

柠檬明串珠菌 KM20 中 *D*-乳酸脱氢酶的特性

Characterization of *D*-lactate dehydrogenase in *Leuconostoc citreum* KM20

文字萍¹ 刘金熙¹ 金 清¹ 崔虎山²

WEN Yuping¹ LIU Jinxi¹ JIN Qing¹ CUI Hushan²

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学附属医院西区医院, 吉林 延吉 133002)

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China; 2. College of Affiliated Hospital Western District Hospital, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

摘要:目的: 分析柠檬明串珠菌中 *D*-乳酸脱氢酶(*D*-LDH)的酶学特性。方法: 对柠檬明串珠菌 KM20 中 *D*-乳酸脱氢酶基因进行克隆表达并构建表达质粒, 转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中实现过表达。结果: 经 Ni-NTA 柱亲和层析纯化后, *D*-LDH-1 与 *D*-LDH-2 编码的蛋白分子质量分别为 40.0、38.5 kDa; 比活力分别为 2.18、153.10 U/mg; 在丙酮酸还原中两种酶的最适 pH 值与最适温度均为 8.0 与 40 °C; 而乳酸氧化时 *D*-LDH-2 的最适 pH 值与最适温度分别为 12.0 与 30 °C。*D*-LDH-1 与 *D*-LDH-2 对草酰乙酸、苯丙酮酸和 2-酮戊二酸具有较强的催化能力, 且 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Na^{+} 对其酶活性均具有促进作用, Zn^{2+} 与 SDS 对酶活性有极高的抑制作用。此外, 两种酶对丙酮酸的 K_m 值分别为 2.98、6.11 mmol/L, 对丙酮酸的 K_{cat}/K_m 分别为 6.04×10^2 、 2.28×10^4 L/(mol · s), LDH-2 对 *D*-乳酸的 K_{cat}/K_m 为 65.0 L/(mol · s)。结论: *D*-LDH-1 与 *D*-LDH-2 为柠檬明串珠菌中催化 *D*-乳酸合成的关键酶。

关键词: 基因工程; *D*-乳酸; *D*-乳酸脱氢酶; 柠檬明串珠菌

Abstract: Objective: This study focused on investigating the enzymatic characteristics of *D*-lactate dehydrogenase (*D*-LDH) in *Leuconostoc citreum* KM20. Methods: The *D*-lactate dehydrogenase gene (LDH) from *L. citreum* KM20 was cloned and expressed to construct expression plasmid, and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for overexpression. Results: The enzymes encoded by LCK_00027

and LCK_00222 were purified by Ni-NTA column affinity chromatography with molecular mass of 40.0 kDa and 38.5 kDa, respectively. The specific activities were 2.18 U/mg and 153.10 U/mg, respectively. The optimal pH and temperature for pyruvate reduction were 8.0 and 40 °C, respectively, while for the LCK_00222 encoding enzyme lactic acid oxidation the values were 12.0 and 30 °C, respectively. The two enzymes had high activities toward oxaloacetic acid, sodium phenylpyruvate, and 2-oxoglutaric acid. Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Na^{+} promoted the activity of the two enzymes, whereas Zn^{2+} and SDS inhibited. In addition, the K_{cat}/K_m of LCK_00027 and LCK_00222 to pyruvate were 6.04×10^2 L/(mol · s) and 2.28×10^4 L/(mol · s), respectively. The K_{cat}/K_m of LCK_00222 encoding enzyme to *D*-lactic acid was 65.0 L/(mol · s). Conclusion: *D*-LDH-1 and *D*-LDH-2 are key enzymes catalyzing the synthesis of *D*-lactic acid in *Leuconostoc citreum*.

Keywords: gene engineering; *D*-lactic; *D*-lactate dehydrogenase; *Leuconostoc citreum*

柠檬明串珠菌(*Leuconostoc citreum*)是异型发酵乳酸菌的一种, 因其非病原性、对人体无害被列为 GRAS (generally recognized as safe), 主要存在于蔬菜、牛乳、水果、传统发酵泡菜、乳制品等食品中^[1-2]。柠檬明串珠菌能通过代谢产生 CO_2 、风味化合物、特殊活性物质、细菌素及其他抑菌成分, 具有潜在的益生效果, 可作为食品发酵剂广泛应用于发酵食品中从而改善其风味、功能性、组织状态与贮存期, 或作为生产功能性物质的细胞工厂, 直接应用于食品工业与医药保健等领域^[2]。

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是乳酸菌催化丙酮酸产生乳酸的关键酶, 根据催化产物不同, 可将其分为 *D*-乳酸脱氢酶(*D*-LDH)与 *L*-乳酸脱氢酶(*L*-LDH)两种, 并分别催化丙酮酸生成互为镜像的 *D*-乳酸与 *L*-乳酸^[3]。乳酸的合成构型由 *D*-/*L*-乳酸脱氢酶基

