDH<sup>[6,9-12]</sup>。Aslan 等<sup>[12]</sup> 通过半理性设计获得最优突变酶 L-BsLDH<sup>N101D/Q102Y</sup> 催化 PPA 比活力仅从 7.4 U/mg 提高至 51.3 U/mg。

### 2.2 辅酶 NADH 循环体系的构建及验证

重组葡萄糖脱氢酶 SyGDH 具有较强的耐酸和适酸性, 以及热稳定性<sup>[22]</sup>, 通过构建 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 和 SyGDH 不同的双酶偶联体系, 验证辅酶 NADH 循环再生的可行性。如表 1 所示, 催化体系 1、2、3 和 4 说明 SyGDH 在以葡萄糖作为底物实现了 NADH 辅酶循环再生, 在未同时添加 SyGDH 和葡萄糖的体系 2 和 4 中, PLA 产率决于  $\text{NADH}$  的添加量; 催化体系 4 和 6 表明添加  $\text{NAD}^+$  与  $\text{NADH}$  均能实现辅酶循环, 产物 L-PLA 产率高达 99.9% (图 3A, 3C), 其  $e_p > 99.9\%$  (图 3D–E), 故选择价格较低的  $\text{NAD}^+$  作为辅酶。对比 7 和 8 表明, *E. coli/lclDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 全细胞作为催化剂时, 不需要额外添加辅酶, 但 PLA 产率仅为 89.1%, 其副产物

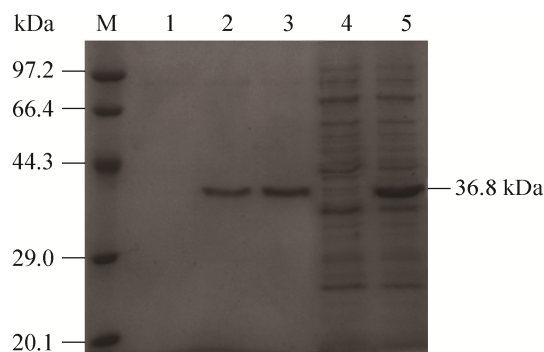


图 2 重组酶 *LcLDH1* and *LcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant *LcLDH1* and *LcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup>. M: protein marker; 1: the cultured supernatant of GS115/pPIC9K; 2: the cultured supernatant of GS115/*lclDH1*; 3: the cultured supernatant of GS115/*lclDH1*<sup>Q88A/I229A</sup>; 4: the whole cells of *E. coli*/pET-22b; 5: the whole cells of *E. coli/lclDH1*<sup>Q88A/I229A</sup>.

的出峰时间与苯丙氨酸一致 (图 3B)。全细胞含有各种酶系, 无额外添加辅酶也可完成辅酶 NADH 的循环再生, 但往往再生效率较低。与此同时, *E. coli* 代谢途径转氨反应中的氨基酸转移酶, 可将

一部分 PPA 进行转氨形成苯丙氨酸<sup>[23]</sup>。Zhu 等<sup>[9]</sup>也在研究中提到, 其用 *E. coli*/pETduet-*lpldh* 催化时有将近 30% 的 PPA 被用于其他代谢途径, 这导致 PPA 的转化效率和 PLA 的产率均不高。

表 1 不同催化体系验证体外辅酶 NADH 循环的构建

Table 1 Verification of NADH regeneration *in vitro* in the different reaction systems

Catalytic system	Conversion (%)	Yield (%)
1: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +PPA	ND <sup>a</sup>	ND
2: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +PPA+NADH	20.0±0.6	19.8±0.6
3: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +SyGDH+PPA+NADH	19.9±0.5	19.7±0.5
4: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +SyGDH+PPA+NADH+glucose	100±2.5	99.9±2.4
5: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +SyGDH+PPA+NAD <sup>+</sup>	ND	ND
6: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +SyGDH+PPA+NAD <sup>+</sup> +glucose	100±2.4	99.9±2.5
7: reLcLDH1 <sup>Q88A/I229A</sup> +SyGDH+PPA+glucose	ND	ND
8: <i>E. coli</i> / <i>lcldh1</i> <sup>Q88A/I229A</sup> +PPA+glucose	100±2.1	89.1±1.6

<sup>a</sup> ND means not detected.

