

研究报告

来自詹氏乳杆菌的耐热 D-乳酸脱氢酶的酶学性质研究

蔡昱萌^{1,2} 朱凌峰² 王丽敏² 于波² 郭红莲^{1*}

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院 天津 300457)

(2. 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室 北京 100101)

摘要:【目的】D-乳酸脱氢酶是催化丙酮酸合成 D-乳酸的关键酶。由于其不耐热，从而限制了 D-乳酸高温发酵菌株的构建。本文从詹氏乳杆菌中克隆新型 D-乳酸脱氢酶研究其酶学性质，为构建 D-乳酸高温发酵菌株，进一步降低 D-乳酸生产成本奠定基础。【方法】通过克隆詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶，将其进行体外表达，并与来自植物乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶的最适温度、最适 pH、动力学参数及热稳定性和热失活性相比较，研究詹氏乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的耐热性。【结果】詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶最适温度(45 °C)比植物乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶的最适温度(30 °C)高很多，热失活的时间和温度均要比植物乳杆菌中 D-乳酸脱氢酶高很多。同时其催化效率(k_{cat}/K_m)是植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的 3 倍左右。【结论】詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶具有更好的耐热性和更高的催化活力。

关键词: D-乳酸脱氢酶，耐热，詹氏乳杆菌

Biochemical characterization of a novel thermostable D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus jensenii*

CAI Yu-Meng^{1,2} ZHU Ling-Feng² WANG Li-Min² YU Bo² GUO Hong-Lian^{1*}

(1. School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] NAD-dependent D-lactate dehydrogenase (D-LDH) catalyzed the conversion of pyruvate to D-lactic acid. However, the weakness of thermostability of D-LDHs reported to date hindered the recombinant strain construction for high-temperature fermentation process. Finding a novel thermostable D-LDH would lay the foundation for constructing the efficient D-lactate producer under high-temperature fermentation conditions and thus will reduce the operation cost of producing D-lactic acid. [Methods] D-LDH was cloned from *Lactobacillus jensenii* strain and then expressed in *Escherichia coli* to determine its optimal reaction temperature, optimal reaction pH, kinetic parameter, thermostability and thermal inactivation, which is compared with the mesophilic D-LDH from *Lactobacillus plantarum* ssp. *plantarum*. [Results] D-LDH from *Lactobacillus jensenii* strain had

基金项目: 国家 863 计划重大项目(No. 2011AA02A202)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601358; 邮箱: guohonglian@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-07-23; 接受日期: 2014-10-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-11

higher optimal reaction temperature (45 °C), better thermostability and 3 times higher catalytic activity (k_{cat}/K_m) than those of D-LDH from *Lactobacillus plantarum* ssp. *plantarum* (optimal reaction temperature was just 30 °C). [Conclusion] D-LDH from *Lactobacillus jensenii* strain had better thermostability and higher catalytic activity, which is useful component for industrial applications.

Keywords: D-lactate dehydrogenase, Thermostable, *Lactobacillus jensenii*

乳酸是三大有机酸之一, 被广泛应用在食品、医药、化妆品及化工产业^[1]。乳酸未来最广泛的工业用途是用于生产生物可降解材料聚乳酸(PLA), 聚乳酸由于其良好的材料性能和可降解性, 被认为是最可能替代石化塑料的生物可降解塑料^[2]。乳酸单体有两种同分异构体, 即 D-乳酸和 L-乳酸, 他们分别由丙酮酸在 NAD 依赖型 D-乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.28)和 L-乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27)的作用下还原产生的^[3-4]。研究表明, 在聚 L-乳酸中添加等量的聚 D-乳酸可以显著提高聚乳酸材料的耐温性。因此, 随着聚乳酸产业的不断发展, D-乳酸单体生产受到越来越多的关注。