基金项目: 吉林省科技发展计划技术创新引导项目(编号: 20220402053GH); 国家自然科学基金地区科学基金项目(编号: 31660452)

作者简介: 文字萍, 女, 延边大学助理实验师, 硕士。

通信作者: 崔虎山(1970—), 男, 延边大学副主任医师, 博士。

E-mail: tim-cn@163.com

金清(1971—), 女, 延边大学教授, 博士。

E-mail: jinqing@ybu.edu.cn

收稿日期: 2023-06-15 **改回日期:** 2023-12-07

因的表达水平决定,因此目前的研究重点主要集中在乳酸菌的乳酸脱氢酶的编码基因上^[4]。柠檬明串珠菌作为泡菜等发酵的优势菌种,被认为只含 D-LDH,在发酵过程中生成的乳酸以 D-型为主^[1,5-6],由于人体缺乏 D-乳酸的特异性代谢酶,过量食用会导致 D-乳酸堆积,从而引起酸中毒等代谢障碍,危害人体健康^[7-8]。

D-乳酸作为多种手性化合物合成的前体,在提高聚乳酸材料热稳定性等方面具有重要作用,高光学纯度的 D-乳酸能够提高聚乳酸材料的性能,具有良好的生物降解性,可在微生物的分解作用下完全降解为二氧化碳和水,因此 D-乳酸对环境保护具有重要意义^[9-13]。此外,LDH 也是乳酸菌催化苯丙酮酸生成苯乳酸(phenyllactic acid, PLA)的关键酶,与催化丙酮酸情况类似,L-LDH 催化苯丙酮酸生成 L-苯乳酸,D-LDH 则催化苯丙酮酸生成 D-苯乳酸^[14]。与 L-苯乳酸相比,D-苯乳酸具有更高的抗菌活性,在食品、饲料等领域作为一种新型的生物防腐剂具有较大潜力^[15-16]。综上,D-乳酸、D-苯乳酸在制药、化妆品、化学与食品工业等领域受到了广泛青睐^[17]。柠檬明串珠菌也可作为生产高纯度 D-乳酸、D-苯乳酸的优良菌种,具有广阔的应用前景。

柠檬明串珠菌基因组测序的完成为当下研究提供了丰富的信息资源^[18-19],但其功能注释大多为初步推测,因此在功能研究方面或是利用基因工程技术对该菌株进行改造方面发展较为缓慢^[20]。前期试验发现,柠檬明串珠菌 KM20 通过丙酮酸还原途径生成 D-乳酸,且 LCK_00389 为 D-乳酸合成的关键基因编码酶;LCK_00027 与 LCK_00222 基因同样在丙酮酸代谢通路中编码 D-乳酸脱氢酶的合成并参与 D-乳酸的生成;LCK_00027 与 LCK_00222 拥有极为相近的转录本丰度 TPM (transcripts per million)值,由于不同基因编码 LDH 的性质可能会有较大差异,因此有必要对两种酶进行特性研究。研究拟以柠檬明串珠菌 KM20 为研究对象,通过基因工程手段对 D-乳酸生成相关基因进行基因重组、克隆,并在大肠杆菌中进行异源表达,经纯化后测定酶活,并对酶的最适 pH 值、最适温度、底物特异性、潜在抑制性和动力学常数等进行分析,以期为提高发酵食品安全性、生产高光学纯度乳酸与苯乳酸提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柠檬明串珠菌 KM20;延边大学食品与生物科学系食品科学实验室;

TOP 10、*Escherichia coli* BL21(DE3)、质粒 pET-21a (+)、质粒 pET-15b;德国 Novagen 公司;

DNA 提取试剂盒:美国 Omega 公司;

聚合酶链式反应(PCR)试剂盒,限制性内切酶 EcoR

I、Hind III、Nde I 和 Xho I;日本 TaKaRa 公司;

BCA 试剂盒;美国 Pierce Biotechnology 公司;

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒:北京索来宝生物科技有限公司;

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、丙酮酸、D-/L-乳酸、还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)、苯丙酮酸钠;美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪:PTC-225 型,美国 MJ Research 公司;

Ni²⁺-NTA 柱:17531901 型,瑞典 GE Healthcare 公司;

SDS-PAGE 电泳仪:1658001 型,美国 Bio-Rad 公司;

超声波细胞破碎仪:UCS-650 型,杭州米欧仪器有限公司;