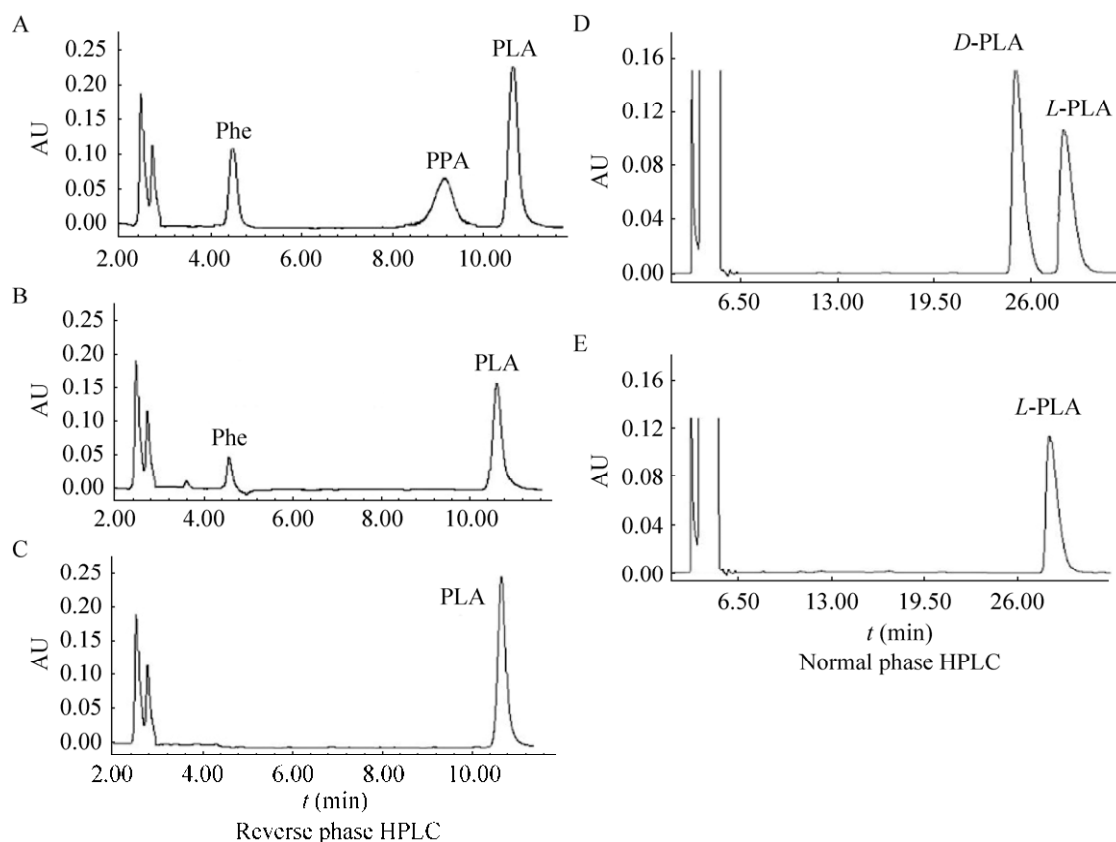


图 3 HPLC 分析重组 L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 催化不对称还原 PPA

Fig. 3 HPLC analysis of the asymmetric reduction of PPA catalyzed by recombinant L-LcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup>. (A) Phe, PPA and PLA standard samples. (B) *E. coli* whole cells catalyzed PPA. (C, E) reLcLDH1<sup>Q88A/I229A</sup> catalyzed PPA coupling with SyGDH. (D) Racemic PLA standard samples.

