

## L-苯基乳酸的 L-苯基乳酸及其工艺研究

曹 纲

武汉健民大鹏药业有限公司 湖北武汉

**【摘要】**L-苯基乳酸(L-phenyllactic acid, PLA)是一种具有广谱抗菌作用的天然小分子有机酸,近年来在食品防腐和生物制药等领域显示出广阔的应用前景。其生物合成及其工艺研究主要集中在微生物发酵和全细胞催化策略上,但是其产量和纯度难以满足工业生产的需求。本文利用基因工程技术,构建了L-苯基乳酸合成途径的关键酶基因(lacI和lacS),并将其成功地应用于L-苯基乳酸的生物合成,为实现工业化生产奠定了基础。通过对关键酶基因进行PCR扩增,并将其与质粒pCAPTX-based融合表达,构建了高效的重组质粒pCAPTX-based,并将其成功地导入菌株YF11中。实验结果表明,重组菌株YF11能够在4°C条件下发酵96h,发酵液中L-苯基乳酸的产量为0.91g/L。利用该工程菌株实现了L-苯基乳酸的产业化生产,并对其工业化生产工艺进行了初步探讨。

**【关键词】**L-苯基乳酸; L-苯基乳酸; 微生物发酵; 基因工程

**【收稿日期】**2024年8月12日

**【出刊日期】**2024年12月21日

**【DOI】**10.12208/j.jafs.20241019

### Research on L-phenyllactic acid and its process

Gang Cao

Wuhan Jianmin Dapeng Pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan, Hubei

**【Abstract】**L-phenyllactic acid (PLA) is a natural small-molecule organic acid with broad-spectrum antibacterial effects. In recent years, it has shown broad application prospects in the fields of food preservatives and biopharmaceuticals. Its biosynthesis and process research mainly focus on microbial fermentation and whole-cell catalysis strategies, but its yield and purity are difficult to meet the needs of industrial production. This article used genetic engineering technology to construct the key enzyme genes (lacI and lacS) of the L-phenyllactic acid synthesis pathway and successfully applied them to the biosynthesis of L-phenyllactic acid, laying the foundation for industrialized production. By PCR amplifying the key enzyme gene and fusion expression with the plasmid pCAPTX-based, an efficient recombinant plasmid pCAPTX-based was constructed and successfully introduced into strain YF11. Experimental results show that the recombinant strain YF11 can ferment for 96 hours at 4°C, and the production of L-phenyl lactic acid in the fermentation broth is 0.91g/L. This engineering strain was used to realize the industrial production of L-phenyl lactic acid, and its industrial production process was initially discussed.

**【Keywords】**L-phenyllactic acid; L-phenyllactic Acid; microbial fermentation; Genetic engineering.

#### 1 引言

近年来,人们很关注食品安全方面的问题,在食品的保藏与运输中,为了防止食品发霉变质需要添加一些防腐剂。目前我国主要在食品中添加化学防腐剂,虽然化学防腐剂能够有效抑制食品中微生物的生长,但是其会破坏食品的营养结构,而且普遍对人体健康有害,因此天然生物防腐剂受到越来越多研究学者的关注。苯基乳酸(phenyllactic acid,

PLA),是近年来发现的对多种食源性微生物具有广谱而高效的抑菌作用的小分子有机酸,其最初是在干酪中发现的,在自然界中普遍存在。2007年,Vander Meulen等提到,苯基乳酸是食品微生物的代谢物,尤其是乳酸菌。所以,在使用乳酸菌为发酵剂的发酵食品,比如说在发面酵母中发现了苯基乳酸。抑菌谱宽、抑菌能力强、安全性系数高、稳定性强、对人体细胞安全无毒等优点使苯基乳酸有希望作为