多功能荧光酶标仪:SP-max3500FL 型,上海闪谱生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建与鉴定 根据 NCBI 数据库提供的信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),以柠檬明串珠菌 KM20 基因组为模板(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_010471.1),分别以 LCK_00027-F (5'-GACACGAATTCATGAAGATCATCATGTACAACAC-3')、LCK_00027-R (5'-GTGTCAAGCTTTTAGCGCAGAATTTCGTTTTTCGG-3')、LCK_00222-F (5'-GCAGCCATATGACCAAAATCCTGATGACCAGTGTGCGCAGTGAT-3')与 LCK_00222-R (5'-GGATCCTCGAGTTAAATTTTCATTAAGTGCCTGATGACCGCTAAT-3')为引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳鉴定其分子量,切胶回收后将纯化的 LCK_00027 基因产物插入至 pET-28a(+)质粒(5 369 bp)的 EcoR I 和 Hind III 酶切位点上,获得重组质粒 pETldhD-1(6 346 bp);纯化的 LCK_00222 基因产物插入至 pET-15b 质粒(5 708 bp)的 Nde I 和 Xho I 酶切位点上,获得重组质粒 pETldhD-2(6 701 bp)。分别将重组质粒 pETldhD-1、pETldhD-2 转化至 TOP 10 感受态细胞中,并从含卡那霉素(30 μ g/mL)与氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养基中筛选重组体。

1.3.2 重组菌的蛋白表达及纯化 将筛选得到阳性克隆质粒 pETldhD-1、pETldhD-2 分别转化至 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞中,42 $^{\circ}$ C 热激后分别涂布至含卡那霉素(30 μ g/mL)与氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,挑取单克隆菌落至对应的 LB 肉汤中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD 值为 0.6 时,分别添加 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),并于 20 $^{\circ}$ C 诱导培养 16 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集菌体,加入 PBS 缓冲液重悬,用超声波细胞破碎仪破碎菌体细胞,破碎时间

为 15 min (开 5 s, 关 5 s)。将破碎后的菌液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 得到上清液为粗蛋白。根据重组蛋白为多聚组氨酸标签这一性质, 选用 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析的方法进行纯化。首先通过洗杂液 (30, 50 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液; pH 7.4) 进行两步洗杂, 再用洗脱液 (500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液; pH 7.4) 缓慢洗脱, 收集洗脱液作为纯酶液, 4 ℃ 保存备用。通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白样品的表达与纯化水平。

1.3.3 D -LDH-1 和 D -LDH-2 酶活力测定 分别通过丙酮酸还原与 D -乳酸氧化两种反应测定酶活性。丙酮酸还原反应: 向 0.3 mL 底物溶液 (0.5 mmol/L NADH, 10 mmol/L 丙酮酸, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 8.0) 中加入 0.01 mL 纯酶液进行反应; D -乳酸氧化反应: 向 0.3 mL 底物溶液 (5 mmol/L NAD^+ , 75 mmol/L D -乳酸, 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液; pH 11.0) 中加入 0.01 mL 纯酶液进行反应。两种反应混合物均在指定温度和时间下孵育, 并于 340 nm 处测定吸光度。定义每分钟氧化 1 μmol NADH 或每分钟还原 1 μmol NAD^+ 所需酶量为一个酶活力单位 (U); 每毫克酶蛋白所含的酶活单位数 (U/mg) 为比活力。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。

1.3.4 酶反应产物测定 以 D -乳酸为底物, 在酶的作用下进行充分氧化反应, 将反应后的酶解液稀释, 并经 0.22 μm 水系滤膜过滤, 进行高效液相色谱检测。检测条件^[21]: 色谱柱为 Hypersil GOLD Amino (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相为乙腈—0.02 mol/L 磷酸二氢钾 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{磷酸二氢钾}}$ 为 30:70); 流速 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL ; 紫外检测器; 检测波长 210 nm。

1.3.5 pH 和温度对 D -LDH-1 和 D -LDH-2 酶活力的影响 分别测定不同 pH 值缓冲液 (100 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0~7.0、100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0~10.0、100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH 11.0~13.0) 对 D -LDH-1 和 D -LDH-2 酶活性的影响, 探索酶最适 pH 值。在最适 pH 条件下, 于 10~50 ℃ 范围内测定温度对 D -LDH-1 和 D -LDH-2 酶活性的影响, 探索酶的最适反应温度。

1.3.6 D -LDH-1 和 D -LDH-2 的底物特异性和酶抑制剂测定 以与丙酮酸结构相似的乙酰丙酸、苯丙酮酸钠、 α -酮丁酸、草酰乙酸、2-酮戊二酸和与 D -乳酸结构相似的苹果酸为底物, 在最适温度与最适 pH 条件下, 测定 D -LDH-1 与 D -LDH-2 的底物特异性, 并以丙酮酸与 D -乳酸作为底物反应时的酶活性定义为 100%。

为确定抑制剂对酶活性的影响, 将 D -LDH-1 和

D -LDH-2 分别与浓度为 0.1, 1.0 mmol/L 的金属离子 (Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Na^+)、SDS 与尿素孵育, 以未添加抑制剂对照组中酶的丙酮酸还原活性为 100%。