L-乳酸由于其在食品和工业上有非常广泛的应用空间, 发展历史较长, 工业化微生物发酵法生产 L-乳酸已经很成熟。L-乳酸的发酵温度一般在 40 °C 以上^[5-6], 近期报道的一些耐热菌种, 如凝结芽孢杆菌, 最佳的发酵温度在 50–55 °C, 并产高光学纯度的 L-乳酸^[7]。由于该菌株的耐热性, 可以满足粗放的不灭菌高温发酵工艺, 因此在工业生产上具有很大的优势。与成熟的 L-乳酸发酵工艺不同, 目前国内还未有 D-乳酸的生产线。其原因一方面受到 D-乳酸的市场所限; 另一方面, 目前 D-乳酸发酵菌种均不耐热, 发酵温度在 40 °C 以下, 因此在工业生产中需要将培养基灭菌; 另一方面, 由于是常温发酵, 操作过程中极易染杂菌从而降低光学纯度和转化率, 对发酵过程的操作要求较为严格, 这就间接提高了 D-乳酸的生产成本。

目前报道比较多的 D-乳酸发酵菌株为德氏乳杆菌, 该菌株可以产较高光学纯度的 D-乳酸, 但其最佳的发酵温度为 37 °C。当培养温度达到 40 °C 左右时, D-乳酸的产率显著降低。同时, 随着对乳酸脱氢酶的研究不断深入, 发现即便在同一个菌体

里, D-乳酸脱氢酶的热稳定性要明显低于 L-乳酸脱氢酶^[8]。目前报道的 L-乳酸的热稳定性普遍在 50 °C 以上, 而热稳定性好的 D-乳酸脱氢酶很少有报道, D-乳酸脱氢酶在 45 °C 以上的酶活损失很快^[9]。因此, 推测 D-乳酸脱氢酶热稳定性较差可能是限制菌种具有高温 D-乳酸发酵能力的重要原因。为了提高 D-乳酸发酵的经济性, 开发耐热的发酵菌种和开放式发酵工艺是未来的技术方向。D-乳酸生产的最关键酶——目前报道的 D-乳酸脱氢酶不耐热的性状严重制约了高温工程菌株的构建。因此找到或设计出耐高温的 D-乳酸脱氢酶将是构建 D-乳酸高温发酵菌株的关键步骤。

在 20 世纪 70 年代, 有研究者报道, 在测定詹氏乳杆菌(*Lactobacillus jensenii*)的粗酶液酶活时, 发现存在耐温的 D-乳酸脱氢酶酶活, 对该酶进行了初步的纯化, 但是其基因信息未知^[9]。近年来, 随着基因组测序技术的不断发展, 越来越多的新酶资源从海量的基因组数据中被发掘出来。本研究中, 我们根据最近公布的全基因组序列, 在詹氏乳杆菌的基因组中注释获得一个 D-乳酸脱氢酶, 并对其进行了克隆纯化。与来自植物乳杆菌中的常温 D-乳酸脱氢酶的酶学相比较, 发现来自詹氏乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶具有较好的耐温特性, 并且催化活力更高, 为下一步进行 D-乳酸高温发酵菌株的构建提供了非常好的元件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 詹氏乳杆菌(*Lactobacillus jensenii* DSM 20557)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM 20174)购自德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ);

用于酶的克隆表达菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒 pETDuet-1 本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 快速回收纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;Ex Taq DNA 聚合酶及限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 詹氏乳杆菌 DSM20557 是已报道过的含有最耐热的 D-乳酸脱氢酶基因^[9],但是由于其没有基因测序信息,无法查到其 D-乳酸脱氢酶基因。因此根据最新詹氏乳杆菌 269-3 的基因组测序信息(GenBank 登录号: ACOY000000000),设计了其 D-乳酸脱氢酶基因引物。上游引物序列为: 5'-CCCAAGCTTATGACAAAGATTTTGC-3',下游引物序列为: 5'-TATCTCGAGTTAACCTAAGTAACTGG-3',扩增的基因含有终止密码子,表达的蛋白在 N 端有 His-tag 标签。同时根据公布的植物乳杆菌 DSM20174 (ACGZ020000000)的基因组信息(GenBank 登录号: ACGZ020000000),设计了其 D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)引物。上游引物序列为: 5'-CGCAAGCTTATGAAAATTATTGCATATGC-3',下游引物序列为: 5'-TATCTCGAGGTCAAACCTAACTTGTTGTGT-3' (北京睿博兴科生物技术有限公司合成),均分别引入了 *Hind* III 和 *Xho* I 两个酶切位点(下划线)。为保持与参考文献[3]一致,扩增的来自植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶基因不含终止密码子,表达的蛋白除了在 N 端含有 His-tag 标签外,同时在 C 端含有 S-tag 的标签。

