

研究报告

定点饱和突变提高 *Lactobacillus casei* L-乳酸脱氢酶对
苯丙酮酸的催化效率李雪晴¹ 刘艳¹ 袁凤娇¹ 李剑芳¹ 郭敏辰^{2*}

(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)

摘要:【背景】光学纯 L-苯乳酸是一种天然防腐剂,也是一种高附加值的手性分子,在食品、制药和材料等领域有广阔的应用前景。本实验室已发现来源于 *Lactobacillus casei* CICIM B1192 的 NADH 依赖型 L-乳酸脱氢酶(L-LcLDH)可不对称还原苯丙酮酸制备 L-苯乳酸,但其活性较低。为提高 L-LcLDH 催化苯丙酮酸的催化效率,构建了一个单突变体 L-LcLDH^{Q88R},其催化效率 k_{cat}/K_m 是 L-LcLDH 的 4.9 倍。【目的】为进一步提高 L-LcLDH^{Q88R} 催化苯丙酮酸的催化效率,采用饱和突变技术将位于 L-LcLDH^{Q88R} 底物结合口袋附近的氨基酸残基 Ile²²⁹ 随机替换为其他氨基酸,以获得活性更高的优良突变体。【方法】以重组表达质粒 pET-22b-Lcldh^{Q88R} 为模板,采用全质粒 PCR 技术对 L-LcLDH^{Q88R} 基因(Lcldh^{Q88R})中编码 Ile²²⁹ 的密码子实施饱和突变,构建突变转化子文库。以催化苯丙酮酸的活性为指标,从文库中筛选出优良的突变转化子。【结果】突变转化子(*Escherichia coli*/Lcldh^{Q88R/I229Q})表达出一种由 Arg 和 Gln 分别替换了 Gln⁸⁸ 和 Ile²²⁹ 的双突变体 L-LcLDH^{Q88R/I229Q}。重组表达产物 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的酶学性质分析表明:L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的比活性是 L-LcLDH 的 18.5 倍,是 L-LcLDH^{Q88R} 的 2.3 倍;其催化效率分别为后两者的 6.8 倍和 1.4 倍。L-LcLDH 突变前后的温度和 pH 特性改变不大。根据分子对接结果推测出,双突变 Q88R/I229Q 导致 L-LcLDH 的底物结合口袋的入口变大和构型的变化可能对其催化活性的提高发挥了重要作用。【结论】双突变 Q88R/I229Q 显著提高了 L-LcLDH 的活性和催化效率,使得 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 在不对称还原苯丙酮酸制备 L-苯乳酸中成为有潜力的工具酶。

关键词: *Lactobacillus casei*, L-乳酸脱氢酶,定点饱和突变,苯丙酮酸,催化效率

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21676117)

***Corresponding author:** E-mail: biowmc@126.com

Received: September 28, 2017; **Accepted:** December 15, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 15, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(21676117)

***通信作者:** E-mail: biowmc@126.com

收稿日期: 2017-09-28; 接受日期: 2017-12-15; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-01-15

Improving catalytic efficiency of an *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase for phenylpyruvic acid production by site-saturated mutagenesis