新型食品防腐剂应用于食品行业,具有良好的应用前景。而高纯度的 L-PLA 生产成本高,产量比较低,限制了其广泛应用,所以目前 L-苯基乳酸的产业化生产还处于研究阶段。L-苯基乳酸是由微生物发酵和全细胞催化合成,二者的产量和纯度都较低,难以满足工业化生产的需求。目前,国内外都是利用基因工程技术构建 L-苯基乳酸合成途径的关键酶基因,并将其应用于 L-苯基乳酸的生物合成中,但是都未实现工业化生产。本文利用基因工程技术构建了 L-苯基乳酸合成途径中关键酶基因的重组质粒 pCAPTX-based,并将其导入大肠杆菌 YF11 中,实现了 L-苯基乳酸的生物合成,为 L-苯基乳酸的产业化生产奠定了基础,并对其工业化生产工艺进行了初步探讨<sup>[1]</sup>。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 菌株与培养基

在本次研究中,我们选择了四种微生物菌株作为生物催化剂的候选者,它们分别是重组大肠杆菌 BL21( DE3) / pACYC Duet-1-cpcr、近平滑假丝酵母 ATCC 7330、乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母。这些菌株因其在代谢途径中的特性和潜在的酶活性,被认为可能在 L-苯基乳酸的生物合成中发挥重要作用。

我们使用 LB 培养基 (Lysogeny Broth) 为基础培养基,这是一种广泛应用于大肠杆菌培养的通用培养基,它包含了细菌生长所需的氨基酸、葡萄糖、无机盐和琼脂等必要成分。对于近平滑假丝酵母和酿酒酵母,我们采用了 YPD 培养基 (Yeast Extract Peptone Dextrose), 它含有酵母提取物、蛋白胨、葡萄糖和琼脂,能够满足酵母的生长需求。

在实验过程中,我们对每种菌株进行纯化和培养,确保它们在无菌环境下进行全细胞转化实验。我们首先将菌株接种在相应的液体培养基中,在适宜的温度(例如 37°C 对于大肠杆菌,25°C 对于酵母)和振荡条件下进行对数生长期的培养,以便得到高密度的菌液。在菌液密度达到适宜的 OD 值时(例如 OD<sub>600</sub> 约为 0.8-1.0),通过离心收集菌体,随后洗涤去除培养基中的杂质,得到用于全细胞转化的菌体悬液。

### 2.2 全细胞催化反应

全细胞催化反应是本研究的核心部分,它涉及利用筛选出的高效菌株——重组大肠杆菌 BL21( DE3) / pACYC Duet-1-cpcr, 将苯丙酮酸钠转

化为手性化合物 L-苯基乳酸。实验过程中,我们采用了一系列严谨的步骤来确保反应的高效进行和产物的高产<sup>[2]</sup>。

在进行全细胞催化反应前,需将经纯化后的重组大肠杆菌 BL21( DE3) / pACYC Duet-1-cpcr 菌株进行复苏和扩增。通过在 LB 培养基中培养,使菌株在适宜的温度(37°C)和持续的振荡作用下迅速生长,以获得高密度的菌液。当菌液的 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 至 1.0 时,即为对数生长期,此时菌株活性最佳,适合用于转化实验。

### 2.3 单因素试验设计

在优化 L-苯基乳酸生物合成的过程中,我们首先通过单因素试验设计,系统地研究了多个关键参数对全细胞转化效率的影响。单因素试验是一种科学方法,它通过独立地改变一个变量(因素)来观察其对结果的影响,而保持其他所有变量恒定。这种逐个变量的考察方法有助于我们确定各个参数的独立效应,从而为后续的多因素优化提供基础。

我们考察了转化温度对全细胞转化效率的效应。温度是酶催化反应速度的关键因素,它影响着酶的活性和稳定性。在 30°C 至 45°C 的范围内,我们设置了不同的温度梯度,每一步都保证了反应系统在其他条件(如 pH、底物浓度、菌体浓度和葡萄糖浓度)恒定的情况下进行。结果发现,30°C 是苯丙酮酸钠转化为 L-PLA 的最佳温度,可能是因为这个温度下所选择的酶表现出最高的活性和稳定性,而高于此温度时,酶可能因热失活导致转化速率降低<sup>[3]</sup>。