1.2.2 重组质粒的构建: 詹氏乳杆菌和植物乳杆菌基因组 DNA 的提取按照试剂盒说明书操作。经过 PCR 扩增分别得到两株菌的 *ldhD*。将扩增后的目的片段和 pETDuet-1 使用相应的限制性内切酶酶切后,用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至 *E. coli* BL21(DE3)中,分别得到携带 pETDuet-*ldhD*20557 和 pETDuet-*ldhD*20174 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)重组菌株。挑取单菌落经菌落 PCR 及提取质粒双酶切

验证后送去北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.2.3 重组蛋白 D-乳酸脱氢酶的表达与纯化: 分别挑取携带 pETDuet-*ldhD*20557 和 pETDuet-*ldhD*20174 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)单菌落,至 5 mL LB 液体培养基中(蛋白胨 10 g,酵母浸粉 5 g,NaCl 10 g,氨苄青霉素 100 mg/L),过夜培养。以 1%的接种量转接到 200 mL LB 新鲜培养基中,37 °C 培养直至 OD_{600} 达到 0.6 左右,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,转到 18 °C 过夜诱导。

13 000 \times g、4 °C 离心 10 min 收集 *E. coli* BL21(DE3)菌体细胞,重悬于结合液中(20 mmol/L pH 7.9 Tris, 10 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl),加入 100 μ L 20 g/L 的溶菌酶,混匀冰上静置 30 min,超声破碎细胞,12 000 r/min、4 °C 离心 10 min,上清液过膜(0.45 μ m)后利用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化,利用 4 mmol/L pH 7.9 Tris, 60 mmol/L 咪唑, 0.1 mol/L NaCl 的洗脱液进行杂蛋白的洗脱,利用 10 mmol/L pH 7.9 Tris, 300 mmol/L 咪唑, 0.25 mol/L NaCl 的洗脱液进行目的蛋白的洗脱,SDS-PAGE 检测目的条带,超滤柱脱盐浓缩后,-80 °C 保藏。

1.2.4 D-乳酸脱氢酶活力测定: D-乳酸脱氢酶能催化丙酮酸与还原型辅酶 I (还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NADH)反应生成 D-乳酸与氧化态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺),通过测定 NADH 的变化可以表征酶反应的快慢^[10]。

NADH 在 340 nm 有最大吸光度,纯化的 D-乳酸脱氢酶活力通过酶标仪检测 NADH 在 340 nm 吸光度的减少量,通过标准曲线可以计算出 D-乳酸脱氢酶的酶活。具体测定体系(200 μ L): pH 7.0 磷酸缓冲液 100 mmol/L;丙酮酸 20 mmol/L; NADH 0.2 mmol/L;酶液适量;检测 OD_{340} 的变化。1 个酶活单位(1 U)定义为每分钟内氧化 1 μ mol NADH 所需要的酶量。

1.2.5 D-乳酸脱氢酶产物光学纯度的测定: 根据文献[11]利用高效液相手性柱检测来自两种菌的酶促反应产物的光学纯度,看是否只产生 D-乳酸,同时

将来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶分别放置在不同温度下(35、45、55 °C)进行反应, 观察温度对 D-乳酸脱氢酶的立体选择性的影响。其流动相是 2 mmol/L 的硫酸铜溶液, 柱温是 25 °C, 检测波长为 254 nm, 流速为 0.5 mL/min, 进样 5 μ L。根据标品确定反应产物的纯度。

1.2.6 D-乳酸脱氢酶的最适反应温度: 在 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液中, 加入底物丙酮酸 20 mmol/L, 辅酶 NADH 0.2 mmol/L。在不同温度下反应, 酶标仪测其反应速度, 以最高的反应速度作为 100% 反应活力, 得到其他的相对活力, 100% 反应活力对应的温度即是最适温度。

1.2.7 D-乳酸脱氢酶最适 pH 的筛选: 在不同 pH 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 加入底物丙酮酸 20 mmol/L, 辅酶 NADH 0.2 mmol/L, 37 °C 反应, 酶标仪测其反应速度, 以最高的反应速度作为 100% 反应活力, 得到其他的相对活力。