LI Xue-Qing¹ LIU Yan¹ YUAN Feng-Jiao¹ LI Jian-Fang¹ WU Min-Chen^{2*}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Background] Optically pure L-phenyllactic acid (L-PLA) is a natural antimicrobial agent and also a highly value-added chiral compound with potential applications in food, pharmaceutical and biomaterial areas. Although L-PLA can be produced by asymmetric reduction of phenylpyruvic acid (PPA) by L-LcLDH, an L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* CICIM B1192, it displays low activity. To improve the activity of a wild-type L-LcLDH towards PPA, an L-LcLDH mutant, L-LcLDH^{Q88R}, was successfully constructed by our lab. Its catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was 4.9-fold higher than that of L-LcLDH. [Objective] To further improve the catalytic efficiency of L-LcLDH^{Q88R} towards PPA, the amino acid Ile²²⁹ located in the substrate-binding pocket of L-LcLDH^{Q88R} or L-LcLDH was randomly substituted with any one of 20 amino acids. [Methods] Using a recombinant plasmid pET-22b-Lcldh^{Q88R} as the template, the Ile²²⁹-encoding codon in Lcldh^{Q88R} was subjected to site-saturated mutagenesis by whole-plasmid PCR technique. Then, the mutant library of L-LcLDH^{Q88R} was constructed by transforming pET-22b-Lcldh^{Q88R} variants into *E. coli* BL21(DE3), respectively. Finally, an *E. coli* transformant expressing the highest activity towards PPA was screened from this library. [Results] The selected transformant, *E. coli*/Lcldh^{Q88R/I229Q}, contains a double-mutant gene in which the Gln⁸⁸- and Ile²²⁹-encoding codons in Lcldh was substituted with Arg- and Gln-encoding ones, respectively. The specific activity of purified L-LcLDH^{Q88R/I229Q} towards PPA was 18.5- and 2.3-fold those of L-LcLDH and L-LcLDH^{Q88R}, while its catalytic efficiency was 6.8- and 1.4-folds those of the latter two, respectively. Additionally, the pH and temperature properties of L-LcLDH^{Q88R/I229Q} did not obviously changes compared to L-LcLDH. The analysis of catalytic mechanism by molecular docking (MD) simulation showed that the double-mutation of Q88R/I229Q enlarges the inlet of substrate-binding pocket and alters the steric structure of active centre, which may contribute to the increase of activity. [Conclusion] The double-mutation of Q88R/I229Q in L-LcLDH primary structure greatly enhanced its specific activity and catalytic efficiency, making L-LcLDH^{Q88R/I229Q} a promising candidate for asymmetric reduction of PPA.

Keywords: *Lactobacillus casei*, L-Lactate dehydrogenase, Site-saturated mutagenesis, Phenylpyruvic acid, Catalytic efficiency

NADH 依赖型 L-乳酸脱氢酶 (L-Lactate dehydrogenase, L-LDH) 能够不对称还原 α -酮酸生成手性 α -羟基酸, 其广泛应用于生物制药、材料和食品等行业^[1]。例如 L-苯乳酸 (L-Phenyllactic acid) 可由 L-LDH 不对称还原苯丙酮酸 (Phenylpyruvic acid, PPA) 催化生成, 是一种天然抑菌剂, 也是一种合成多种药物的前体物质, 还可经聚合反应合成聚苯乳酸新型高分子材料, 作为聚乳酸高分子的替

代物^[2-4]。

一些化学和生物方法可用于合成手性 α -羟基酸, 但与化学法相比, 生物酶法由于其条件温和、环境友好、生成产物纯度高等优点, 已成为主要合成方法。但现已发现的大多数野生型 L/D-LDH 对带有长脂肪链或芳香基团侧链的底物 (苯甲酰甲酸、PPA、草酰乙酸等) 表现出较低的活性, 在一定程度上限制了 L/D-LDH 的广泛应用^[5-6]。随着人们对

L/D-LDH 的结构、功能和作用机理的认识不断深入,采用基因工程技术改造酶分子以获得具有优良酶学性质 L/D-LDH 的研究得到了迅速发展。Jiang 等^[7]采用定点突变方法将 *Pseudomonas stutzeri* SDM L-LDH 中的 Val¹⁰⁸ 替换为 Ala,获得一个新突变酶,该突变酶对 L-扁桃酸的催化效率($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$)较野生型酶提高了 50.1 倍。Zheng 等^[6]在 *L. bulgaricus* ATCC 11842 D-LDH 的基础上,将其 52 位点的 Tyr 突变为 Leu,使得突变酶对 PPA 的活性显著提高。Aslan 等^[5]对 *Geobacillus stearothermophilus* 的 L-LDH (*Bs*LDH)实施了定点饱和突变,从突变文库中获得了一个活性明显高于 *Bs*LDH 的优良突变体 1G7 (D101Y102)。

我们实验室从 *L. casei* CICIM B1192 基因组中克隆了一种 NADH 依赖型 L-LDH (*L-Lc*LDH)基因 *Lcldh*, 并成功将其在 *E. coli* 中实施了表达。*L-Lc*LDH 对小分子的丙酮酸表现出高活性,但对大分子的 PPA 表现出较低的活性。为了提高 *L-Lc*LDH 催化 PPA 的活性,我们构建了一个单点突变体 *L-Lc*LDH^{Q88R},该突变体的催化效率是 *L-Lc*LDH 的 4.9 倍。为继续提高该酶催化 PPA 的活性,本研究基于三维结构的同源建模和分子对接结果,将位于 *L-Lc*LDH^{Q88R} 底物结合口袋的 Ile²²⁹ 随机替换为其他氨基酸。以 pET-22b-*Lcldh*^{Q88R} 为对象,对 *Lcldh*^{Q88R} 中编码 Ile²²⁹ 的密码子实施饱和突变,构建突变转化子文库,并从中筛选表达最高活性的 L-LDH 的突变转化子。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