1.3.7 D -LDH-1 和 D -LDH-2 动力学参数测定 在 0.5 mmol/L NADH 下分别测定不同丙酮酸浓度 (1, 2, 3, 4, 5 mmol/L) 下的酶活性; 在 10 mmol/L 丙酮酸下测定不同浓度 NADH (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol/L) 的酶活性。在 5 mmol/L NAD^+ 下分别测定不同 D -乳酸浓度 (10, 20, 30, 40, 50 mmol/L) 的酶活性; 在 50 mmol/L 乳酸浓度下测定不同浓度 NAD^+ (1, 2, 3, 4, 5 mmol/L) 的酶活性, 并采用 Lineweaver-Burk 作图法进行数据分析。

1.4 数据处理

各试验重复 3 次, 使用 SPSS 20 软件进行数据分析, 通过 Origin 2018 软件进行图表绘制。

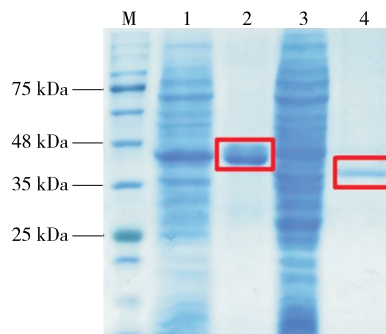
2 结果与分析

2.1 重组基因的诱导表达分析

利用设计的引物进行 PCR 扩增, 将提纯后得到的目的基因分别插入到相应质粒的酶切位点上获得重组质粒, 并分别对其进行双酶切鉴定。在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳验证, 所得目的基因与基因测序结果一致, 表明基因克隆成功, 获得重组载体。将重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达和纯化后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 检测结果 (图 1) 表明, *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-1 与 *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-2 分别在 40.0, 38.5 kDa 处有单一蛋白条带, 无杂蛋白, 表明重组蛋白表达纯化成功。

2.2 D -LDH-1 和 D -LDH-2 酶活力分析

由表 1 可知, D -LDH-1 粗酶液对丙酮酸的比活力为



M. 蛋白 Marker 1. *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-1 粗酶液 2. *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-1 纯酶液 3. *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-2 粗酶液 4. *E. coli* BL21 (DE3)/pETldhD-2 纯酶液

图 1 重组 D -LDH-1 和 D -LDH-2 的 SDS-PAGE 分析
Figure 1 SDS-PAGE analysis of purification of expressed D -LDH-1 and D -LDH-2

表 1 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 纯化前后的酶活力

Table 1 Enzyme activity of *D*-LDH-1 and *D*-LDH-2 before and after purification

组别	酶活力/U	酶比活/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
<i>D</i> -LDH-1 粗酶液	1.23±0.04	0.95±0.06	1.00	100
<i>D</i> -LDH-1 纯酶液	0.24±0.03	2.18±0.29	2.38±0.25	19.65±2.78
<i>D</i> -LDH-2 粗酶液	9.42±0.25	8.97±0.45	1.00	100
<i>D</i> -LDH-2 纯酶液	15.31±0.58	153.10±11.38	17.44±1.09	162.57±7.87

0.95 U/mg,纯化后比活力达 2.18 U/mg,提高约 2.29 倍;*D*-LDH-2 粗酶液对丙酮酸的比活力为 8.97 U/mg,纯化后比活力达 153.10 U/mg,提高约 17.07 倍。两种酶经纯化后,以 *L*-乳酸为底物时显示并无活力。虽然两种酶的编码基因来自同一菌株,但活性差异较大,可能是因为其核苷酸、氨基酸序列不同。*D*-LDH-1 酶活力较低,但略高于肠膜明串珠菌 NCDO 的 *D*-LDH 比活力(0.6, 0.9 U/mg)^[22]; *D*-LDH-2 酶活力较高,且高于植物乳杆菌 LY-78 的(65.35, 0.41 U/mg)^[23],但仍低于肠膜明串珠菌 ATCC8293 的 *D*-LDH 比活力(4 450 U/mg)^[24]。*D*-LDH-1 的回收率为 19.65%,符合多数情况下酶的回收率<100%的情况; *D*-LDH-2 的回收率为 162.25%,可能是因为粗酶液中某物质抑制了该 *D*-乳酸脱氢酶的活性。

2.3 酶反应产物分析

由图 2 可知,50 mg/L 丙酮酸标准品在 7.567 min 时检测到明显峰值。两种酶以 *D*-乳酸为底物进行氧化反应,反应产物均在丙酮酸保留时间处检测到明显峰值,证明两种酶是将 *D*-乳酸氧化为丙酮酸的 *D*-LDH。而以 *L*-乳酸为底物进行反应所得产物在丙酮酸保留时间处并