## 2.3 双酶偶联不对称还原苯丙酮酸的催化条件优化

### 2.3.1 温度和 pH 对催化反应的影响

酶促反应效率与温度和 pH 有关。如图 4A 所示, L-PLA 的产量随反应温度的升高而升高, 且在 40 °C 时达到最高值。如图 4B 所示, L-PLA 产量在 pH 为 5.0 时达到最高, 当 pH>5.0 后, 随着 pH 的增高, 产量明显降低, pH 到达 7.0 时, 产量为零, 表明温度和 pH 对催化反应具有重要影响, 双酶偶联催化反应的最适温度和 pH 为 40 °C 和 5.0, 与 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 的最适反应温度和 pH 一致。由于 SyGDH 具有良好的温度和 pH 稳定性, 而温度和 pH 对 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 的影响较大, 故双酶偶联体系中催化生成 L-PLA 依赖于 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup>。

### 2.3.2 PPA 浓度对催化反应的影响

为提高 PPA 的生产效率, 构建 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 和 SyGDH 体外双酶偶联体系催化不同浓度的

PPA。如表 2 所示, 10、50 和 100 mmol/L 的 PPA 在 2 h 内完全水解, L-PLA 的产率均大于 99%, 时空产率 (STY) 从 1.64 g/(L·h) 提高至 8.2 g/(L·h); 当 PPA 浓度为 150 mmol/L 时, L-PLA 的产量为 104.1 mmol/L, 而产率仅为 69.4%, 由于随着 L-PLA 浓度增加, SyGDH 催化葡萄糖产生等量葡萄糖酸, 测定催化体系中 pH 值从 5.0 降至 3.0, 导致 *reLcLDH1*<sup>Q88A/I229A</sup> 和 SyGDH 酶活力显著降低, 从而不能继续转化 PPA。此外, 当 PPA 浓度大于 150 mmol/L 时, L-PLA 的产量随着 PPA 浓度的增加而降低, 当底物浓度为 300 mmol/L 时, L-PLA 的产量仅为 9.6 mmol/L, 表明存在底物抑制作用。据文献报道, 由于高浓度 PPA 对 LDH 的催化具有抑制作用, 采用补料添加 PPA 的手段可以显著增加 PLA 的产量<sup>[9,24-25]</sup>。Zheng 等<sup>[6]</sup>研究表明, L-BcLDH 催化 PPA 抑制浓度为 90 mmol/L, Zhu 等<sup>[9]</sup>研究中指出 L-LpLDH 催化 80 mmol/L PPA 的转化效率最佳。

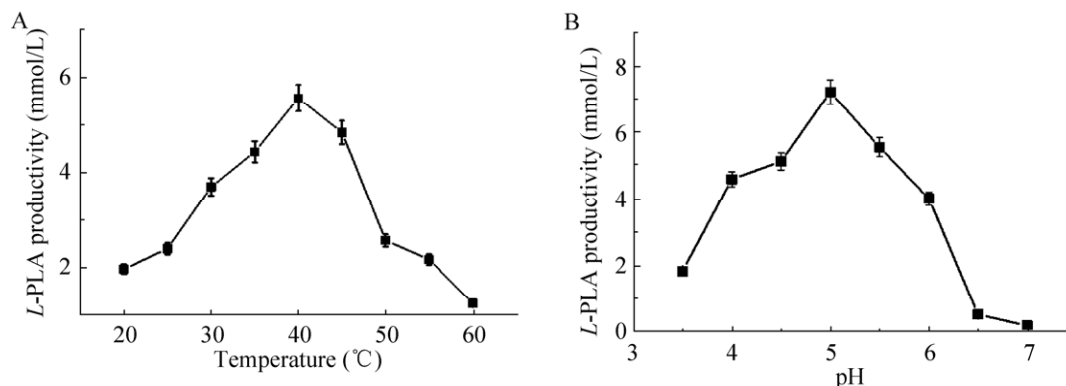


图 4 不同温度、pH 值下双酶偶联体系催化不对称还原 PPA

Fig. 4 Asymmetric reduction of PPA at different temperatures (A) and pH values (B) in double-enzyme system.

表 2 双酶偶联体系不对称还原不同浓度的 PPA

Table 2 Asymmetric reduction of PPA at different concentrations in double-enzyme system

Substrate (mmol/L)	Time (h)	Conversion (%)	Production (mmol/L)	Yield (%)	STY (g/(L·h))
10	2	100±2.5	9.9±0.1	99.9	1.64
50	2	100±3.0	49.9±1.3	99.8	4.2
100	2	100±2.2	99.6±2.5	99.6	8.2
150	4	69.5±1.2	104.1±3.1	69.4	4.3
200	5	38.4±1.0	76.2±2.1	38.1	3.2
250	5	11.3±0.2	28.0±0.6	11.2	0.9
300	5	3.5±0.1	9.6±0.3	3.2	0.3

### 2.3.3 酶添加量、 $\text{NAD}^+$ 浓度和葡萄糖浓度对催化反应的影响

为进一步提高其生产效率,对酶添加量、 $\text{NAD}^+$ 浓度和葡萄糖浓度进行优化。如图5所示,随着  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  添加量的增大, L-PLA 的产率逐渐增加,当达到 10 U/mL 时, L-PLA 产率可达 99.9%; 当  $\text{NAD}^+$  添加量为 2.0 mmol/L 时, L-PLA 产量达到最高; 葡萄糖浓度超过 120 mmol/L

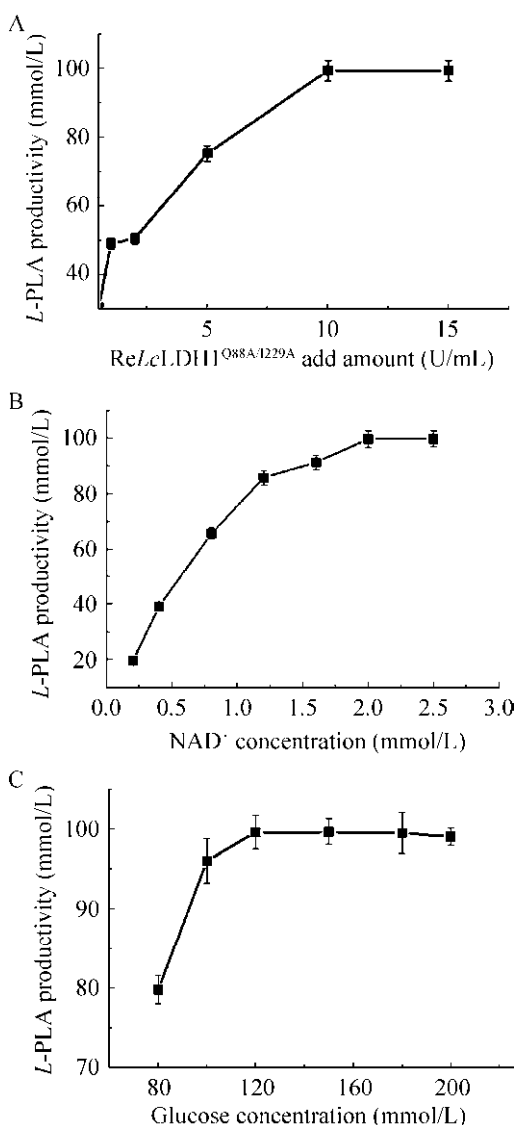


图5 双酶偶联不对称还原 PPA 催化条件的优化  
Fig. 5 Optimization of the catalytic conditions for the asymmetric reduction of PPA in double-enzyme system.