E. coli BL21(DE3)和表达质粒 pET-22b(+)购自 Novagen 公司;重组表达质粒 pET-22b-*Lcldh*^{Q88R} 和 *E. coli* 转化子 *E. coli*/*Lcldh*^{Q88R} 和 *E. coli*/*Lcldh* 由本实验室构建和保藏。LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2。LB 固体培养基添加 18 g/L 的琼脂粉, LB 抗性培养基添加终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄霉素。

1.2 主要试剂和仪器

PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Dpn* I、DNA Marker 和蛋白质 Marker, 大连 TaKaRa 公司; IPTG、胰蛋白胨和酵母提取物, 上海 Sangon 公司; PPA, 美国 Sigma 公司; NADH, 上海百灵威公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

全温摇瓶柜, 江苏太仓实验设备厂; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Ni-NAT 亲和层析柱, 北京 Tiandz 公司; 酶标仪, 美国 BioTeck 公司。

1.3 方法

1.3.1 *L-Lc*LDH 及其突变体的同源建模与分子对接

选择与 *L-Lc*LDH 一级结构(MF582630)相似性高,来源于 *L. casei* 的 L-LDH 晶体结构(PDB :1LLC)为模板,运用 Modeller 9.11 程序(<http://salilab.org/modeller/>)进行三维结构的同源建模及优化。使用 ChemDraw Ultra 12.0 构建 PPA 的三维结构,并经 Chem3D Ultra 12.0 模块的 MMFF94 分子力学对其进行能量最小化。在 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)网站获取 NADH 三维结构,并进行能量最小化。以模拟后的 *L-Lc*LDH 及突变体的三维结构为受体,运用 AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu>)程序,将 PPA 和 NADH 分别对接至酶活性中心的合适位置。采用 PyMOL (<http://pymol.org/>)分析 *L-Lc*LDH 及突变体的三维结构。

1.3.2 引物设计

基于 *L-Lc*LDH 的一级结构和三维结构的分析,拟在 *L-Lc*LDH^{Q88R} 的 Ile²²⁹ 位点进行定点饱和突变。依据 *Lcldh* (MF582630)和 *Lcldh*^{Q88R} 的核苷酸序列设计 PCR 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

1.3.3 突变转化子文库的构建和筛选

以 pET-22b-*Lcldh*^{Q88R} 为模板、I229X-F 和 T₇-R 为引物,采用全质粒 PCR (Whole-plasmid PCR)技术^[8]对 Ile²²⁹ 密码子实施饱和突变。将 pET-22b-*Lcldh*^{Q88R} 突变体用 *Dpn* I 消化后转化 *E. coli*

表 1 *Lcldh*^{Q88R} 定点饱和突变的 PCR 引物Table 1 PCR primers for the site-saturated mutagenesis of *Lcldh*^{Q88R}

名称 Primer name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	长度 Length (bp)
I229X-F	GCCGCTTATGAAATC <u>NNK</u> AAACTCAAGGGT	30
T ₇ -R	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20

注：F：正向引物；R：反向引物。突变位点密码子以下划线显示；引物中的字母代表不同的核苷酸；N：A/T/C/G；K：G/T。

Note: F: Forward primer; R: Reverse primer. Modified codons are shown in underline; Letters in primers represent different nucleotide; N: A/T/C/G; K: G/T.

BL21(DE3)，构建突变转化子文库。从文库中挑选 97 个转化子(*E. coli/Lcldh*^{Q88R/I229X}，X 代表任意氨基酸)接种于 1 mL LB 抗性培养基中，37 °C、220 r/min 培养 12 h，以 2% (体积比)接种量转接至 1 mL 相同培养基，培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.6–0.8 时，加入 0.4 mmol/L IPTG、20 °C 诱导表达 8 h，4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L、pH 7.0)悬浮清洗菌体 2 次，加入 1 mg/mL 溶菌酶溶液 100 μL 后，反复冻融破碎细胞，4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收集上清液，即为粗酶液。

各取 30 μL 粗酶液于 190 μL 预混液(包括 pH 5.5 的 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液，0.2 mmol/L NADH，5 mmol/L PPA)中，35 °C 反应 3 min，使用酶标仪每隔 30 s 连续测定 340 nm 处的吸光值。以催化 PPA 的活性为指标，筛选出活性高于 *L-LcLDH*^{Q88R} 的转化子，并对其进行 DNA 测序，确定优良突变转化子。

1.3.4 L-LDH 的纯化

分别挑取 *E. coli/Lcldh*、*E. coli/Lcldh*^{Q88R} 和优良突变转化子单菌落接种于 2 mL 含 100 μg/mL 氨苄霉素的 LB 培养基中，37 °C、220 r/min 培养过夜。以 2% (体积比)的接种量转接于新鲜的 100 mL LB 培养基中，37 °C 培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.6–0.8 时，加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 溶液，20 °C 诱导 8 h。8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，经 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次后，加入适当破碎液(50 mmol/L pH 7.0 的 Tris-HCl，25 mmol/L NaCl)重悬菌体，冰浴条件下超声波破碎细胞，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液，经 0.22 μm 滤膜过滤，取

上清液加样至 Ni-NAT 亲和层析柱以纯化目的蛋白。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物。采用 Bradford 法^[9]测定蛋白质含量。

1.3.5 L-LDH 活性的测定

总反应体系包括 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH 5.5)，0.2 mmol/L NADH，5 mmol/L PPA，对照组中不含 NADH，其他成分相同。混匀后于 35 °C 保温 5 min，加入适量的酶液。检测 NADH 在 340 nm 处吸收值的变化。酶活性单位(U)定义为：在上述条件下，每分钟催化氧化 1 μmol NADH 所需要的酶量。比活性定义为每毫克酶蛋白所含的酶活单位数(U/mg)。

1.3.6 L-LDH 酶学性质的分析

(1) 温度对酶活性的影响：在不同温度(25–75 °C)下，按 1.3.5 的方法测定 L-LDH 活性。最适温度定义为最高酶活性(相对酶活性 100%)所对应的温度。将酶液在 25–65 °C 下处理 1 h，按 1.3.5 的方法测定残余 L-LDH 活性，未经处理酶液的酶活性以 100% 计。温度稳定性定义为残余酶活性大于 85% 所对应的温度。

(2) pH 对酶活性的影响：用 pH 3.0–7.5 的缓冲液配制 PPA 溶液，按 1.3.5 的方法测定 L-LDH 酶活性。最适 pH 定义为最高酶活性所对应的 pH 值。将酶液在 pH 3.5–7.5、35 °C 下处理 1 h，按 1.3.5 的方法测定残余 L-LDH 酶活性。pH 稳定性定义为残余酶活性在 85% 以上所对应的 pH 范围。

1.3.7 L-LDH 催化效率的分析

以不同浓度(1.0–10.0 mmol/L)的 PPA 溶液(用 pH 5.5 的 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液配制)为底物，固

定 NADH 的浓度,按 1.3.5 方法测定酶活性,采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算酶的动力学常数 k_{cat} 和 K_{m} 及催化效率 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选定

前期为提高 L-LcLDH 催化 PPA 的活性,将 L-LcLDH 中位于底物结合口袋入口处的氨基酸 Gln⁸⁸ 突变成 Arg,使得底物结合口袋入口处变大,便于底物、NADH 和产物的进出,实验结果分析表明突变酶 L-LcLDH^{Q88R} 的催化效率较 L-LcLDH 有了显著的提高。按照 1.3.1 方法,将 PPA 和 NADH 对接到 L-LcLDH 后,分析分子对接结果发现,在 L-LcLDH 的三维结构中,另一个关键氨基酸 Ile²²⁹ 与底物 PPA 的苯环侧链距离较近,占据了底物口袋的空间(图 1),可能会影响该酶催化大分子底物的活性。前期 Binay 等^[10]将 BsLDH (与 L-LcLDH 相似性为 51%)中的 Ile²⁴⁰ (对应于 L-LcLDH 的 Ile²²⁹)和 Thr²⁴⁶ 分别突变为 Ala 和 Gly,扩大了底物结合口袋的空间,使得突变酶 T246G/I240A 催化 L-扁桃酸的活性明显提高。PPA 与 L-扁桃酸的分子结构相似,均具有芳香族侧链。因此,为继续提高 L-LcLDH 对 PPA 的催化效率,拟在突变酶 L-LcLDH^{Q88R} 的基础上尝试在 Ile²²⁹ 位点随机替换为其他氨基酸,以期筛选出对 PPA 表现出更高活性的 L-LDH。