未检出峰值,与酶活力测定结果相符。

2.4 pH 和温度对 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 酶活力的影响

由图 3 可知,*D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 还原丙酮酸时的最佳 pH 均为 8.0;当 pH>10 时,酶活力大幅下降,*D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 的相对酶活力分别为 16.79%, 21.87%。两种酶还原丙酮酸时的最佳 pH 值符合乳酸菌最适生长的 pH 范围,与多聚组氨酸标签纯化系统的最适 pH 环境相近,利于简化纯化过程^[25]。在乳酸氧化过程中,由于 *D*-LDH-1 酶活力过小,未进一步进行表征;而 *D*-LDH-2 在乳酸氧化时的最佳 pH 为 12.0,当 pH 为 13 时,其酶活力仍能保持在 66.68%。当 pH 为 8.0~13.0 时,*D*-LDH-2 中均能被检测到乳酸氧化的酶活性,表明该酶对碱性条件具有较强的抵抗力,与肠膜明串珠菌中 *D*-LDH 相似^[24]。两种酶对 pH 均较为敏感,相对酶活力变化显著($P<0.05$)。

由图 4 可知,*D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 在丙酮酸还原时的最适温度均为 40℃;当温度<20℃或>50℃时,*D*-LDH-1 的相对酶活力均<50%,与文献[26-27]的结果相符;当温度为 50℃时,*D*-LDH-2 的相对酶活力仍保持在 76.38%,说明 *D*-LDH-2 比 *D*-LDH-1 更耐高温。在

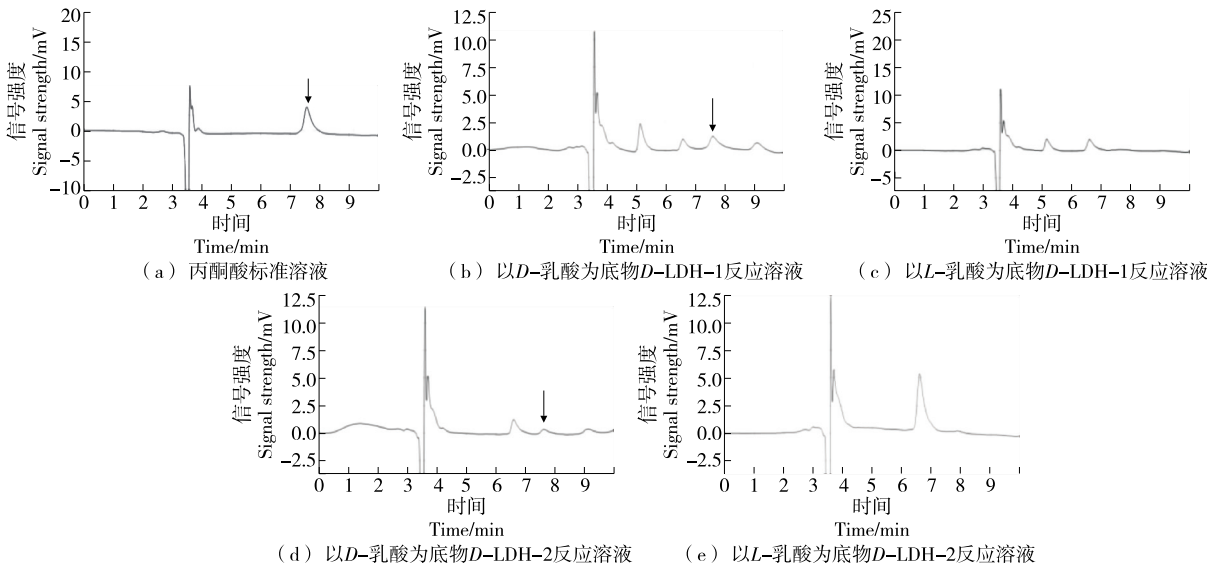


图 2 HPLC 检测 *D*-LDH 氧化反应生成丙酮酸

Figure 2 HPLC analysis of the oxidation reaction of *D*-LDH to pyruvate

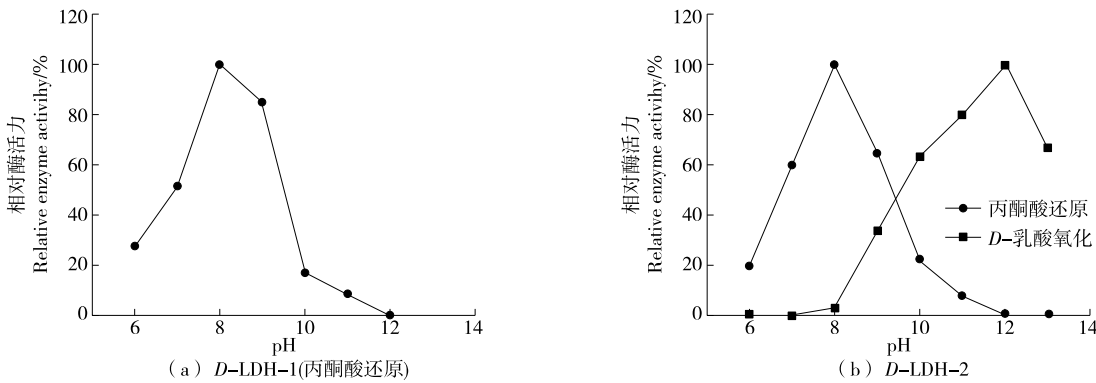


图 3 pH 对 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 酶活力的影响
Figure 3 Effects of pH on *D*-LDH-1 and *D*-LDH-2 activity