后 L-PLA 产量稍微降低。与初始反应体系相比,  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  酶添加量、 $\text{NAD}^+$ 浓度和葡萄糖浓度分别降低至 10 U/mL、2.0 和 120 mmol/L 以提高其利用率。

### 2.4 双酶偶联不对称还原苯丙酮酸

以优化的催化条件下,扩大双酶偶联反应体系至 25 mL,检测不对称还原 100 mmol/L PPA 制备 L-PLA 的反应进程。如图6所示,反应 105 min 后, PPA 的转化率 >99.9%, L-PLA 的产率可达到 99.8%,  $ee_p > 99.9\%$ , 平均转化率 aTOF 为 257.0 g/(g·h), 时空产率为 9.5 g/(L·h)。与其他不同来源的 LDH 不对称还原 PPA 制备 PLA 的比较如表3所示,尽管 L-LpLDH 与 GDH 双酶共表达 *E. coli* 全细胞催化 PPA 生成 L-PLA 具有较高时空产率,但其 L-PLA 的产率仅为 55.8%; Xu 等<sup>[26]</sup> 利用来源于乳杆菌 *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 的苯丙酮酸还原酶 LaPPR 与 GDH 双酶共表达 *E. coli* 全细胞 (20 g 干细胞) 催化 PPA 生成 D-PLA 浓度高达 550.0 mmol/L, 产率为 91.3%, 由于较低的催化活力,其 aTOF 仅为 0.5 g/(g·h)。与已有报道相比,  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  和 SyGDH 体外双酶偶联催化不对称还原 PPA 具有更高的产率和生产效率。

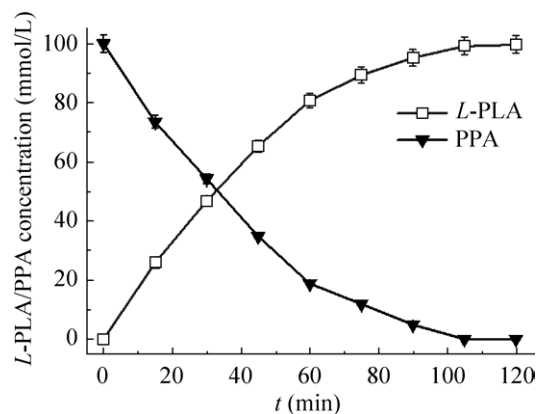


图6  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$  不对称还原 PPA 产 L-PLA 的进程曲线  
Fig. 6 Time course of the production of L-PLA from PPA by  $\text{reLcLDH1}^{\text{Q88A/I229A}}$ .



表 3 比较不同来源 LDH 不对称还原 PPA 制备 PLA

Table 3 Comparison of asymmetric reduction of PPA to prepare PLA by LDH

Enzyme	Catalyst	Activity (U/mg)	PPA feeding (times)	PPA (mmol/L)	PLA (mmol/L)	Time (h)	Yield (%)	STY (g/(L·h))	aTOF (g/(g·h))	$ee_p$ (%)	Reference
L- <i>Lp</i> LDH <sup>a</sup>	<i>E. coli</i> cells	9.5 <sup>c</sup>	2	186.2	103.8 (L)	1.0	89.2	55.8	17.2	ND	>99.7 [9]
D- <i>Lp</i> LDH <sup>Y52V b</sup>	<i>E. coli</i> cells	55.0 <sup>c</sup>	5	164.6	105.2 (D)	3.0	77.6	64.7	3.49	0.41 <sup>e</sup>	ND [24]
<i>Lp</i> LDH <sup>b</sup>	<i>L. plantarum</i> cells	ND	4	120.0	85.2 (NT)	16.0	83.3	71.0	0.9	0.03 <sup>e</sup>	ND [25]
<i>La</i> PPR <sup>a</sup>	<i>E. coli</i> cells	19.6 <sup>d</sup>	0	602.0	550.0 (D)	9.0	100	91.3	10.1	0.51 <sup>e</sup>	>99.0 [26]
D- <i>Lr</i> LDH <sup>a</sup>	<i>E. coli</i> cell-free extract	0.3 <sup>e</sup>	0	182.9	108.9 (D)	3.0	NT	60.3	6.8	0.45 <sup>e</sup>	>99.0 [27]
L- <i>Lc</i> LDH1 <sup>Q88A/I229Aa</sup>	<i>P. pastoris</i> cultured supernatant	270.4 <sup>f</sup>	0	100.0	99.8 (L)	1.8	100	99.8	9.5	257.0	>99.9 This study

<sup>a</sup> Coupled with GDH; <sup>b</sup> Coupled with formate dehydrogenase; <sup>c</sup> Cell-free extract; <sup>d</sup> Purified enzyme; <sup>e</sup> Dry cells; <sup>f</sup> Cultured supernatant; NT means not told.