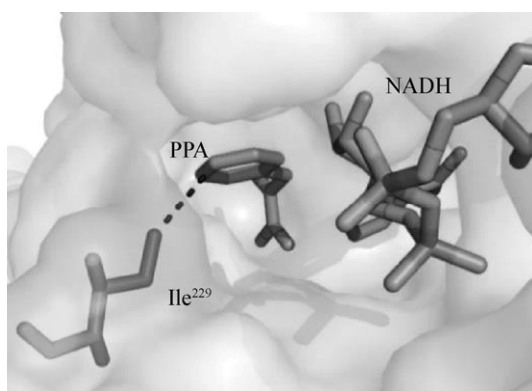


图 1 L-LcLDH 底物结合口袋处突变位点的选择

Figure 1 Design mutant in the substrate-binding pocket of L-LcLDH

2.2 突变文库的筛选

按照 1.3.3 方法,将 *E. coli/Lcldh*^{Q88R} 和 97 个 *E. coli/Lcldh*^{Q88R/I229X} 所表达的 L-LDH 在 35 °C 保温 5 min,测定酶活性。结果显示,有 11 个转化子表达的 L-LDH 酶活性高于 L-LcLDH^{Q88R},选出前 4 个表达较高酶活性的 L-LDH 转化子,DNA 测序结果表明,这 4 个转化子分别表达 L-LcLDH^{Q88R/I229Q}、L-LcLDH^{Q88R/I229N}、L-LcLDH^{Q88R/I229S} 和 L-LcLDH^{Q88R/I229T}。这 4 个转化子按 1.3.4 方法重新诱导表达、超声波破碎和 Ni 柱纯化后,测得这 4 种 L-LDH 的比活性分别为 1 503.8、1 204.6、778.8 和 921 U/mg,确定了一个优良突变转化子命名为 *E. coli/Lcldh*^{Q88R/I229Q}。

2.3 L-LDH 的表达和纯化

3 个转化子 *E. coli/Lcldh*、*E. coli/Lcldh*^{Q88R} 和 *E. coli/Lcldh*^{Q88R/I229Q} 经 IPTG 诱导表达和超声波破碎细胞后,上清液采用 Ni-NAT 柱纯化目的蛋白。SDS-PAGE 分析显示(图 2),纯化后的 L-LcLDH、L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 均在相对分子质量约 38.8 kD 处呈现单一条带。其中 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 对 PPA 的比活性为 1 503.8 U/mg,是 L-LcLDH^{Q88R} (651.2 U/mg)的 2.3 倍,是 L-LcLDH (81.3 U/mg)的 18.5 倍。

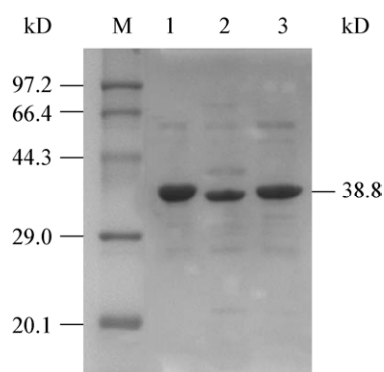


图 2 纯化后 L-LDH 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purified L-LDH

注:M:标准分子量 Marker;1:L-LcLDH;2:L-LcLDH^{Q88R};3:L-LcLDH^{Q88R/I229Q}。

Note: M: Protein marker; 1: L-LcLDH; 2: L-LcLDH^{Q88R}; 3: L-LcLDH^{Q88R/I229Q}。

2.4 L-LDH 的酶学性质分析

按照 1.3.6 方法分析了温度和 pH 对 L-LcLDH 和 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 酶活性的影响, L-LcLDH 和 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的最适温度为 40 °C, 在 40 °C 以下残余酶活性均大于 85%, 最适 pH 为 5.0, 在酸性环境中较稳定(图略)。测定结果表明, L-LcLDH 突变前后的温度和 pH 特性改变不大。