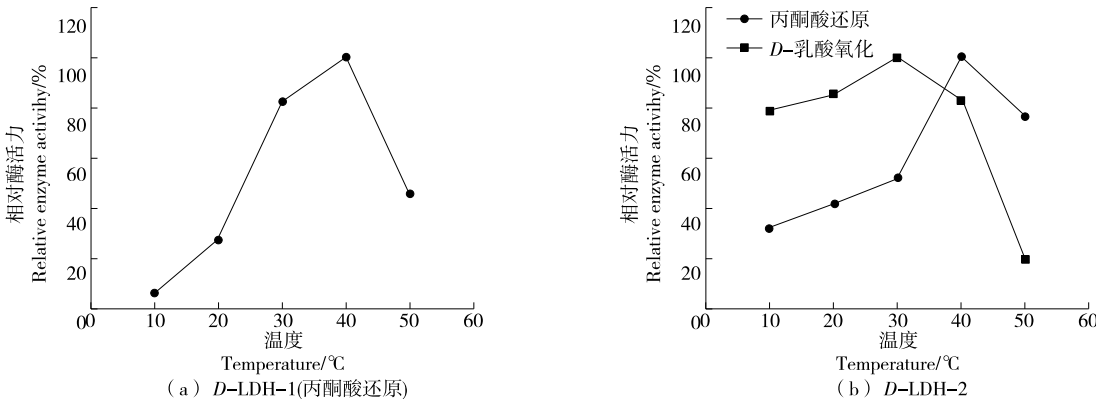


图 4 温度对 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 酶活力的影响
Figure 4 Effects of temperature on *D*-LDH-1 and *D*-LDH-2 activity

乳酸氧化过程中, *D*-LDH-2 的最适温度为 30 ℃, 与 Hofvendahl 等^[28] 的结论接近。两种酶对温度均较为敏感, 相对酶活力变化显著 ($P < 0.05$)。

2.5 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 底物特异性和酶抑制剂分析

由表 2 可知, 两种酶对不同底物展现了相似的底物偏好, 其底物催化偏好为丙酮酸 > 草酰乙酸 > 苯丙酮酸钠 > 2-酮戊二酸。与肠膜明串珠菌 ATCC 8293 和发酵乳杆菌 JN248 的 *D*-LDH 相比, 柠檬明串珠菌的 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 底物范围并不广泛, 但相对特异性更高^[29-30]。

由图 5 可知, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Na^{+} 对两种酶活性均有促进作用, 浓度为 1 mmol/L 的 Cu^{2+} 使 *D*-LDH-1 的相对酶活力达到 150.05%, *D*-LDH-2 的相对酶活力高达 162.46%; Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、尿素和 SDS 对两种酶的活性均有抑制作用, 尤其是浓度为 1 mmol/L 的 Zn^{2+} 和 SDS 对两种酶的相对酶活力抑制率高达 100%, 与文献^[24, 31] 的结论相同。两种酶对 SDS 均比较敏感, 推测是 SDS 使两种酶的构象发生变化, 显著降低了其催化能力, 与文献^[32] 的报道相符。

2.6 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 动力学参数分析

由表 3 可知, *D*-LDH-1 对丙酮酸和 NADH 的 K_m 值

表 2 *D*-LDH-1 和 *D*-LDH-2 对不同底物的相对酶活力

Table 2 Relative activity of *D*-LDH-1 and *D*-LDH-2 with different substrates

底物	相对酶活力 / %	
	<i>D</i> -LDH-1	<i>D</i> -LDH-2
丙酮酸	100.00	100.00
乙酰丙酸	0.00	0.00
苯丙酮酸钠	12.21 ± 1.14	14.32 ± 0.43
α-酮丁酸	0.00	0.00
2-酮戊二酸	8.34 ± 0.47	6.62 ± 0.35
草酰乙酸	23.44 ± 1.19	20.74 ± 1.10
<i>D</i> -乳酸	—	100.00
苹果酸	—	0.00

分别为 2.98, 0.32 mmol/L; *D*-LDH-2 对丙酮酸和 NADH 的 K_m 值分别为 6.11, 0.32 mmol/L。 *D*-LDH-2 对 *D*-乳酸和 NAD^{+} 的 K_m 值分别为 44.30, 4.32 mmol/L。两种酶对 *D*-乳酸和 NAD^{+} 的 K_m 值均大于丙酮酸和 NADH 的, 表明两种酶对丙酮酸和 NADH 的亲合力均高于乳酸和 NAD^{+} , 更利于 *D*-乳酸或 *D*-苯乳酸的生成。此