1.2.8 D-乳酸脱氢酶动力学参数测定: 在最适 pH 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L) 中加入辅酶 NADH 0.2 mmol/L, 不同浓度的底物丙酮酸, 最适温度下反应, 测其反应速度。用双倒数方程求得动力学参数。

1.2.9 D-乳酸脱氢酶的热稳定性和热失活性: 将酶在不同温度(25、30、35、40、45、50、55 和 60 °C)下分别放置 10 min, 冰浴 0.5 h 后, 在各自最适 pH 和最适温度下进行反应, 分别测定其剩余酶活。定义 25 °C 温度下处理 10 min 后的剩余酶活为 100%, 分别计算在不同温度下处理 10 min 后酶的相对酶活。 T_{50}^{10} 定义为酶在放置 10 min 后, 酶活力降低到相对于置于 25 °C 10 min 的酶活力一半时, 所需要的温度。

酶在特定的温度下的热失活性是通过将酶在 45 °C 下放置 0–90 min, 冰浴 10 min, 分别测定其剩余酶活。酶的热失活半寿期($t_{1/2}$)是指酶活力降低到初始活力的一半时所需要的时间。

2 结果与分析

2.1 D-乳酸脱氢酶基因克隆、表达与纯化

以詹氏乳杆菌和植物乳杆菌基因组 DNA 为模

板进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到的目的片段大小分别在 1 002 bp 和 999 bp 左右, 与预期大小一致。经酶切后, 连接到经同样酶切处理的 pETDuet-1 质粒, 分别构建了重组质粒 pETDuet-*ldhD20557* 和 pETDuet-*ldhD20174* 质粒, 经测序分析验证, 证明重组质粒插入片段正确, 并与 GenBank 中对应的 D-乳酸脱氢酶基因一致。

分别使用携带 pETDuet-*ldhD20557*、pETDuet-*ldhD20174* 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 来表达 D-乳酸脱氢酶, 在 18 °C 低温诱导下, 细胞能较好破壁, 并且由于目的蛋白上已被添加 His 标签, 通过 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化后的蛋白条带单一(图 1), 可用于下一步酶学实验。

2.2 反应产物光学纯度检测

用纯化、脱盐后的詹氏乳杆菌和植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶催化丙酮酸与 NADH 反应, 得到反应产物。用高效液相手性柱可以将 D-乳酸、L-乳酸分离, 根据标准品的出峰时间可以确定反应产物的光学纯度。如图 2 所示, 来自詹氏乳杆菌和植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶均仅催化丙酮酸生成 D-乳酸,

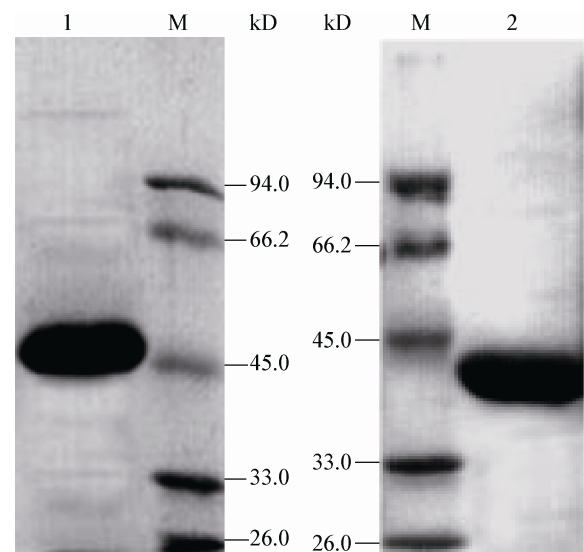


图 1 重组 D-乳酸脱氢酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 Analysis of purified D-LDHs by SDS-PAGE

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: D-LDH of *Lactobacillus plantarum*; 2: D-LDH of *Lactobacillus jensenii*.

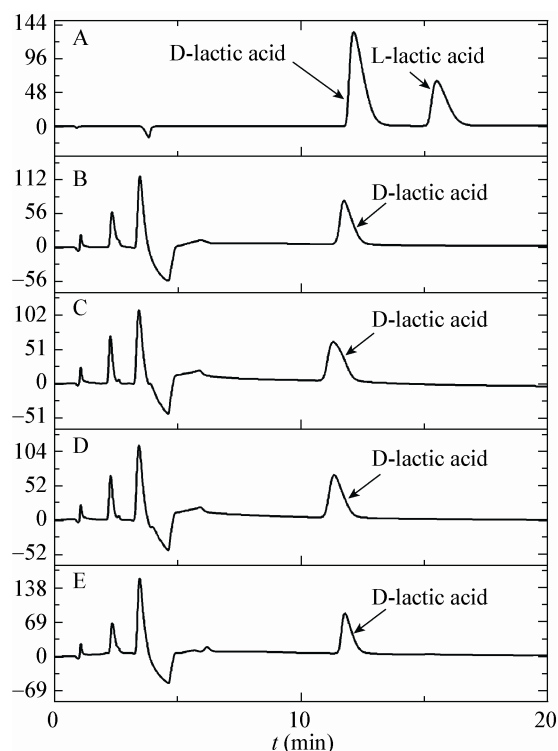


图2 来自詹氏乳杆菌和植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶催化丙酮酸的产物分析

Figure 2 HPLC analyses of the products from pyruvate by D-LDHs, respectively

Note: A: The standard of D-lactic acid and L-lactic acid; B, C, D: The products from pyruvate by D-LDHs from *Lactobacillus jensenii* at 35, 45, 55 °C, respectively; E: The products from pyruvate by D-LDHs from *Lactobacillus plantarum*.

而没有 L-乳酸的产生,说明两种来源的 D-乳酸脱氢酶均是严格的 D-乳酸脱氢酶,且来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的催化特性并未受到温度的影响。

2.3 D-乳酸脱氢酶的最适反应温度的确定

由图 3A 可见詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的最适温度在 45 °C 左右,而植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶(图 3B)的最适温度则在 30 °C 左右,从最适反应温度上来看詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的最适温度要大于植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的最适温度,因此詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶更适于高温生产 D-乳酸。

2.4 D-乳酸脱氢酶的最适酶反应 pH 值

分别在不同 pH 条件下的磷酸缓冲液中反应,把最高的活力算作 100%的活力。来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶(图 4A)和植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶(图 4B)分别在 pH 为 6.5 和 7.0 的时候酶的活力最高。

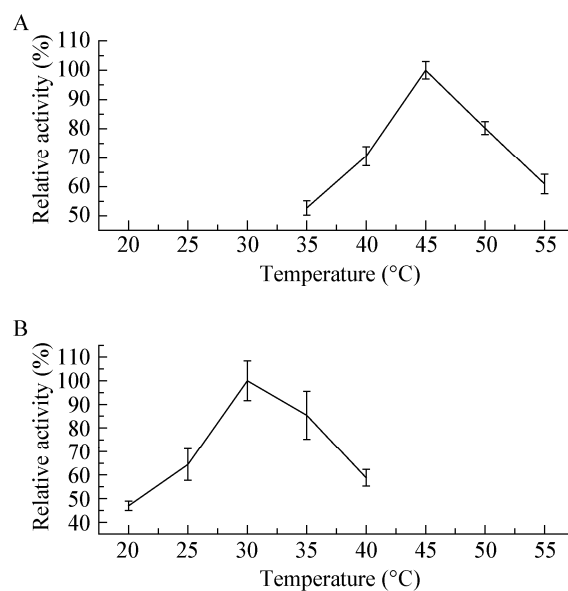


图3 D-乳酸脱氢酶最适反应温度的测定

Figure 3 The optimal temperature profile of the D-LDHs enzymatic activities

Note: A: The optimal temperature for D-LDH of *Lactobacillus jensenii*; B: The optimal temperature for D-LDH of *Lactobacillus plantarum*.