2.5 L-LDH 的催化特性分析

按照 1.3.7 方法测定了 L-LcLDH、L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的动力学常数 k_{cat} 和 K_m 值(表 2)。分析结果表明, 与野生型 L-LcLDH 相比, 双突变体 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 催化 PPA 还原的动力学常数发生了不同程度的变化, 但其催化效率 k_{cat}/K_m 明显高于 L-LcLDH, 分别是 L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH 的 1.4 倍和 6.8 倍。另外 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的催化效率明显高于 BsLDH [17.3 L/(mmol·s)] 及其突变酶 Pro101Arg102/RSGG [63 L/(mmol·s)]^[11]。因此, 在 L-LcLDH^{Q88R} 基础上, 将 Ile²²⁹ 替换成 Gln 进一步提高了 L-LcLDH^{Q88R} 的催化效率。

2.6 L-LDH 三维结构的分析

按照 1.3.1 方法进行了 L-LcLDH 及其突变体的

三维结构模拟和分子对接, 考察了 L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 突变酶氨基酸残基引入对底物结合口袋构型、底物结合构象的影响。比较图 3A、B 可看出 Gln⁸⁸ 替换为 Arg, 底物 PPA 和 NADH 的构象均未发生明显改变, 仅改变了底物结合口袋入口的构型, 使其入口变大; 比较图 3B、C 可看出, Ile²²⁹ 替换为 Gln 后迫使底物 PPA 和 NADH 分子的结合构象发生了明显的变化, 而且改变了底物结合口袋的构型。实验结果表明 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的 k_{cat} 值均高于 L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH, 但 K_m 值较 L-LcLDH 略有升高。因此可推测出 Gln⁸⁸ 替换为 Arg 后, 使得底物、NADH 和产物更容易进出底物结合口袋, 而 Ile²²⁹ 替换为 Gln 后, 侧链变大, 占据了一定空间, 使得底物结合口袋的构型和底物构象发生有利变化, 利于产物的释放, 因此, 双突变 Q88R/I229Q 显著提高了 L-LcLDH 的催化效率。

3 讨论与结论

酶的底物结合口袋及口袋入口的构型决定了底物分子接近催化活性中心的难易程度^[12-14]。通常认为, 较为开阔的底物结合口袋有利于底物和产物的出入。因此, 众多学者常将位于底物结合口袋附近的大侧链氨基酸残基突变为小侧链氨基酸, 减少空间位阻, 增大底物结合口袋的空间。如 Zhu 等^[15] 将 *Lactobacillus pentosus* 的 D-LDH 中的 Tyr⁵² 突变为 Val。Wang 等^[16] 将 *Sporolactobacillus inulinus* CASD 的 DLDH744 中的 Met³⁰⁷ 变为 Leu, 均增大

表 2 3 种 L-LDH 的动力学常数

Table 2 The kinetic parameters of three L-LDHs

L-LDHs	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mmol/L)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	Folds
L-LcLDH	94.7±4.5	8.23±0.30	11.5	1.0
L-LcLDH ^{Q88R}	380.4±10.1	6.82±0.10	55.8	4.9
L-LcLDH ^{Q88R/I229Q}	760.0±23.0	9.71±0.40	78.3	6.8

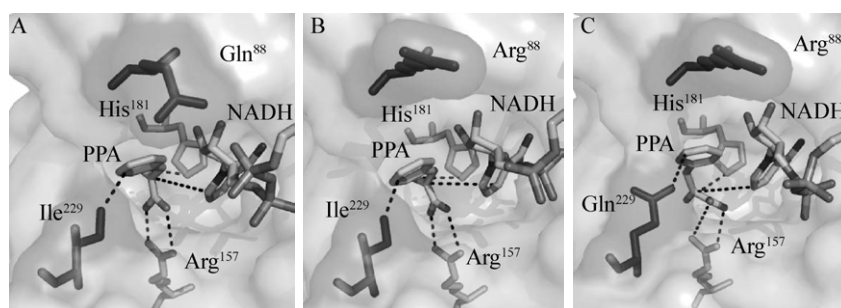


图 3 底物 PPA 和 NADH 在 L-LcLDH 及其突变体活性位点中结合构象的比较

Figure 3 Comparison of docking the PPA and NADH in the active sites of L-LcLDH and its mutants

Note: A: L-LcLDH; B: L-LcLDH^{Q88R}; C: L-LcLDH^{Q88R/I229Q}.

