

# 重组大肠杆菌双相体系合成(R)-2-羟基-3-苯基丙酸

徐艳<sup>1,2</sup>, 陆炀<sup>1</sup>, 郑青云<sup>1</sup>, 孔维伟<sup>1</sup>, 庞敬权<sup>1</sup>, 齐斌<sup>1</sup>, 朱益波<sup>1\*</sup>

1(常熟理工学院 生物与食品工程学院, 苏州市食品生物技术重点实验室, 江苏 常熟, 215500)

2(苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州, 215000)

**摘要** 在水/正己烷双相体系中, 利用重组大肠杆菌全细胞催化苯丙酮酸(PPA)提高(R)-2-羟基-3-苯基丙酸(PLA)的产量。研究了双相体系中正己烷的体积分数、转化温度、转速、底物浓度和菌体量对 PLA 产量的影响。结果表明: 最优转化条件为正己烷体积分数为 40%; 转化温度为 40 ℃; 转化转速为 300 r/min; 底物浓度为 15 g/L; 湿菌体浓度为 15 g/L。在此条件下进行全细胞转化, PLA 的产率为  $(7.25 \pm 0.08)$  g/(L·h)。分批补加底物, 生成 PLA 的单位时间产量为  $(8.77 \pm 0.13)$  g/(L·h)。

**关键词** 苯丙酮酸; (R)-2-羟基-3-苯基丙酸; 全细胞双相催化; 大肠杆菌; 双相催化

(R)-2-羟基-3-苯基丙酸(PLA), 是一种广泛存在于乳酸菌发酵产品和蜂蜜中的有机酸<sup>[1-3]</sup>。研究表明 PLA 具有广谱抑菌性, 不仅能够有效抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 而且对一些酵母和霉菌的生长活性也有抑制作用<sup>[4-6]</sup>。此外, 这种代谢产生的芳香族有机酸对人和动物细胞均无毒性, 热稳定性较好, 有望作为新型安全的食品添加剂<sup>[7-9]</sup>, 在医药、饲料、化妆品等多方面都具有广泛的应用前景, 目前受到研究人员的广泛关注。

目前, 主要应用微生物全细胞催化生产 PLA<sup>[5,7,10-11]</sup>。ZHU 等构建基因突变的 *Escherichia coli* BL21(DE3) (pET-28a-d-ldh<sup>Y52V</sup>), PLA 的产量有所提高<sup>[12]</sup>。但是, 在微生物转化苯丙酮酸(PPA)合成 PLA 的过程中, 底物 PPA 溶解度较小, 且 PPA 与 PLA 均会抑制生产菌株的活性使得产量较低, 所以在单一的水相体系中进一步提高 PLA 产量存在较大的困难。WANG 利用环己醇/水双相体系生产环己基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷和环己基- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 环己基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷和环己基- $\beta$ -D-葡萄糖苷的产量较纯水相中均有明显提高, 光学纯度达到 99.5% 以上<sup>[13-14]</sup>; 徐礼生, 刘均忠等在水/乙酸乙酯双相体系中利用色氨酸合成酶法合成 L-色氨酸的研究中, 增加底物的溶解性, 提

高了 L-丝氨酸的转化率<sup>[15-16]</sup>。采用正辛醇-水两相反应体系催化栀子苷水解制备京尼平, 部分解除产物抑制, 提高产物收率, 简化后续的产物分离<sup>[17-18]</sup>。以上研究中, 利用双相体系, 增加细胞膜通透性<sup>[19-21]</sup>, 在增加底物的溶解度的同时减弱了底物与产物对细胞的抑制作用, 增加产物的产量, 提高产物的收率, 同时简化产物分离。本研究利用前期构建的重组 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-d-ldh<sup>Y52V</sup>, 研究其在水/正己烷双相体系的催化效果, 探讨了转化过程中底物浓度、转化温度、转化转速、菌体浓度和有机溶剂的体积分数的影响, 并在优化条件下, 采用分批补加底物的方式获得较高的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