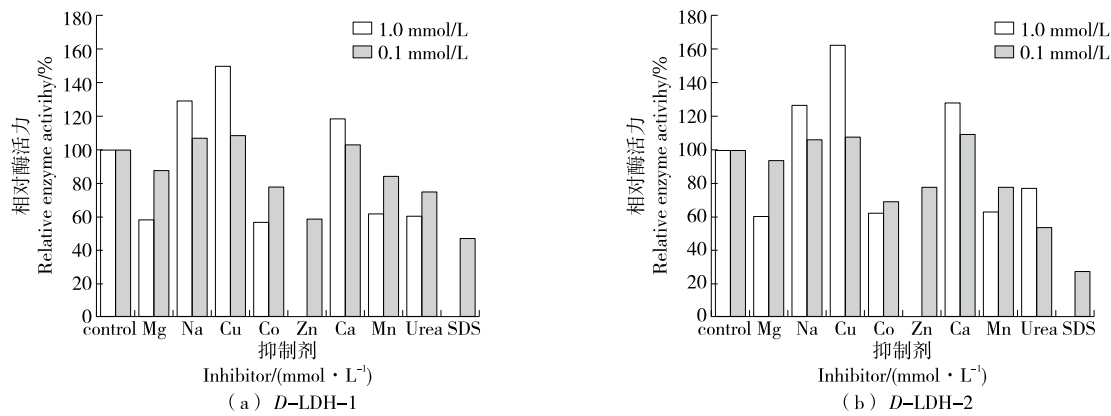


图 5 抑制剂对 D-LDH-1 和 D-LDH-2 酶活力的影响
Figure 5 Effects of inhibition on D-LDH-1 and D-LDH-2 activity

表 3 D-LDH-1 和 D-LDH-2 的动力学参数
Table 3 Kinetic properties of D-LDH-1 and D-LDH-2

底物	D-LDH-1				D-LDH-2			
	$V_{\max}/$	$K_m/$	$K_{\text{cat}}/$	$K_{\text{cat}}/K_m/$	$V_{\max}/$	$K_m/$	$K_{\text{cat}}/$	$K_{\text{cat}}/K_m/$
	($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	s^{-1}	($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	s^{-1}	($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
丙酮酸	0.27	2.98	1.80	6.0×10^2	21.74	6.11	139.51	2.2×10^4
NADH		0.32				0.32		
D-乳酸	—	—	—	—	0.45	44.3	2.89	65.0
NAD ⁺		—				4.32		

外,两种酶对丙酮酸的 K_{cat}/K_m 值分别为 6.0×10^2 , $2.2 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$; D-LDH-2 对 D-乳酸的 K_{cat}/K_m 值为 $65.0 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。D-LDH-2 对丙酮酸的 K_{cat} 值比 D-LDH-1 的大,且催化效率 (K_{cat}/K_m) 也更高,表明 D-LDH-2 更适合 D-乳酸或 D-苯乳酸的生成。

3 结论

研究以柠檬明串珠菌 KM20 基因组为模板,通过对两个编码 D-乳酸脱氢酶的基因构建质粒并克隆至表达载体,并在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达后,分别对其酶学性质进行了分析。结果表明,柠檬明串珠菌的两个 D-乳酸脱氢酶比其他一些乳酸菌的 D-乳酸脱氢酶具有较高的比活力;两种酶均对碱性环境具有较强的抵抗力; Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Na^+ 对两种酶活力均有促进作用, Zn^{2+} 和 SDS 则对两种酶活力高度抑制。后续可比较纯酶与原始菌株的转化效率,还可根据其酶学特性研究 D-乳酸脱氢酶在发酵食品安全方面的应用。

参考文献

[1] JIN Q, YOON H S, HAN N S, et al. Effect of lactic acid bacteria on D- and L-lactic acid contents of Kimchi [J]. Food Science & Biotechnology, 2006, 15(6): 948-953.
[2] HEMME D, FOUCAUD-SCHEUNEMANN C. Leuconostoc,

characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(6): 467-494.
[3] JIANG T, GAO C, MA C, et al. Microbial lactate utilization: enzymes, pathogenesis, and regulation[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(10): 589-599.
[4] 吉林中粮生化有限公司. 产 L-乳酸的重组菌株及其构建方法和发酵产 L-乳酸的方法及应用: CN202010463397.3[P]. 2020-08-07.
Jinlin Zhongliang Biochemical Co Ltd. The recombinant strain of L-lactic producing and its construction method and the method and application of fermentation to produce L-lactic: CN202010463397.3 [P]. 2020-08-07.
[5] NGUYEN-BOISSE T T, SAULNIER J, JAFFREZIC-RENAULT N, et al. Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, D- and L-lactate determination in dairy products[J]. Sensors and Actuators B, 2013, 179(10): 232-239.
[6] JIN Q, JUNG J Y, KIM Y J, et al. Production of L-lactate in Leuconostoc citreum via heterologous expression of L-lactate dehydrogenase gene[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(2): 160-164.
[7] LISTED N. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications[J]. WHO Tech Rep Ser, 1974(53): 1.
[8] ADEVA-ANDANY M, LOPEZ-OJEN M, FUNCASTA-