了底物结合口袋的空间,显著提高了催化 PPA 的活性。本研究基于 L-LcLDH 三维结构的同源建模和分子对接结果,发现 Ile²²⁹ 位于底物结合口袋处,占据了底物结合口袋的空间,可能会影响酶的催化活性。因此,在 L-LcLDH^{Q88R} 氨基酸序列的基础上,在 229 位点处实施了定点饱和突变,筛选到催化活性明显高于 L-LcLDH^{Q88R} 和 L-LcLDH 的突变酶 L-LcLDH^{Q88R/I229Q}。分析 L-LcLDH^{Q88R/I229Q} 的三维结构和分子对接结果表明,当 229 位点上的小侧链氨基酸 Ile 被 Gln 取代后,使得底物口袋的构型和底物构象发生了有利变化,有利于 L-LcLDH^{Q88R} 催化效率的提高。李爱朋^[17] 利用定点突变获得 *E. brevis* ZJUY-1401 羧基还原酶(BbSDR8)的突变体 G94A,该突变酶的催化活性明显高于野生型 BbSDR8。根据分子对接结果推测,Gly⁹⁴ 被 Ala 替换后导致了底物结合口袋空间位阻的增加,对 BbSDR8 突变体活性的提高产生了重要作用。由此,可推测出适当增加底物结合口袋的空间位阻有可能巩固和稳定底物与酶的结合模式,从而提高酶的催化活性,进一步表明了底物结合口袋空间位阻的增加或减少均有可能对酶的催化活性产生促进作用。

本研究在 2 个关键氨基酸位点(Gln⁸⁸ 和 Ile²²⁹)基础上,首次通过定点突变和饱和突变获得了具有较野生型酶催化效率更加优良的双突变体 L-LcLDH^{Q88R/I229Q},使其在不对称还原 PPA 合成光学纯 L-苯乳酸中具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] 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]. Journal of Biotechnology, 2015, 207: 47-51
- [2] Wang JP, Lee JH, Yoo JS, et al. Effects of phenyllactic acid on growth performance, intestinal microbiota, relative organ weight, blood characteristics, and meat quality of broiler chicks[J]. Poultry Science, 2010, 89(7): 1549-1555
- [3] Zheng ZJ, Ma CQ, Gao C, et al. Efficient conversion of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by using whole cells of *Bacillus coagulans* SDM[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19030
- [4] 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]. Journal of Biotechnology, 2016, 222: 29-37
- [5] Aslan AS, Birmingham WR, Karagüler NG, et al. Semi-rational design of *Geobacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase to access various chiral α -hydroxy acids[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 179(3): 474-484
- [6] Zheng ZJ, Sheng BB, Gao C, et al. Highly stereoselective biosynthesis of (R)- α -hydroxy carboxylic acids through rationally re-designed mutation of D-lactate dehydrogenase[J]. Science Reports, 2013, 3: 3401
- [7] Jiang TY, Gao C, Dou PP, et al. Rationally re-designed mutation of NAD-independent L-lactate dehydrogenase: high optical resolution of racemic mandelic acid by the engineered *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 151
- [8] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 891-903
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [10] Binay B, Sessions RB, Karagüler NG. A double mutant of highly purified *Geobacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase recognises L-mandelic acid as a substrate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(6/7): 393-399
- [11] El Hawrani AS, Sessions RB, Moreton KM, et al. Guided evolution of enzymes with new substrate specificities[J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 264(1): 97-110
- [12] Luo X, Wang YJ, Shen W, et al. Activity improvement of a *Kluyveromyces lactis* Aldo-keto reductase KIAKR via rational design[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 224: 20-26
- [13] He XJ, Chen SY, Wu JP, et al. Highly efficient enzymatic synthesis of tert-butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate with a mutant alcohol dehydrogenase of *Lactobacillus kefir*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(21): 8963-8975
- [14] Huang L, Ma HM, Yu HL, et al. Altering the substrate specificity of reductase CgKR1 from *Candida glabrata* by protein engineering for bioreduction of aromatic α -keto esters[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2014, 356(9): 1943-1948
- [15] Zhu YB, Hu FG, Zhu YY, et al. Enhancement of phenyllactic acid biosynthesis by recognition site replacement of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus pentosus*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(6): 1233-1241
- [16] 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[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(17): 7471-7478
- [17] Li AP. Discovery and engineering of carbonyl reductases[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)

李爱朋. 羧基还原酶的挖掘和改造[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016