PPA(纯度 98%)、PLA(纯度 98%), 国药集团; 酵母提取物、胰蛋白胨, 英国 Oxoid 公司; 葡萄糖、IPTG、卡那霉素, 上海生物工程公司; 正己烷, 上海强顺化学试剂公司; 高速台式离心机, 德国 Thermo 公司; 恒温震荡培养箱, 太仓市华美生化仪器厂; 高效液相色谱仪, 日本岛津公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌体培养

将活化好的 *E. coli* BL21(DE3) (pET-28a-d-ldh<sup>Y52V</sup>)<sup>[4]</sup> 种子液以 2% 接种量接入装有 100 mL 无菌 LB 培养基(含有卡那霉素 50 mg/L)的 500 mL 摇瓶中, 在 37 ℃ 和 200 r/min 条件下培养至 OD<sub>600</sub> 值为 1.0 时, 加入终浓度 1 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半

第一作者: 硕士研究生(朱益波副教授为通讯作者, E-mail: centuryrain@126.com)。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31501459); 国家自然科学基金面上项目(31470092); 江苏省自然科学基金项目(BK20130380); 江苏省“六大高峰人才”资助计划项目(NY-021); 常熟市科技计划项目(CN201412)

收稿日期: 2016-01-04, 改回日期: 2016-03-16

乳糖苷(IPTG),降至25℃、200 r/min继续培养诱导表达8 h,取诱导后菌液,6 000 r/min、4℃离心5 min,收集菌体用pH 7.0的磷酸钾缓冲液洗涤2次,并重悬于10 mL相应反应体系中。反应1 h后,取一定量转化液于4℃、12 000 r/min离心2 min,上清液稀释后经0.22 μm滤膜过滤后进行高效液相(岛津,LC-20A)检测<sup>[12]</sup>。

### 1.2.2 全细胞转化合成PLA

菌体加入到10 mL双相反应体系中,水相中含有20 g/L葡萄糖,有机相与水相以一定比例混合,于设定转速、温度、细胞含量振荡转化1 h。为使反应过程水相pH维持相对稳定,将相应量底物溶解于0.2 mol/L, pH=7.0的磷酸缓冲溶液中;另以不加有机溶剂的纯水相转化作为对照,每组实验3次平行。定时取样,4℃、12 000 r/min离心2 min,水相与有机相分层,分别预处理以高效液相色谱法测定PLA的生成量。

### 1.2.3 最优条件转化生产PLA及分批补加底物

在上述步骤下,得到最优转化的温度,转速,底物浓度,有机溶剂的体积分数,菌体量,在最优条件下进行底物转化1 h,取样离心测定PLA的产量。

15 g湿菌体加到100 mL双相反应体系中,60 mL水相(pH=7.0,0.2 mol/L磷酸缓冲液)中含有20 g/L葡萄糖,40 mL有机相,在40℃和300 r/min振荡条件下反应;反应第30 min和70 min分别补加8 mL浓度为145 g/L的PPA,共反应120 min,定时取样离心分离水相与有机相,分别进行高效液相检测。

### 1.2.4 样品测定方法

样品进行高效液相色谱检测,色谱条件为:色谱柱为Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub>分析柱;流动相为A:0.05%三氟乙酸水溶液,B:0.05%三氟乙酸甲醇溶液;流速1 mL/min;梯度洗脱条件:0~20 min,B:10%~100%;20~23 min,B:100%;23~25 min,B:100%~10%。柱温30℃;进样体积5 μL;检测波长210 nm<sup>[9]</sup>。计算所得PLA的产量为水相与有机相中的PLA的质量之和与体系总体积之比。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PLA合成过程曲线

图1表示纯水相中重组大肠杆菌合成PLA过程曲线图。结果显示,在0~30 min时,反应迅速,底物PPA迅速减少,产物PLA有明显增加;30~60 min时,反应逐渐趋于稳定,60 min以后PLA产量基本稳定,并达到最高。因此,以60 min作为反应时间进行