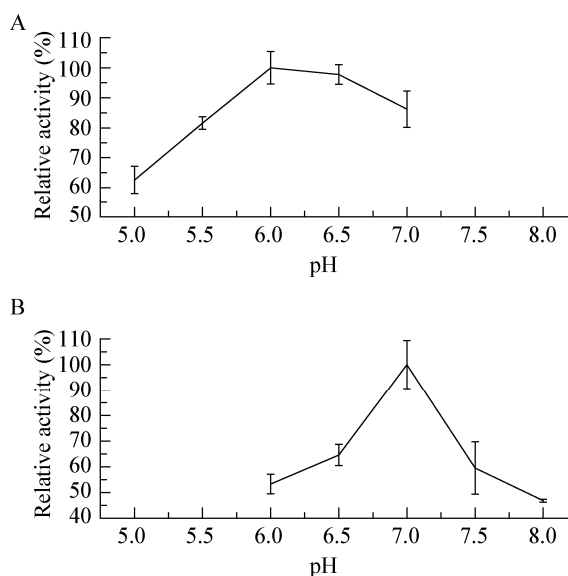


图4 D-乳酸脱氢酶的最适反应 pH 值

Figure 4 The optimal pH profile of the D-LDHs enzymatic activities

Note: A: The optimal pH for D-LDH of *Lactobacillus jensenii*; B: The optimal pH for D-LDH of *Lactobacillus plantarum*.

2.5 D-乳酸脱氢酶的热稳定性和热失活性的确定

将酶在不同温度下放置 10 min 后, 再测其酶活。根据酶活的大小判断在不同温度下 D-乳酸脱氢酶的稳定性。将放在 25 °C 的酶作为对照, 其反应活力为 100%, 其他则有相对的活力(图 5A)。来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的酶活力随着温度的升高热稳定性在缓慢的降低, 当温度达到 55 °C 以后时, 酶活力降低到 25 °C 的酶活力的一半, 60 °C 温浴后酶完全失活, 所以 T_{50}^{10} 要在 55–60 °C 之间。而来自植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶在温度达到 35 °C 之后, 酶活力迅速下降, 仅剩下 25 °C 下的酶活力的 25% 左右, T_{50}^{10} 仅在 35–40 °C 之间, 与来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的 T_{50}^{10} 相比低了近 20 °C, 表明来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶热稳定性良好。

将酶在同一温度下放置 0–90 min, 每 10 min 测其酶活, 根据酶活的大小判断在不同加热时间下的酶热失活性。将放置 0 min 的酶作为对照, 其反应活力为 100% 的活力, 计算其他的相对活力(图 5B)。来自植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶在加热初期

酶活力就迅速降到 40% 左右, $t_{1/2}$ 不足 10 min。而詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的酶活力虽然在开始温浴的 10 min 中里, 酶活力迅速降到 66%, 但之后酶活下降缓慢, 直至接近 80 min 时酶活力才降低到初始活力的 50%, $t_{1/2}$ 在 70–80 min 之间, 与来自植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶相比较, 具有较高耐热性。

2.6 D-乳酸脱氢酶动力学参数的确定

在各自最适反应条件下, 分别测定两种不同来源 D-乳酸脱氢酶的动力学参数。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 计算 D-乳酸脱氢酶对丙酮酸的 K_m 值、 k_{cat} 值以及 k_{cat}/K_m 值(表 1)。其中来自植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的 K_m 值约是来自詹氏乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的 K_m 值的 14 倍, 说明植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶对丙酮酸的亲合力不如詹氏乳杆菌。虽然来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的 k_{cat} 值要比来自植物乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的 k_{cat} 值低, 但是来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶对底物丙酮酸的亲和力更高(相差 13 倍), 从而使得 k_{cat}/K_m 值比来自植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的 k_{cat}/K_m 值高出 3 倍多, 表明其在 D-乳酸的生产上有更高的催化效率, 这些说明了来自詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶在生产 D-乳酸上更具潜力。

3 结论

随着聚乳酸产业对高光学纯 D-乳酸的需求不断增长, D-乳酸的发酵生产逐步受到重视。目前 D-乳酸发酵菌种均为常温菌株, 培养基及发酵系统需要灭菌处理, 并且操作过程中要求较高, 需要避免染菌, 从而提高了 D-乳酸的发酵成本。而在 L-

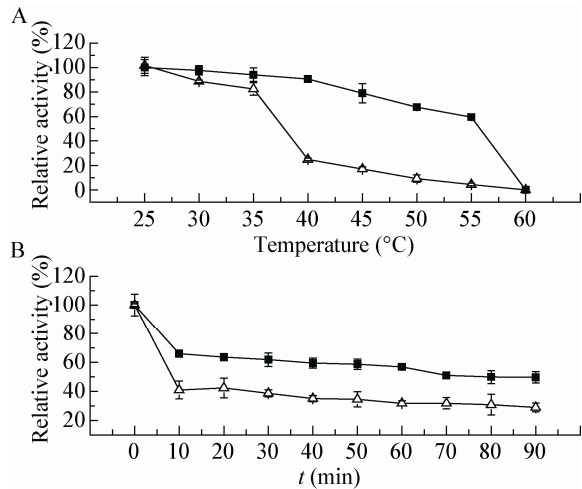


图 5 D-乳酸脱氢酶耐热性质的测定
Figure 5 The heat resistant properties of the D-LDHs
Note: A: The thermostability of the D-LDHs; B: The thermal inactivation of the D-LDHs. —■—: D-LDHs of *Lactobacillus jensenii*; —△—: D-LDHs of *Lactobacillus plantarum*.