### 3 结论

微生物发酵和酶催化是生物催化法合成 PLA 的两种重要途径。微生物发酵法由于底物转化率低、反应时间长和无法获得光学纯 PLA，而不能满足实际生产。L-乳酸脱氢酶是酶催化生产 L-PLA 的关键酶，但目前已报道的 L-乳酸脱氢酶的酶活力较低，且大多以大肠杆菌表达宿主，存在生成副产物、产率较低和生产效率低等缺点。本研究将突变酶 L-*Lc*LDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 在毕赤酵母中分泌表达，重组 L-*Lc*LDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 具有高酶活力；构建 re*Lc*LDH1<sup>Q88A/I229A</sup> 与 SyGDH 的体外辅酶 NADH 再生的双酶偶联体系不对称还原 PPA，并通过优化双酶偶联催化体系显著提高了底物 PPA 浓度和 L-PLA 的生产效率。本研究构建的重组 L-乳酸脱氢酶突变体的体外辅酶循环体系，在不对称还原 PPA 中具有高催化活力、不产生副产物、高光学纯度和高生产效率等优点，使其具有较好的工业应用前景。

### REFERENCES

- [1] Ning YW, Yan AH, Yang K, et al. Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms. *Food Chem*, 2017, 228: 533–540.
- [2] Fujii T, Shimizu M, Doi Y, et al. Novel fungal

phenylpyruvate reductase belongs to D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. *Biochim et Biophys Acta*, 2011, 1814(12): 1669–1676.

- [3] Hashimoto Y, Kobayashi E, Endo T, et al. Conversion of a cyanhydrin compound into S-(–)-3-phenyllactic acid by enantioselective hydrolytic activity of *Pseudomonas* sp. BC-18. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 60(8): 1278–1283.
- [4] Fujita T, Nguyen HD, Ito T, et al. Microbial monomers custom-synthesized to build true bio-derived aromatic polymers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 8887–8894.
- [5] Simmons TL, Baker GL. Poly(phenyllactide): Synthesis, characterization, and hydrolytic degradation. *Biomacromolecules*, 2001, 2(3): 658–663.
- [6] Zheng ZJ, Zhao MY, Zang Y, et al. Production of optically pure L-phenyllactic acid by using engineered *Escherichia coli* coexpressing L-lactate dehydrogenase and formate dehydrogenase. *J Biotechnol*, 2015, 207: 47–51.
- [7] Qin Y, Dong ZY, Liu LM, et al. Manipulation of NADH metabolism in industrial strains. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 161–169 (in Chinese). 秦义, 董志姚, 刘立明, 等. 工业微生物中 NADH 的代谢调控. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 161–169.
- [8] Al-Jassabi S. Purification and kinetic properties of skeletal muscle lactate dehydrogenase from the lizard *Agama stellio stellio*. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(7): 786–789.
- [9] Zhu YB, Wang Y, Xu JZ, et al. Enantioselective biosynthesis of L-phenyllactic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli*. *Molecules*, 2017,

- 22(11): 1966.
- [10] Jia JH, Mu WM, Zhang T, et al. Bioconversion of phenylpyruvate to phenyllactate: gene cloning, expression, and enzymatic characterization of D- and L-lactate dehydrogenases from *Lactobacillus plantarum* SK002. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(1): 242–251.
- [11] Wang Y, Fan M, Xue SM, et al. Production of L-phenyllactic acid from whole-cell recombinant *Escherichia coli*. *Food Ferment Ind*, 2015, 41(12): 13–17 (in Chinese).  
王颖, 范铭, 薛素妹, 等. 全细胞催化合成 L-苯基乳酸重组大肠杆菌的构建. *食品与发酵工业*, 2015, 41(12): 13–17.
- [12] Aslan AS, Birmingham WR, Karagüler NG, et al. Semi-rational design of *Geobacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase to access various chiral  $\alpha$ -hydroxy acids. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 179(3): 474–484.
- [13] Zheng ZJ, Ma CQ, Gao C, et al. Efficient conversion of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by using whole cells of *Bacillus coagulans* SDM. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e19030.
- [14] Wang M, Zhu LF, Xu XL, et al. Efficient production of enantiomerically pure D-phenyllactate from phenylpyruvate by structure-guided design of an engineered D-lactate dehydrogenase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 100(17): 7471–7478.
- [15] Mu WM, Yu SH, Jiang B, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase from *Pediococcus acidilactici* that converts phenylpyruvic acid into phenyllactic acid. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 907–911.
- [16] Yu SH, Jiang HY, Jiang B, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase producing D-3-phenyllactic acid from *Pediococcus pentosaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(4): 853–855.
- [17] Mu WM, Liu FL, Jia JH, et al. 3-phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresour Technol*, 2009, 100(21): 5226–5229.
- [18] Zhu YB, Wang LG, Hu FY, et al. Enhancement of phenyllactic acid biosynthesis by recognition site replacement of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(6): 1233–1241.
- [19] Yamada R, Ogura K, Kimoto Y, et al. Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(2): 37.
- [20] Wang XR, Yu ZT, Tang JW, et al. Efficient production of (R)-(-)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid by recombinant *Pichia pastoris* expressing engineered D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* with a single-site mutation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41(9): 1383–1390.
- [21] Li JF, Li XQ, Liu Y, et al. Directed modification of L-LcLDH1, an L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, to improve its specific activity and catalytic efficiency towards phenylpyruvic acid. *J Biotechnol*, 2018, 281: 193–198.
- [22] Yu T, Hu D, Wu MC, et al. Enzymatic characterization and coenzyme regeneration of a recombinant glucose 1-dehydrogenase. *J Food Sci Biotechnol*, 2014, 33(9): 910–916 (in Chinese).  
余涛, 胡蝶, 邬敏辰, 等. 重组葡萄糖脱氢酶的酶学性质及其偶联辅酶再生. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(9): 910–916.
- [23] Prasuna ML, Mujahid M, Sasikala C, et al. L-Phenylalanine catabolism and L-phenyllactic acid production by a phototrophic bacterium, *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Microbiol Res*, 2012, 167(9): 526–531.
- [24] Zhu YB, Jiang ZY, Chen JB, et al. Fusion of D-lactate dehydrogenase and formate dehydrogenase for increasing production of (R)-3-phenyllactic acid in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *J Biobased Mater Bio*, 2017, 11(4): 372–378.
- [25] Li MH, Meng XM, Sun ZY, et al. Effects of NADH availability on 3-phenyllactic acid production by *Lactobacillus plantarum* expressing formate dehydrogenase. *Curr Microbiol*, 2019, 76(6): 706–712.
- [26] Xu GC, Zhang LL, Ni Y. Enzymatic preparation of D-phenyllactic acid at high space-time yield with a novel phenylpyruvate reductase identified from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967. *J Biotechnol*, 2016, 222: 29–37.
- [27] Luo X, Yang ZF, Zang Y, et al. Synthesis of D-phenyllactic acid catalyzed by coupled lactate dehydrogenase and glucose dehydrogenase. *J Food Ferment Ind*, 2019, 45(7): 22–28 (in Chinese).  
罗希, 杨泽锋, 臧瑜, 等. 乳酸脱氢酶与葡萄糖脱氢酶偶联催化合成 D-苯基乳酸. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 22–28.

(本文责编 陈宏宇)