- CALDERON R, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health[J]. Mitochondrion, 2014, 17: 76-100.
- [9] 周丽, 田康明, 陈献忠, 等. 微生物发酵产光学纯度 D-乳酸研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10): 114-124.
- ZHOU L, TIAN K M, CHEN X Z, et al. Research progress on optical purity D-lactic produced by microbial fermentation [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2010, 30(10): 114-124.
- [10] DATTA R, HENRY M. Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies: A review [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology Biotechnology, 2010, 81(7): 1 119-1 129.
- [11] 许婷婷, 柏中中, 何冰芳. D-乳酸制备研究进展[J]. 化工进展, 2009, 28(6): 991-996.
- XU T T, BAI Z Z, HE B F. Research progress in the preparation of D-lactic[J]. Chemical Progress, 2009, 28(6): 991-996.
- [12] 胡建军. 聚乳酸合成技术研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(12): 2 724-2 728, 2 735.
- HU J J. Research progress of polylactic acid synthesis technology [J]. Chemical Progress, 2012, 31(12): 2 724-2 728, 2 735.
- [13] MU W, YU S, JIANG B, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase from *Pediococcus acidilactici* that converts phenylpyruvic acid into phenyllactic acid [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(5): 907-911.
- [14] MU W, CHEN C, LI X, et al. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(3): 1 366-1 370.
- [15] DIEULEVEUX V, LEMARINIER S, GUEGUEN M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 40(3): 177-183.
- [16] ELENA S, PATRIZIO T, MARIANTONIETTA S, et al. Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 26(9): 1 373.
- [17] HATTI-KAUL R, CHEN L, DISHISHA T, et al. Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals[J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365(20): 1-20.
- [18] JUNG J Y, LEE S H, LEE S H, et al. Complete genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain J18, isolated from Kimchi[J]. J Bacteriol, 2012, 194(3): 730-731.
- [19] SØRENSEN S, VOGENSEN F K, ARDÖ Y. Genome sequence of subsp. strain T26, isolated from mesophilic undefined cheese starter[J]. Genome Announcements, 2014, 2(3): e00485-14.
- [20] KIM J F, JEONG H, LEE J S, et al. Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20[J]. J Bacteriol, 2008, 190(8): 3 093-3 094.
- [21] 董丽芳, 闫荣哲, 李会然, 等. 高效液相色谱法测定发酵液中丙酮酸的含量[J]. 河北化工, 2009, 32(11): 69-70.
- DONG L F, YAN R Z, LI H R, et al. High performance liquid chromatography for the determination of pyruvate content in fermentation broth[J]. Hebei Chemical Industry, 2009, 32(11): 69-70.
- [22] GARVIE E I. Bacterial lactate dehydrogenases[J]. Microbiol Rev, 1980, 44(1): 106-139.
- [23] 李芬. 苯乳酸生产菌株 LY-78 的乳酸脱氢酶基因克隆表达及酶学性质分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2017: 32-37.
- LI F. Clone expression and enzymatic properties of phenyllactic acid production strain LY-78 [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017: 32-37.
- [24] LI L, EOM H J, PARK J M, et al. Characterization of the major dehydrogenase related to D-lactic acid synthesis in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 [J]. Enzyme Microb Technol, 2012, 51(5): 274-279.
- [25] ZHU Y B, HU F G, ZHU Y Y, 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.
- [26] CAO K, LI N, WANG H, et al. Two zinc-binding domains in the transporter AdcA from *Streptococcus pyogenes* facilitate high-affinity binding and fast transport of zinc[J]. J Biol Chem, 2018, 293(16): 60-75, 89.
- [27] CAO K, ZHANG J, MIAO X Y, et al. Evolution and molecular mechanism of PitAs in iron transport of *Streptococcus* species[J]. J Inorg Biochem, 2018, 182: 113-123.
- [28] HOFVENDAHL K, HAHN-HÄGERDAL B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(2/3/4): 87-107.
- [29] 李玲, 龚金炎, 袁海娜, 等. 肠膜明串珠菌 ATCC8293 中乳酸脱氢酶的特性[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 153-158.
- LI L, GONG J Y, YUAN H N, et al. Properties of lactate dehydrogenase in the ATCC8293 of *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Food Science, 2020, 41(18): 153-158.
- [30] CHEN L X, BAI Y J, FAN T P, et al. Characterization of a D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum* JN248 with high phenylpyruvate reductive activity[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(10): 2 269-2 275.
- [31] LEYVA-CARRILLO L, HERNANDEZ-PALOMARES M, VALENZUELA-SOTO E M, et al. Purification and partial biochemical characterization of recombinant lactate dehydrogenase 1 (LDH-1) of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Protein Expr Purif, 2019, 164(7): 105461.
- [32] SANFORD K J, MEYER D J, MATHISON M J, et al. Selective inactivation of lactate dehydrogenase isoenzymes with ionic surfactants[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3 207-3 214.