表 1 D-乳酸脱氢酶的动力学参数 Table 1 Kinetic parameters of D-LDHs from <i>Lactobacillus jensenii</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>		
	<i>Lactobacillus jensenii</i> D-LDH	<i>Lactobacillus plantarum</i> D-LDH
K_m (mmol/L)	0.2±0.0	2.7±0.3
k_{cat} (s ⁻¹)	26.3±0.6	91.3±0.9
k_{cat}/K_m (L/(mol·s))	(11.0±0.5)×10 ⁴	(3.4±0.0)×10 ⁴

乳酸发酵中采用耐热的凝结芽孢杆菌作为发酵菌株,该菌株的最佳发酵温度在 50 °C 以上,可以采用不灭菌的开放式发酵工艺,从而显著降低了发酵成本^[12]。由于 D-乳酸脱氢酶的不耐热性,限制了 D-乳酸的高温发酵菌株的构建。本文通过基因资源发现,并分别克隆了来自詹氏乳杆菌和植物乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的基因,实现其在 *E. coli* BL21(DE3)中的高效异源表达。通过对两株菌的 D-乳酸脱氢酶的一系列酶学性质的比较,詹氏乳杆菌比目前报道的来自植物乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶的温度耐受性更佳,并且詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶的催化效率也远大于来自植物乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶的催化效率。通过本文获取的来自詹氏乳杆菌的耐温 D-乳酸脱氢酶,采用耐热的宿主,如凝结芽孢杆菌作为宿主,通过基因工程改造,替换原有的 L-乳酸脱氢酶,可以构建重组凝结芽孢杆菌,实现高光学纯 D-乳酸的高温开放式发酵,从而显著降低生产成本。

参 考 文 献

- [1] Cuong MN, Gyung JC, Yong HC, et al. D- and L-lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 81: 40-46
- [2] Hidaka T, Horie T, Akao S, et al. Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification[J]. Water Research, 2010, 44(8): 2554-2562
- [3] Zheng ZJ, Sheng BB, Ma CQ, et al. Relative catalytic efficiency of *ldhL*- and *ldhD*-encoded products is crucial for optical purity of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3480-3483
- [4] Michael AS, Marcus AM, Armel G, et al. Kinetic characterization of recombinant *Corynebacterium glutamicum* NAD⁺-dependent LDH over-expressed in *E. coli* and its rescue of an *lldDO*⁻ phenotype in *C. glutamicum*: the issue of reversibility re-examined[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(10): 731-740
- [5] Ma KD, Toshinari M, You HY, et al. Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient[J]. Bioresource Technology, 2014, 151: 28-35
- [6] Meng Y, Xue YF, Yu B, et al. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 334-339
- [7] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 524-534
- [8] Su Y, Rhee MS, Ingram LO, et al. Physiological and fermentation properties of *Bacillus coagulans* and a mutant lacking fermentative lactate dehydrogenase activity[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(3): 441-450
- [9] Gasser F, Doudoroff M, Contopoulos R. Purification and properties of NAD-dependent lactate dehydrogenases of different species of *Lactobacillus*[J]. Journal of General Microbiology, 1970, 62(2): 241-250
- [10] Wang XW, Zheng ZJ, Dou PP. Cloning, expression, purification, and activity assay of proteins related to D-lactic acid formation in *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2117-2123
- [11] Li Y, Wang LM, Ju JS, et al. Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 186-191
- [12] Peng LL, Wang LM, Che CC, et al. *Bacillus* sp. strain P38: an efficient producer of L-lactate from cellulosic hydrolysate, with high tolerance for 2-furfural[J]. Bioresource Technology, 2013, 149: 169-176