以下研究。

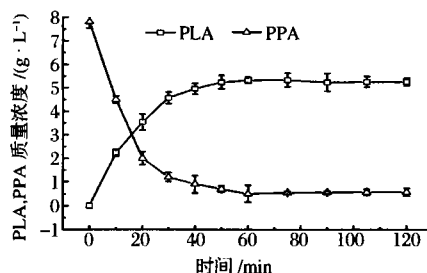


图1 PLA合成过程曲线

Fig. 1 Time course of synthesis of PLA

### 2.2 正己烷的体积分数对PLA产量的影响

图2为双相体系中正己烷的体积分数对PLA产量的影响(以不加有机溶剂纯的水相PLA产量作为对照)。由图2可见,随着正己烷体积分数逐渐增大,PLA的产量逐渐升高;有机溶剂可提高底物PPA的溶解度,增加菌体与底物接触的机会,因而PLA的产量增加;但继续增加正己烷的体积,过量的有机溶剂对菌体的毒害作用较大,导致产量降低。当正己烷的体积分数为40%时,PLA的产量最高,较对照组(4.98±0.08) g/(L·h)的产量所以选择40%作为最优的正己烷的体积分数。

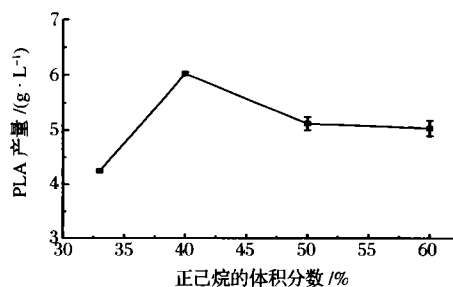


图2 正己烷体积分数对PLA产量的影响

Fig. 2 Effect of volume fraction of n-hexane on yield of PLA

### 2.3 底物浓度对PLA产量的影响

图3表示底物PPA的浓度对PLA产量的影响。从图3看出,底物浓度升高,PLA的产量增大,当底物浓度为15 g/L时,产量达到最高,继续增加底物浓度,抑制菌株的生产活力,影响PLA的生成,产量降低。

### 2.4 转化转速对PLA产量的影响

转化时的转速影响溶氧,转速越高,菌体可利用的氧气浓度越高,对PLA的生产具有一定的促进作用,但是在双相体系中,转化的转速提高还会加快有机溶剂的挥发,不利于PLA的产量提高。从图4-A看出,转速为300 r/min时,PLA的产量最高,选择此转速作为最优转化转速。

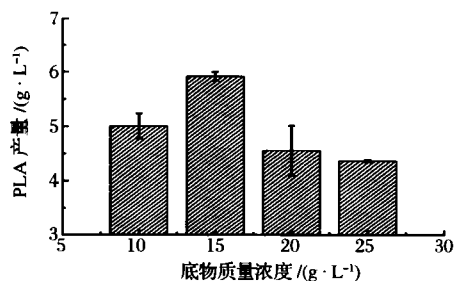


图3 底物浓度对 PLA 产量的影响

Fig. 3 Effect of concentration of substrate on yield of PLA

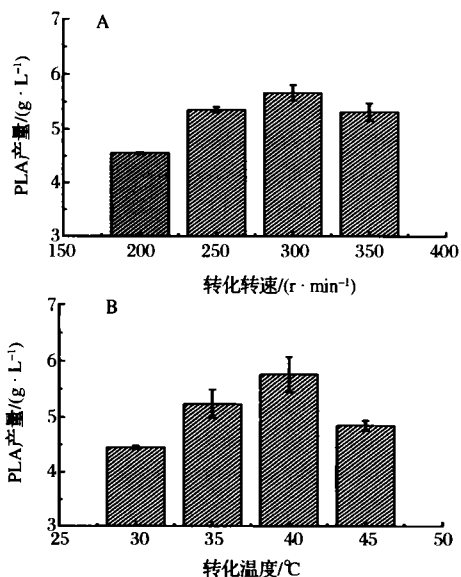


图4 转化转速与温度对 PLA 产量的影响

Fig. 4 Effect of conversion speed and temperature on yield of PLA

## 2.5 转化温度对 PLA 产量的影响

转化温度对菌株乳酸脱氢酶的活性和转化效率影响较大,温度升高,酶活增高产量升高,温度过高,酶活降低,同时加快有机溶剂的挥发,不利于 PLA 的生产,从图 4-B 看出,转化温度为 40 °C 时,酶活最高,PLA 的产量最高。

## 2.6 菌体浓度对 PLA 产量的影响

从图 5 来看,菌体量越多,利用的底物越多,生成的 PLA 量越多,但是单位菌体的产量降低。因此,从 PLA 产量与单位菌体量的产量综合考虑,选择细胞浓度为 15 g/L (约 3.6 g/L 干细胞浓度) 作为最优菌体浓度。

## 2.7 转化反应及分批补料培养生产 PLA

最优转化条件下,PLA 的产率为  $7.25 \pm 0.08$  g/(L · h),较纯水相中 PLA 的产量  $5.31 \pm 0.24$  g/(L · h) 有明显提高。以最优条件进行底物流加,结果示于图 6。由图可见,双相反应体系反应 2 h 内,产物的

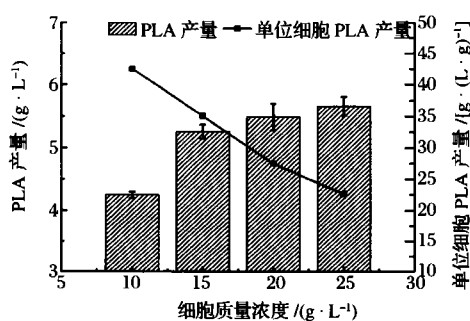


图5 菌体质量浓度对 PLA 产量的影响

Fig. 5 Effect of cell concentration on yield of PLA

生成量不断增加;在 80 ~ 120 min 时,产量增加较缓慢,当培养至 120 min 时 PLA 的产量为  $(17.52 \pm 0.13)$  g/L。

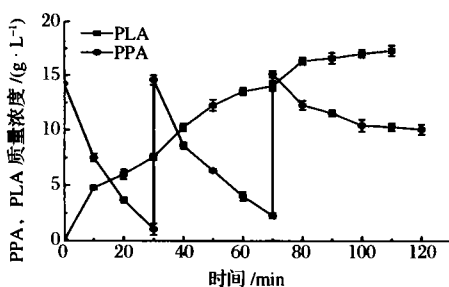


图6 最优条件下分批补料生产 PLA 时间曲线

Fig. 6 Time course of production of PLA under the optimum conditions

## 3 结论

在水/正己烷双相中,以 PPA 为底物,利用 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-lah<sup>Y52V</sup> 全细胞催化合成 PLA,并优化了其转化条件。最优转化条件如下:菌体浓度为 15 g/L;有机溶剂正己烷的体积分数为 40%;底物浓度 15 g/L;转化温度和转速分别为 40 °C 和 300 r/min;分批补加底物,PLA 产率可达 8.77 g/(L · h)。通过改变底物与产物在水/有机溶剂双相中的分配系数,增加底物的溶解度,减小底物与产物对细胞的抑制作用,PLA 的产量有明显提高,为全细胞催化高产 PLA 提供了新思路。

## 参考文献

- [1] AHMADOVA A, TODOROV S D, HADJI-SFAXI I, et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese [J]. Anaerobe, 2013, 20(2): 42-49.
- [2] CORTES-ZAVALETA O, LOPEZ-MALO A, HERNANDEZ-MENDOZA A, et al. Antifungal activity of *Lactobacilli* and its relationship with 3-phenyllactic acid production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014,

- 173(3):30-35.
- [3] DIEULEVEUX V, VAN DER PYL D, CHATAUD J, et al. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 800-803.
- [4] 胡发根, 朱颖越, 王立梅, 等. *Bacillus megaterium* Z2013513 静息细胞合成苯基乳酸的研究[C]. 南京: 科技与产业对接——中国食品科学技术学会第十届年会暨第七届中美食品业高层论坛. 2013-10-29.
- [5] 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[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(12): 13-17.
- [6] TUBEROSO C I, BIFULCO E, CABONI P, et al. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(1): 364-369.
- [7] NI Y, SU Y, LI H, et al. Scalable biocatalytic synthesis of optically pure ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate using a recombinant *E. coli* with high catalyst yield[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 493-498.
- [8] WANG L J, LI C X, NI Y, et al. Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from *Streptomyces coelicolor* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(14): 7 023-7 028.
- [9] 孙姜, 郑丽雪, 王立梅. *Lactobacillus paracasei* W2 产苯基乳酸的发酵动力学研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 180-183.
- [10] LEUCHTENBERGER W, HUTHMACHER K, DRAUZ K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(1): 1-8.
- [11] 蒋卓越, 季伟, 钱蓓蓓, 等. 乳酸脱氢酶突变体 D-LDHY52L 在大肠杆菌中的重组表达及其合成 D-苯基乳酸的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 1-6.
- [12] ZHU Y, HU F, WANG L, et al. Enhancement of phenyllactic acid biosynthesis by recognition site replacement of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus pentosus* [J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(6): 1 233-1 241.
- [13] 万丽花, 姚忠, 倪芳, 等. 两相体系中  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化栀子苷水解制备京尼平[J]. *化工学报*, 2014, 65(9): 3 583-3 591.
- [14] CARREA G, RIVA S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents[J]. *Angewandte Chemie International Ed. in English*, 2000, 39(13): 2 226-2 254.
- [15] 庞敏, 王海磊, 姚建铭, 等. 以吡啶和 DL-丝氨酸为底物固定化酶法合成 L-色氨酸[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(10): 6-9.
- [16] 徐礼生, 刘均忠, 王治元, 等. 水/有机溶剂双相体系中色氨酸合成酶法合成 L-色氨酸[J]. *催化学报*, 2011, 32(8): 1 405-1 410.
- [17] LI Y N, SHI X A, ZONG M H, et al. Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with Baker's yeast FD-12[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(5): 1 305-1 311.
- [18] WANG R, YANG X, GAO R, et al. Enzymatic synthesis of cyclohexyl- $\alpha$  and  $\beta$ -D-glucosides catalyzed by  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 56(2): 131-135.
- [19] KATAOKA M, KITA K, WADA M, et al. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(5-6): 437-445.
- [20] VON RYBINSKI W. Alkyl glycosides and polyglycosides [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1996, 1(5): 587-597.
- [21] 刘幽燕, 许建和, 胡英. 表面活性剂对脂肪酶活性和选择性的影响[J]. *化学学报*, 2000, 58(2): 149-152.

## Production of (R)-2-hydroxy-3-phenylpropionic acid by recombinant *E. coli* in a biphasic system

XU Yan<sup>1,2</sup>, LU Yang<sup>1</sup>, ZHENG Qing-yun<sup>1</sup>,  
KONG Wei-wei<sup>1</sup>, PANG Jing-quan<sup>1</sup>, QI Bin<sup>1</sup>, ZHU Yi-bo<sup>1\*</sup>

1 (Key Laboratory of Food and Biotechnology of Suzhou, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

2 (Institute of basic medical and biological sciences, Soochow University, Suzhou 215000, China)

**ABSTRACT** In a water/ n-hexane biphasic system, recombinant *E. coli* produce (R)-2-hydroxy-3-phenylpropionic acid (D-PLA) from phenylpyruvic acid (PPA) by whole-cell catalysis. The effects of volume fraction of n-hexane, conversion temperature and rotate speed, concentration of substrate, and cell concentration were investigated. The optimal volume fraction of n-hexane was 40%. The optimal temperature and rotate speed of conversion were 40 °C and 300 r/min, respectively. The optimal sodium phenylpyruvate concentration was 15 g/L. The optimal cell concentration was 15 g/L. Under the optimal conditions, the yield of PLA reached (7.25 ± 0.08) g/(L · h) in aqueous/n-hexane biphasic system. The production of PLA by fed batch fermentation was (8.77 ± 0.13) g/(L · h).

**Key words** phenylpyruvate; (R)-phenyllactic acid; whole-cell biphasic catalytic system; *E. coli*; biphasic catalyze