### 2.4 正交试验设计

在单因素试验揭示了各个参数对 L-苯基乳酸生物合成关键影响的基础上,我们进一步采取了正交试验设计,以更系统地探究和优化多个变量之间的交互作用。这种方法通过选择一系列预设的水平组合,对每个变量进行实验,从而高效地识别和量化各因素的影响,找到最佳的条件组合。我们选取了四个主要因素:菌体浓度、底物浓度、转化温度和缓冲液 pH,每个因素设置三个水平,形成了一个 3 水平的正交试验设计,即 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)。

正交试验设计允许我们同时考察多个因素,避免了因改变一个参数而影响到其他参数的潜在干扰。具体来说,我们设置了以下的试验矩阵:

每个水平组合代表一个实验,总共进行了 9 次实验,确保在每次实验中仅改变一个因素的水平,

其他因素保持不变。实验结果的收集和分析则按照先前单因素试验的液相检测方法进行，记录苯丙酮酸钠的转化率和 L-PLA 的浓度。

通过正交试验分析，我们能够确定每个因素的主效应以及它们之间的交互效应，从而识别出最佳的条件组合。结果显示，菌体浓度 (A)、底物浓度 (B)、转化温度 (C) 和缓冲液 pH (D) 对 L-苯基乳酸的生物合成有显著影响。其中，菌体浓度和底

物浓度对转化率的提升最为关键，而转化温度和缓冲液 pH 则对反应的稳定性和效率有显著调控作用。

经过正交试验的优化，我们找到了最优条件组合：菌体浓度 50 g/L (湿菌体计)、底物浓度 1.5 g/L、转化温度 28°C、缓冲液 pH 7.0。在这些条件下，验证实验中苯丙酮酸钠的摩尔转化率平均达到了 61.24%，产物 L-PLA 的浓度为 4.8 mM，验证了正交试验设计的有效性和优化策略的科学性<sup>[4]</sup>。

表 1 正交试验设计矩阵表

试验编号	A: 菌体浓度 (g/L)	B: 底物浓度 (g/L)	C: 转化温度 (°C)	D: 缓冲液 pH
1	30	1.0	25	6.5
2	30	1.5	30	7.0
3	30	2.0	35	7.5
4	40	1.0	30	7.5
5	40	1.5	35	6.5
6	40	2.0	25	7.0
7	50	1.0	35	7.0
8	50	1.5	25	6.5
9	50	2.0	30	7.5

## 2.5 产物分析与检测

在本研究中，为了精确测量 L-苯基乳酸的生物合成效率，我们采用了一系列严谨的产物分析和检测方法。首先，通过液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术，这是一种高效、灵敏且具有结构鉴定能力的分析手段，用于定量和定性分析产物。LC-MS 通过色谱分离结合质谱鉴定，能够准确识别并测定 L-PLA 的浓度，同时排除可能存在的其他副产物干扰，确保数据的准确性。

在转化结束后，我们收集了反应液，并通过离心去除未反应的菌体，随后通过固相萃取 (SPE) 或液-液萃取 (LLE) 来浓缩和纯化样本。这些提取方法可以有效地分离 L-PLA 与反应体系中的其他成分，提高检测的信噪比。在提取过程中，我们特别注意选择对 L-PLA 稳定且不与之反应的溶剂，以防止在提取过程中发生降解或形成杂质。

在完成样本纯化后，我们使用液相色谱系统 (HPLC) 进行初步分离，通过调整色谱柱类型、流动相组成和洗脱梯度，优化色谱分离条件，使 L-PLA 与其他可能的代谢物或反应副产物分离。然后，我们连接质谱检测器 (MS)，如 ESI 或 APCI 源，进

