

芽孢杆菌 P38 中乳酸脱氢酶对其产 L-乳酸光学纯度的影响

孙丽璠^{1,2} 朱凌峰² 侯剑峰² 王艳萍^{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 北京 100101)

摘要:【目的】研究芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) P38 中乳酸脱氢酶对其产高光学纯 L-乳酸(光学纯度>99%)的影响。【方法】全基因组测序显示在该菌中存在 3 个乳酸代谢关键酶, 分别为 L-乳酸脱氢酶(L-LDH)、D-乳酸脱氢酶(D-LDH)和苹果酸或 L-乳酸脱氢酶(M/L-LDH)。通过将这 3 个酶进行异源表达、纯化与酶学特性分析, 结合 Native-PAGE、实时荧光定量 PCR 等方法, 初步确定该菌高产光学纯 L-乳酸的机理。【结果】*Bacillus* sp. P38 中 L-LDH 对丙酮酸的催化活性(K_{cat}/K_m 值)最高, 分别是 D-LDH 的 2.9 倍和 M/L-LDH 的 4.3 倍。其中 M/L-LDH 主要起 L-LDH 的功能。Native-PAGE 实验中未检测到 D-LDH 活性。*Bacillus* sp. P38 所有发酵阶段 *ldhL* 的转录水平平均高于 *ldhD* 和 *ldhM/L*。【结论】L-LDH 是 *Bacillus* sp. P38 产高光学纯 L-乳酸的主要关键酶。

关键词: L-乳酸脱氢酶, 芽孢杆菌, 光学纯度, 乳酸

Effect of lactate dehydrogenases on the optical purity of L-lactic acid produced in *Bacillus* sp. P38

SUN Li-Fan^{1,2} ZHU Ling-Feng² HOU Jian-Feng² WANG Yan-Ping^{1*}

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

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] This study is to investigate the effect of lactate dehydrogenases on the optical purity of L-lactic acid produced in *Bacillus* sp. P38. [Methods] Genome annotation result shows that there are three enzymes responsible for lactic acid production: L-lactate dehydrogenase (L-LDH) (encoded by *ldhL*), D-LDH (encoded by *ldhD*), and one possible malate/lactate-LDH (M/L-LDH) (encoded by *ldhM/L*). These enzymes were investigated both *in vivo* and *in vitro* to study the relationship between enzymatic activities, gene transcriptions and the optical purity of lactic acid. [Results] M/L-LDH was found mainly to act as L-LDH. The L-LDH catalytic efficiency toward pyruvate was 2.9-fold higher than that of D-LDH and 4.3-fold higher than that of M/L-LDH. The

*通讯作者: Tel: 86-22-60601400; ✉: ypwang40@163.com

收稿日期: 2014-11-06; 接受日期: 2015-02-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

D-LDH activity was not detectable in *Bacillus* sp. P38 under active staining. The relative transcription levels of *ldhL* in *Bacillus* sp. strain P38 were much higher than those of *ldhD* and *ldhM/L* at different growth phases, and the transcription ratio of *ldhL* to *ldhD* increased from the logarithmic phase to decline phase. **[Conclusion]** L-LDH is the key enzyme for high optical purity of L-lactic acid produced by *Bacillus* sp. P38.

Keywords: L-lactic dehydrogenase, *Bacillus* sp., Optical purity, Lactic acid

乳酸(Lactic acid)是一种能够由可再生碳水化合物转化而来的重要平台化合物,又名丙醇酸^[1]。目前已广泛应用于食品、医药、轻工、化工等行业,但其最重要的工业应用是用于合成生物可降解材料——聚乳酸^[2]。聚乳酸具有良好的生物相容性和降解性,是理想的绿色高分子材料,具有巨大的市场空间,有望替代石油基塑料产品^[3]。因此,高光学纯 L-乳酸的生产与应用已成为令人关注的重要研究方向之一。

微生物发酵法生产乳酸的技术已经取得重要进展,并成为乳酸商业化生产的主导技术。自然界中许多微生物都能利用还原糖发酵产生乳酸。单糖尤其是葡萄糖可作为碳源和能源,经 EMP 途径降解生产丙酮酸,丙酮酸又进一步在乳酸脱氢酶(LDH)的作用下生成乳酸^[4]。产 D,L-乳酸的乳杆菌中存在 L 和 D 两种依赖 NAD 的 LDH,分别催化丙酮酸生成 L-乳酸和 D-乳酸^[5]。

目前,乳酸生产菌株主要分为两类,一类是霉菌中的米根霉(*Rhizopus oryzae*),另一类是细菌中的乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)。乳酸菌是一类能利用可发酵碳水化合物产大量乳酸的细菌的通称。最早 LAB 的定义为:革兰氏阳性,无芽孢,接触酶为阴性,缺细胞色素,不好氧,耐酸,营养要求复杂,专性发酵糖,乳酸为其主要终产物等。随着细菌分类学的不断发展,又发现了一些新的、并不完全符合以上限定的 LAB,如芽孢乳杆菌属和少数芽孢杆菌属^[6]。米根霉发酵能量消耗大,糖酸转化率较低,而 LAB 中的芽孢杆菌具有营养要求简单、产酸速度快、发酵温度高(50–60 °C)、可实现开放式发酵、适应低 pH 条件,以及生产成本低等优点,逐渐受到重视^[7]。Tiina 等比较了凝结芽孢

杆菌(*Bacillus coagulans*) SIM-7 DSM 14043 与德氏乳杆菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactics* DSM 20073 生产 L-乳酸的发酵条件,结果表明 *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 对氮源要求低,能够生成高光学纯度的 L-乳酸,产酸速度快,L-乳酸的浓度在 21–22 h 达到 91.6 g/L,发酵温度可达到 65 °C^[8]。本研究所用的菌株 *Bacillus* sp. P38 是一株可耐受糠醛产 L-乳酸的芽孢杆菌,并且可以同时利用葡萄糖和木糖产 L-乳酸。利用玉米芯水解液为唯一碳源时,L-乳酸发酵水平超过 180 g/L,生产强度达到 2.4 g/(L·h),糖酸转化率达到 96%,光学纯度大于 99%。其发酵水平、生产强度、转化率在已报道的结果中均处于领先地位^[9]。目前,该菌株产高光学纯 L-乳酸的机理尚不清楚。

本研究以产高光学纯 L-乳酸生产菌株 *Bacillus* sp. P38 为研究对象,通过关键酶异源表达、纯化与酶学特性分析,结合 Native-PAGE、实时荧光定量 PCR 等生物学方法,系统地研究了该菌合成高光学纯 L-乳酸的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Bacillus* sp. P38 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC),保藏登记号为 CGMCC No. 7312,由中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室(中国科学院微生物研究所)提供。植物乳杆菌 *L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174 购自德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)

购自天根生化科技(北京)有限公司。

表达载体 pET-28a 为本实验室保存。重组质粒 pET-28a-ldhL、pET-28a-ldhD、pET-28a-ldhM/L 为本研究构建,分别含有来自 *Bacillus* sp. P38 的 L-乳酸脱氢酶基因、D-乳酸脱氢酶基因和苹果酸/L-乳酸脱氢酶基因。

1.1.2 培养基及培养条件: *Bacillus* sp. P38 接种于种子培养基(g/L, 葡萄糖 50, 酵母浸出粉 10, 碳酸钙 30)中, 45 °C、150 r/min 摇床培养。*L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174 接种于 MRS 培养基中, 30 °C 静置培养。含有重组质粒的大肠杆菌接种于 LB 培养基(含 40 mg/L 卡那霉素)中, 37 °C、180 r/min 摇床培养。培养基配方参照文献[10]。

1.1.3 主要仪器和试剂: 限制性内切酶、T4 连接酶、*ExTaq* 酶、Real-time PCR 试剂盒等均购自 TaKaRa 公司。RNA 反转录试剂盒、基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒小提试剂盒、纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒购自美国 Omega Biotek 公司。Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒

购自康为世纪有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆和表达: *Bacillus* sp. P38 全基因组序列信息(GenBank 登录号: JSV101000000)显示, 该菌株具有 3 个与乳酸代谢相关的基因: *ldhL*、*ldhD* 和 *ldhM/L*, 分别编码 L-乳酸脱氢酶(L-LDH)、D-乳酸脱氢酶(D-LDH)和苹果酸/乳酸脱氢酶(M/L-LDH)。根据基因组信息设计引物(表 1), 使用 *Pfu* DNA 聚合酶分别扩增得到 3 个基因。将基因片段经合适的限制性内切酶酶切后连接到表达载体 pET-28a 上, 构建得到重组质粒 pET28a-*ldhL*、pET28a-*ldhD*、pET28a-*ldhM/L*, 重组质粒经双酶切并测序验证正确后分别转化到 *E. coli* BL21 (DE3)中。

分别将含 3 种重组载体的 *E. coli* BL21(DE3)以 1%接种量接种到 LB 液体培养基中(含 40 mg/L 卡那霉素), 37 °C、180 r/min 振荡培养。当 *OD*₆₀₀ 达到 0.6-0.8 时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 16 °C 过夜诱导蛋白表达。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

目的基因 Target gene	序列 Sequence (5'→3')
<i>ldhL</i> 扩增引物 <i>ldhL</i> amplification primer	GGG <u>CCAT</u> GGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCATGAAAAAACTCAATCGTATTGCAG CCG <u>CTCGAG</u> CAATACCGGTGCCATCGTTTC
<i>ldhD</i> 扩增引物 <i>ldhD</i> amplification primer	GGG <u>CCAT</u> GGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCATGAGAAAAGTTGTTGCCTATGAGACG CCG <u>CTCGAG</u> TGATTTTATCTCCCACCTGCTC
<i>ldhM/L</i> 扩增引物 <i>ldhM/L</i> amplification primer	GGG <u>CCAT</u> GGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACGTGAAAAAGACAAAATTAGTAGTTGC CCG <u>CTCGAG</u> CGATTTTCCGGTTTTTACCGATGCC
<i>ldhL</i> Real-time PCR 引物 <i>ldhL</i> Real-time PCR primer	CGGCAGTATTGTTGCGAAA ACTACGGCACCACGGGAAC
<i>ldhD</i> Real-time PCR 引物 <i>ldhD</i> Real-time PCR primer	AAGGCGATTATCCGATTGC ACTGTCCCCGAACCGATAAC
<i>ldhM/L</i> Real-time PCR 引物 <i>ldhM/L</i> Real-time PCR primer	TGCTTTTGTATGTCCTGAATGGG GCCGATGACACTTGGTATGCTTA
16S rRNA 基因 16S rRNA gene	TGGTCTGTAAGTACGCTGAGG GGGAGGTCAGAGGATGTCAAGA

1.2.2 重组蛋白的纯化: 由于重组蛋白 N 端含组氨酸标签 His-Tag, 因此使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化。菌体的超声波破碎、层析柱的平衡、可溶性蛋白的上样及杂蛋白的清洗等过程参照试剂盒手册进行。目的蛋白用 2 mL Elution buffer (pH 7.9 Tris-HCl 4 mmol/L, 咪唑 60 mmol/L, NaCl 0.1 mol/L) 洗脱并通过超滤管脱盐、浓缩后于 -80°C 保存。收集各阶段的洗脱液进行 SDS-PAGE (13%分离胶, 4%浓缩胶) 电泳和考马斯亮蓝(R-250) 染色分析^[10]。

1.2.3 酶活测定: 乳酸脱氢酶活性测定采用分光光度法, 以丙酮酸钠为底物, NADH 为辅酶, 利用 340 nm 处检测 NADH 的减少量来表征^[12]。具体反应体系(200 μL)为: 磷酸缓冲液(pH 7.0) 100 mmol/L, 丙酮酸钠 20 mmol/L, NADH 0.2 mmol/L, 酶液适量, 测定温度为 37°C 。空白对照中不含 NADH。

乳酸脱氢酶的一个酶活单位(1 U)定义为: 在特定条件下, 每分钟内氧化 1 μmol NADH 所需要的酶量。

1.2.4 重组蛋白的动力学参数测定: 在测得以上各酶的最适反应温度和最佳 pH 后, 在最佳酶活测定条件下, 以不同浓度的底物测定酶活, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 计算 L-LDH、D-LDH、M/L-LDH 对丙酮酸钠的 K_m 值、 V_{\max} 值、 K_{cat} 值以及 K_{cat}/K_m 值^[13]。

1.2.5 Native-PAGE 检测 LDH 在体内的活性: 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)活性染色技术用于检测 *Bacillus sp.* P38 体内 LDHs 的活性。利用 *Bacillus sp.* P38 和 *L. plantarum ssp. plantarum* DSM 20174 的粗酶液进行非变性聚丙烯酰胺凝胶梯度(4%–12%)电泳。电泳后将每条泳道切成胶条进行染色, 其中 Marker 部分采用考马斯亮蓝法, 其他部分浸泡在底物溶液中进行显色。底物溶液组成为: 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 0.1 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium blue chloride), 1 mmol/L NAD, 100 mmol/L DL-乳酸钠。染色温度为室温, 待酶带清晰后, 用蒸馏

水漂洗 2–3 次。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 分析: 实时荧光定量 PCR 用于分析 *Bacillus sp.* P38 中乳酸代谢相关基因在不同发酵时期(对数期、稳定期、衰亡期)的转录水平。提取 P38 三个发酵阶段的 RNA, 电泳检测样品完整性, 并在 260 nm 波长下测定样品浓度。3 个时期的 RNA 样品分别作为模板进行反转录生成 cDNA。以 16S rRNA 基因为内参, 用 Premier 5.0 软件设计 *Bacillus sp.* P38 中各关键酶编码基因和 16S rRNA 基因序列的高特异性引物(表 1)。采用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 进行实时定量 PCR, 每个样品做 3 个平行且保证 3 个平行的误差在 15%之内。

1.2.7 分析方法: *Bacillus sp.* P38 菌体破碎粗酶液里 LDHs 活性是利用液相手性色谱柱检测 L-乳酸和 D-乳酸的产量来测定。方法如下: 将 20 mmol/L 丙酮酸、20 mmol/L NADH 以及 0.1 g/L P38 粗酶液在 37°C 孵育 1 h, 利用液相手性色谱柱检测 L-乳酸和 D-乳酸的生成量。测定条件为: 手性柱流动相为 2 mmol/L CuSO_4 , 流速 0.5 mL/min, 柱温 25°C , 进样 5 μL , 紫外检测器检测, 检测波长 254 nm。发酵液中葡萄糖和 L-乳酸用 SBA-40C Biosensor 来检测。*Bacillus sp.* P38 生长曲线采用 7200 Visible Spectrophotometer 在 A_{600} 条件下测定。L-乳酸光学纯度的计算公式如下:

$$\text{L-乳酸光学纯度} = \frac{(\text{L-lactic acid})}{(\text{L-lactic acid}) + (\text{D-lactic acid})} \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的纯化

构建的重组质粒 pET28a-ldhL、pET28a-ldhD、pET28a-ldhM/L 经双酶切和测序验证正确后, 分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中进行诱导表达。由于目的蛋白携带 His 标签, 所以通过 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行蛋白纯化。纯化后的蛋白利用 SDS-PAGE 进行检测, 得到单一条带(图 1), 其中 L-LDH 为 34.4 kD, D-LDH 为 36.3 kD, L/M-LDH

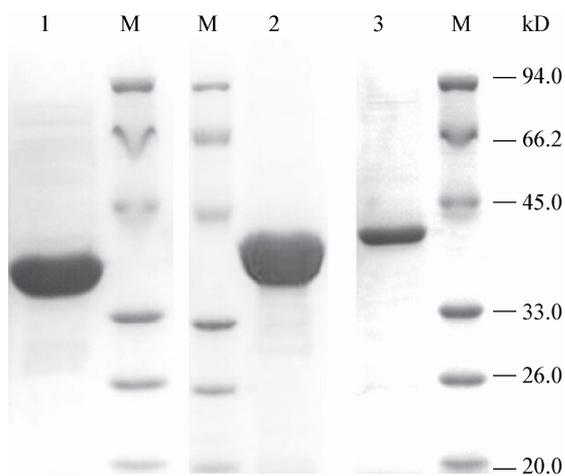


图 1 L-LDH、D-LDH、M/L-LDH 的 SDS-PAGE 分析
Figure 1 Analysis of purified L-LDH, D-LDH, M/L-LDH by SDS-PAGE

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: L-LDH; 2: D-LDH; 3: M/L-LDH of *Bacillus* sp. P38.

为 36.7 kD, 与预测目的蛋白大小一致。收集纯化的蛋白进行后续的酶学性质研究。

2.2 体外酶活

在各自最适反应条件下测定 L-LDH、D-LDH 和 M/L-LDH 的动力学参数, 计算其 K_m 值、 V_{max} 值、 K_{cat} 值以及 K_{cat}/K_m 值(表 2)。经检测 *Bacillus* sp. P38 中乳酸代谢关键酶 L-LDH、D-LDH 和 M/L-LDH 均具有催化活性, 其中 L-LDH 的 K_m 值最低, 为 3.73 ± 0.19 。L-LDH 对丙酮酸的催化效率 (K_{cat}/K_m 值)为 $(7.98 \pm 0.80) \times 10^3$, 远高于 D-LDH 的 $(2.96 \pm 0.30) \times 10^3$ 。体外酶学性质研究得出 L-LDH 对丙酮酸的催化效率和结合能力都比 D-LDH 高, 初步说明了 *Bacillus* sp. P38 合成高光学纯 L-乳酸的原因。

为了研究 M/L-LDH 的主要功能, 分别检测了 M/L-LDH 作为 L-LDH 和 M-LDH 的活性, 作为

L-LDH 时的酶活为 2.83 U, 作为 M-LDH 时的酶活为 1.47 U。同时以苹果酸为底物进行 *Bacillus* sp. P38 全细胞 Native-PAGE 未检测到苹果酸脱氢酶的活性。为了证明 3 种酶的产物的光学性质, 采用高效液相色谱方法分别对 3 种酶以丙酮酸为底物、NADH 为辅酶时的产物进行检测。结果显示 L-LDH、M/L-LDH 的产物均为 L-乳酸, 检测不到 D-乳酸。所以, M/L-LDH 主要行使 L-LDH 的功能。同时, L-LDH 的 K_m 值(4.10 ± 0.20)低于 M/L-LDH (5.14 ± 0.11), L-LDH 对丙酮酸的催化效率(K_{cat}/K_m)为 $(7.98 \pm 0.80) \times 10^3$ L/(mol·s) 远高于 M/L-LDH $(1.80 \pm 0.20) \times 10^3$ L/(mol·s), 值得指出的是该酶的主要功能是 L-乳酸脱氢酶, 其催化产物也证实不产生 D-乳酸, 所以该酶不会影响 *Bacillus* sp. P38 菌产生乳酸的光学纯度。

2.3 体内酶活检测

通过全细胞 Native-PAGE 对体内酶活进行了验证(图 2), *Bacillus* sp. P38 中只检测到 L-LDH, 而对对照菌 DSM 20174 (DL-乳酸生产菌)同时检测到 D-LDH 和 L-LDH。说明 *Bacillus* sp. P38 在乳酸发酵过程中 D-LDH 无活力或者活力很低(低于 Native-PAGE 的检测限), 而 L-LDH 的活力较高。

2.4 发酵过程中乳酸合成相关基因转录水平的变化

虽然通过体内酶活检测并未测定到 D-LDH 的酶活力, 但是其 D-LDH 的酶活力是否在发酵过程中有所变化, 从而影响了 P38 菌在不同培养阶段所产乳酸的光学纯度? 为此我们进一步测定了 *Bacillus* sp. P38 在发酵过程中合成的乳酸光学纯度的变化情况, 结果如图 3 所示。在发酵初始阶段, 培养基中 L-乳酸的光学纯度只有 81.1%, 在对数生

表 2 *Bacillus* sp. strain P38 中 D-LDH、L-LDH、M/L-LDH 的动力学参数
Table 2 Kinetic parameters of D-LDH, L-LDH, M/L-LDH from *Bacillus* sp. P38

动力学参数 Kinetic parameter	D-LDH	L-LDH	M/L-LDH
K_m (mmol/L)	4.10±0.20	3.73±0.19	5.14±0.11
V_{max} (U/mg)	20.270±1.800	50.446±1.430	15.300±0.830
K_{cat} (s^{-1})	12.64±1.13	29.78±1.37	9.25±0.60
K_{cat}/K_m (L/(mol·s))	$(2.96 \pm 0.30) \times 10^3$	$(7.98 \pm 0.80) \times 10^3$	$(1.80 \pm 0.20) \times 10^3$

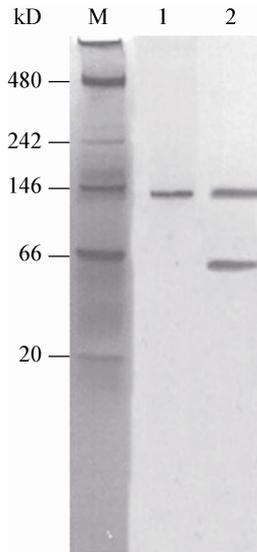


图2 *Bacillus* sp. P38 和 *L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174 Native-PAGE

Figure 2 Native-PAGE of *Bacillus* sp. P38 and *L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174

注: M: Native marker. *Bacillus* sp. strain P38 (1) 和 *L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174 (2) 以 DL-乳酸钠为底物, 全细胞 Native-PAGE 检测 nLDHs.

Note: M: Native marker. Active staining of nLDHs after Native-PAGE cell extracts of *Bacillus* sp. strain P38 (lane 1), *L. plantarum* ssp. *plantarum* DSM 20174 (lane 2), were used for the Native-PAGE. DL-Lactate was used as substrates for active staining.

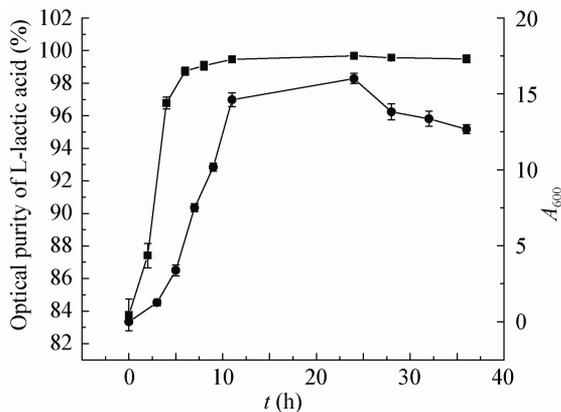


图3 *Bacillus* sp. P38 生长曲线和发酵过程中光学纯度变化

Figure 3 The profile of growth curve and the change of optical purity of produced L-lactic acid by *Bacillus* sp. P38 during fermentation

Note: ■: The growth curve of *Bacillus* sp. P38; ◆: Time course of optical purity of L-lactic acid produced.

长期(2-11 h)内迅速增长到 99.36%, 稳定期(24 h)达到最大为 99.60%。

为了了解发酵过程中关键酶的表达情况, 我们通过实时荧光定量 PCR 检测了不同时期乳酸合成相关基因的转录水平。实验数据分析采用经典的 $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ 法。结果如图4所示 *Bacillus* sp. P38 中对数期的转录水平分别是 *ldhD* 和 *ldhM/L* 的 409.44 倍和 20.23 倍, 在稳定期分别是 *ldhD* 和 *ldhM/L* 的 506.18 和 26.35 倍, 在衰亡期分别是 *ldhD* 和 *ldhM/L* 的 557.73 倍和 43.78 倍。由于体外酶活证实 M/L-LDH 主要表现为 L-LDH 的酶活力。如果将 *ldhL* 和 *ldhM/L* 的转录水平合并与 *ldhD* 比较, 在 *Bacillus* sp. P38 菌生长对数期时, L-乳酸合成相关的 *ldhL* 和 *ldhM/L* 的转录水平是 D-乳酸合成相关的 *ldhD* 转录水平的 429.86 倍, 稳定期是 525.64 倍, 衰亡期是 570.51 倍。可见 L-乳酸合成相关基因的转录水平在 *Bacillus* sp. P38 中远远高于 D-乳酸合成相关的基因, 这也很好地解释了 *Bacillus* sp. P38 高产光学纯 L-乳酸的原因。实验结果还表明, 同一种乳酸合成基因在对数期的转录水平最高, 衰亡期转录水平最低, 这也与所产乳酸光学纯度在发酵各阶段的变化相吻合。

3 讨论

Bacillus sp. P38 是一株具有代表性的产高光学纯 L-乳酸的菌株, 所产乳酸单体光学纯度高达 99.6%。在应用中, 该菌所具有的营养要求低、发酵温度高, 可实现开放式发酵等优点还可以大大降低生产成本, 具有工业大规模生产的潜力。本研究分别从基因、转录和蛋白水平对该菌的乳酸合成进行了比较分析, 并结合体外酶学方法揭示关键酶在 *Bacillus* sp. P38 中的功能, 以揭示 *Bacillus* sp. P38 产高光学纯 L-乳酸的机理, 为该菌株的工业化应用奠定理论基础。

同型乳酸发酵与异型乳酸发酵是乳酸代谢的两种途径。同型乳酸发酵中乳酸是葡萄糖代谢的唯一产物, 经糖酵解途径, 1 mol 葡萄糖可生成 2 mol 乳酸, 理论转化率为 100%。但发酵过程中微生物

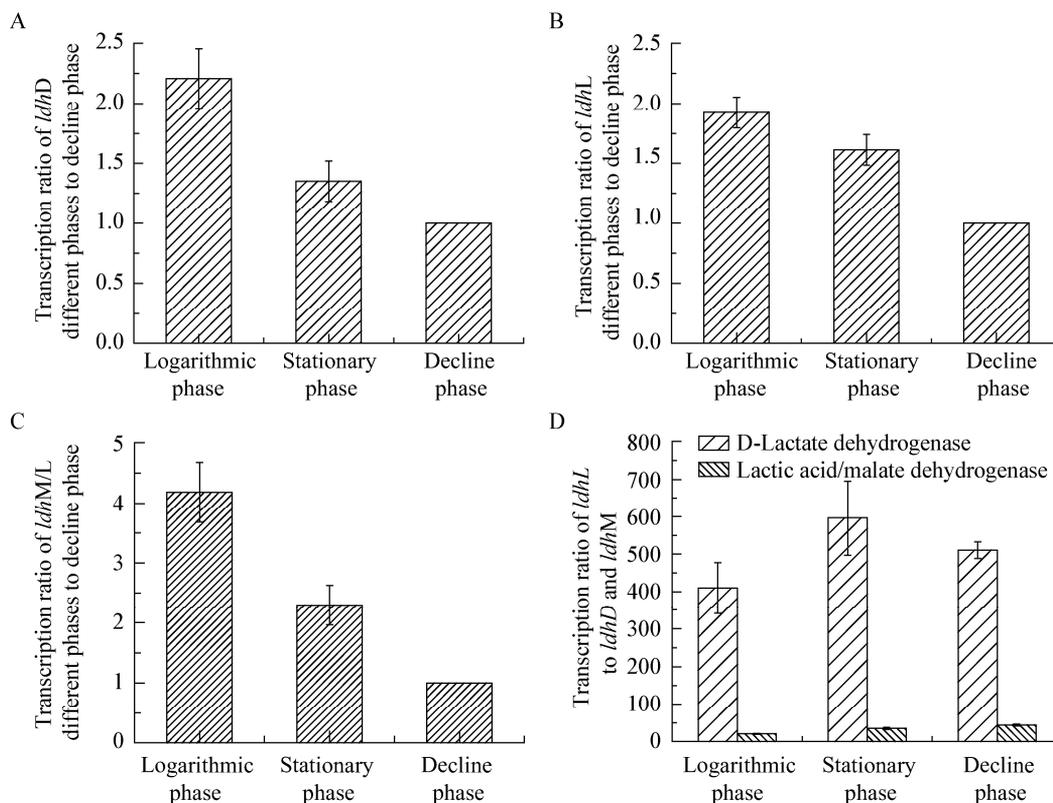


图 4 RT-PCR 分析 L-LDH、D-LDH、M/L-LDH 各发酵阶段转录水平

Figure 4 Determination of the relative transcription levels of *ldhD*, *ldhL*, and *ldhM/L* by RT-PCR analyses

注：不同发酵阶段 *ldhD* (A)、*ldhL* (B)、*ldhM/L* (C) 的转录水平变化；不同发酵阶段 *ldhD* (D) 和 *ldhM/L* 相对于 *ldhL* 的转录水平变化。
 Note: Transcript ratio of *ldhD* (A) different phases to decline phase in *Bacillus* sp. P38, *ldhL* (B) different phases to decline phase in *Bacillus* sp. P38, *ldhM/L* (C) different phases to decline phase in *Bacillus* sp. P38, *ldhD* (D) and *ldhM/L* to *ldhL* at different growth phases in *Bacillus* sp. P38. Error bars represent the standard deviations of the means of three independent experiments.

存在其他生理活动，实际转化率在 80% 以上的即认为是同型乳酸发酵。异型乳酸发酵则经由磷酸戊糖途径生成等摩尔的乳酸、二氧化碳和乙醇(或乙酸)^[13]。产 D,L-乳酸的乳酸菌中存在 L 和 D 两种依赖 NADH 的 LDH，分别催化丙酮酸生成 L-乳酸和 D-乳酸。如果使乳杆菌的 *ldhD* 缺失，则只生产高光学纯度的 L-乳酸(理论上光学纯度可达到 100%)，同时可以大幅提高 L-乳酸产量。反之，如果使 *ldhL* 缺失则生产高光学纯度的 D-乳酸^[15]。赵蕊等通过重组 NADH 氧化酶研究了其对乳酸脱氢酶乳酸氧化活性的影响，得出在 NADH 经呼吸链代谢掉的生理条件下，LDH 催化乳酸氧化的能力会明显提高的结论^[16]。朱龙宝等通过构建过量表达乳酸脱氢酶的重组干酪乳杆菌，提高干酪乳杆菌

发酵产乳酸的能力。为了进一步提高其产酸能力，添加 4 mmol/L 激活剂 FBP 和 8 mg/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)前体物烟酸，结果表明，重组菌 *L. casei* pMG-*ldh* 乳酸积累 128.2 g/L，生产强度达到 3.04 g/(L·h)，较原始菌株 *L. casei* 分别提高了 35% 和 53%，发酵周期缩短 6 h^[17]。然而，关于乳酸脱氢酶活力变化对所产乳酸光学纯度的研究国内未见报道。

本研究中 *Bacillus* sp. P38 的 3 个乳酸代谢关键酶(L-LDH、D-LDH、M/L-DH)中 L-LDH 和 D-LDH 对丙酮酸的相对催化效率差异很大，L-LDH 催化活性高于 D-LDH， K_m 值小于 D-LDH，说明不同菌株中的 L-LDH 和 D-LDH 对该菌株所产乳酸光学纯度的影响可能是催化效率的差异造成的。Native-PAGE

结果表明 *Bacillus* sp. P38 中只检测到 L-LDH 的活性, 转录水平分析结果显示, *ldhL* 的转录水平在整个发酵阶段都远远高于另外两个基因, 这两个结果充分解释了 *Bacillus* sp. P38 合成高光学纯 L-乳酸的原因。同时 *ldhD* 的低水平转录也解释了 *Bacillus* sp. P38 的产物中含有少量 D-乳酸的原因。结合 *Bacillus* sp. P38 各发酵阶段产物光学纯度和基因转录水平进行分析, 结果表明 3 个乳酸代谢关键基因转录水平从对数期到衰亡期逐渐降低。对数期基因转录水平最高, 与 L-乳酸对数期的光学纯度一致, 随后基因转录水平逐渐降低, 相应的 L-乳酸光学纯度趋于常数。

综上所述, 尽管 *Bacillus* sp. P38 全基因组中同时编码了 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶, 但 L-乳酸脱氢酶对底物催化活性要高于 D-乳酸脱氢酶, 体内基本检测不到 D-乳酸脱氢酶的活性。转录水平上的研究也证实, L-乳酸脱氢酶基因的转录水平远远高于 D-乳酸脱氢酶基因的转录, 这也初步阐明了 *Bacillus* sp. P38 合成高光学纯乳酸的机理。

参 考 文 献

- [1] Jiang X, Xue YF, Wang AY, et al. Efficient production of polymer-grade L-lactate by an alkaliphilic *Exiguobacterium* sp. strain under nonsterile open fermentation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 665-668
- [2] Gao C, Ma CQ, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 930-939
- [3] Fan Y, Zhou C, Zhu X. Selective catalysis of lactic acid to produce commodity chemicals[J]. *Catalysis Reviews*, 2009, 51(3): 293-324
- [4] Okano K, Tanaka T, Ogino C, et al. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 413-423
- [5] Wang LM, Zhao B, Liu B, et al. Efficient production of L-lactic acid from corn cob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(20): 7908-7915
- [6] Guo XH, Ling DW. Lactic Acid Bacteria Modern Research Techniques[M]. Beijing: Science Press, 2013: 4 (in Chinese)
- [7] 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 4
- [7] Wang LM, Xue ZW, Zhao B, et al. Jerusalem artichoke powder: a useful material in producing high-optical-purity L-lactate using an efficient sugar-utilizing thermophilic *Bacillus coagulans* strain[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 174-180
- [8] Tiina M, Karin K, Eerik J. et al. L-(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 39(4): 861-867
- [9] 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
- [10] Fan XR, Sheng P, Li GW. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 67-72 (in Chinese)
- [10] 范秀容, 沈萍, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 67-72
- [11] 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: 248-254
- [12] Wrba A, Jaenicke R, Huber R, et al. Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermotoga maritima*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 188(1): 195-201
- [13] Zheng Z, Sheng B, Ma C, et al. Relative catalytic efficiencies of *ldhL*- and *ldhD*-encoded products is crucial for optical purity of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3480-3483
- [14] Wang HY, Liu M, Wang HJ, et al. Microorganism metabolic engineering in lactic acid production[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, 6(3): 512-516 (in Chinese)
- [14] 王海燕, 刘铭, 王化军, 等. 乳酸生产中的微生物代谢工程[J]. *过程工程学报*, 2006, 6(3): 512-516
- [15] Li J, Tang Y, Liang FL, et al. Cloning and function analysis of L-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus* sp. MD-1[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(5): 725-729 (in Chinese)
- [15] 李剑, 唐贇, 梁凤来, 等. L-乳酸脱氢酶基因克隆及功能分析[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 725-729
- [16] Zhao R, Huo GC. Effects of recombinant NADH oxidase on the lactate oxidation activity of lactate dehydrogenase[J]. *Journal of Anhui Agriculture*, 2013, 41(5): 1918-1919, 1927 (in Chinese)
- [16] 赵蕊, 霍贵成. 重组 NADH 氧化酶对乳酸脱氢酶乳酸氧化活性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(5): 1918-1919, 1927
- [17] Zhu LB, Ge F, Li WZ, et al. Over-expression of lactate dehydrogenase in *L. casei* and fermentation property of the recombinant strain[J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 245-249 (in Chinese)
- [17] 朱龙宝, 葛飞, 李婉珍, 等. 过量表达乳酸脱氢酶的重组干酪乳杆菌构建及发酵性能[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 245-249