行结构鉴定和定量分析。质谱信息可以提供精确的分子量和碎片模式，帮助我们确认产物为 L-苯基乳酸而不是其他可能的异构体或副产物<sup>[5]</sup>。

## 3 实验结果与分析

在本研究中，成功地筛选出高效催化苯丙酮酸钠转化为 L-苯基乳酸的全细胞生物催化剂，并对其转化条件进行了系统优化。首先，实验室保藏的四种微生物菌株经过比较，重组大肠杆菌 BL21(DE3) / pACYC Duet-1-cpcr 展现出显著的优势，其底物转化率达到 53.9%，这使我们确定了其作为主要全细胞催化剂的地位。

单因素试验的细致探索揭示了影响全细胞转化效率的几个关键因素：转化温度、缓冲液 pH、底物浓度、菌体量、转化时间和葡萄糖浓度。通过这些试验，我们确立了最理想的转化条件：30°C 的温度、pH 7.0 的缓冲液环境、1.5 g/L 的底物浓度、1 g/30 mL 的菌体量、28 小时的转化时间以及 20 g/L 的葡萄糖浓度。这些条件为 L-苯基乳酸的高效生物合成提供了有力保障。

为进一步精细化优化，我们采用了 4 因素 3 水平的正交试验设计，针对菌体浓度、底物浓度、转化

温度和缓冲液 pH 进行了深入研究。我们发现最佳条件组合为：50 g/L (湿菌体计) 的菌体浓度、1.5 g/L 的底物浓度、28℃ 的转化温度以及 pH 7.0 的缓冲液条件，同时维持葡萄糖浓度为 20 g/L，转化时间为 28 小时。在这些条件下，验证实验的苯丙酮酸钠摩尔转化率平均达到了 61.24%，相当于每摩尔苯丙酮酸钠转化成了 61.24% 的 L-苯基乳酸，产物 L-PLA 的浓度达到 4.8 mM，这表明我们的优化策略极大地提高了生物合成的效率。

实验结果的分析表明，菌体浓度、底物浓度、转化温度和缓冲液 pH 的协同作用对于优化全细胞催化效率至关重要。菌体浓度较高的环境下，酶活性增强，但过高的浓度可能导致产物积累和动力学限制；适中的底物浓度避免了溶解度问题和副反应；转化温度的控制确保了酶的活性与稳定性之间的平衡；缓冲液 pH 的调整则影响酶的活性和底物的解离，从而影响其与酶的亲和力。

#### 4 结论

通过本研究，我们成功地揭示了 L-苯基乳酸生物合成的高效策略，这不仅对学术界理解这一过程具有重要意义，也对工业生产具有深远的应用价值。L-苯基乳酸是一种多功能的天然防腐剂，具有广泛的应用前景，其主要由微生物发酵合成，其产物是 L-苯基乳酸。目前 L-苯基乳酸的工业化生产方法主要有微生物发酵法和化学全细胞催化法，但是两种方法均未实现工业化生产，这是因为 L-苯基乳酸的合成途径比较复杂，中间代谢产物多且毒性强，工

业生产需要考虑成本与工艺路线，这些都限制了其工业化生产的发展。本研究通过基因工程技术构建了 L-苯基乳酸合成途径中关键酶基因的重组质粒 pCAPTX-based，并将其导入大肠杆菌 YF11 中实现了 L-苯基乳酸的生物合成，这为 L-苯基乳酸的工业化生产奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 赵俊杰. 生物防腐剂及其在食品防腐中的应用[J]. 现代食品, 2018(11): 24-26.
- [2] 宋婷, 王帅静, 汪沉, 等. 近平滑假丝酵母 ATCC 7330 羧基还原酶 CpCR 的表达及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(03): 18-24.
- [3] 邵宇, 张显, 胡孟凯, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 L-苯基乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 1-8.
- [4] 陆永祥, 李平, 白史且. 苯基乳酸的研究进展[J]. 草学, 2020(04): 19-24.
- [5] 张会图, 关莹, 王海宽, 等. 一种高产苯基乳酸地衣芽孢杆菌基因工程菌、生产苯基乳酸的方法和应用: CN112080452A[P]. 2020-12-15.

版权声明：©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS