

假肠膜明串珠菌HL64中关键D-乳酸脱氢酶的鉴定及其酶学性质研究

李鹏, 刘兰, 王通, 黄筱萍

Identification and Enzymatic Properties of the Key D-Lactate Dehydrogenase in *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64

LI Peng, LIU Lan, WANG Tong, and HUANG Xiaoping

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070333>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高光纯D-乳酸生产菌株假肠膜明串珠菌HL64-1的分离鉴定及其发酵特性

Isolation, Identification and Fermentation Characterization of *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64-1 Producing D-Lactic Acid with High Optical Purity

食品工业科技. 2024, 45(11): 133-141 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070102>

基于分子动力学模拟研究温度对乳酸脱氢酶活性的影响

Investigation on the Effect of Temperature on the Activity of Lactate Dehydrogenase Based on Molecular Dynamics Simulation

食品工业科技. 2022, 43(1): 134-140 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010025>

假肠膜明串珠菌HDL-3胞外多糖的分离纯化及结构性质分析

Isolation, Purification and Structural Properties Analysis of Exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudointestinalis* HDL-3

食品工业科技. 2022, 43(21): 115-122 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020092>

鼠李糖乳杆菌L-乳酸脱氢酶的生物信息学分析和基因克隆

Bioinformatics Analysis and Gene Cloning of L-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus rhamnosus*

食品工业科技. 2023, 44(11): 153-162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080109>

来源于*P. bacterium* 1109的甘露醇脱氢酶的重组纯化及酶学性质研究

Purification and Characterization of Recombinant Mannitol Dehydrogenase from *P. bacterium* 1109

食品工业科技. 2020, 41(19): 137-143,165 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.022>

弱酸特性D-来苏糖异构酶分子改造及D-甘露糖生产

Molecular Modification of D-lyxose Isomerase with Weak Acid Characteristic and D-mannose Production

食品工业科技. 2021, 42(17): 129-137 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020066>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

李鹏, 刘兰, 王通, 等. 假肠膜明串珠菌 HL64 中关键 D-乳酸脱氢酶的鉴定及其酶学性质研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 165-172. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070333

LI Peng, LIU Lan, WANG Tong, et al. Identification and Enzymatic Properties of the Key D-Lactate Dehydrogenase in *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 165-172. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070333

· 生物工程 ·

假肠膜明串珠菌 HL64 中关键 D-乳酸脱氢酶的鉴定及其酶学性质研究

李 鹏*, 刘 兰, 王 通, 黄筱萍

(江西省科学院微生物研究所, 江西南昌 330096)

摘要: 假肠膜明串珠菌 HL64 合成高光学纯度 D-乳酸, 然而, 关键 D-乳酸脱氢酶尚不清晰。本文旨在通过全基因组测序, 鉴定关键 D-乳酸脱氢酶及其酶学性质, 为进一步改造假肠膜明串珠菌 HL64 合成 D-乳酸提供理论依据。半定量 PCR 初步确定关键 D-乳酸脱氢酶, 克隆该基因, 进行体外表达与纯化, 深入研究相关酶学性质。结果表明 LDH2 (OYT93_08575) 编码关键 D-乳酸脱氢酶, 其最适 pH 和反应温度分别是 pH8 和 30 °C。LDH2 对丙酮酸及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的 K_m 值分别为 0.578 mmol/L 及 0.275 mmol/L, 对丙酮酸的 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 值分别为 45.04 s^{-1} 及 $7.88 \times 10^4 \text{ L/(mol \cdot s)}$, 表明 LDH2 对丙酮酸具有较高催化效率。除了将丙酮酸作为底物以外, LDH2 对草酰乙酸及苯丙酮酸也具备一定的催化能力。

关键词: 假肠膜明串珠菌, 全基因组测序, D-乳酸, D-乳酸脱氢酶, 酶学性质, 酶动力学

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0165-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070333

本文网刊:



Identification and Enzymatic Properties of the Key D-Lactate Dehydrogenase in *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64

LI Peng*, LIU Lan, WANG Tong, HUANG Xiaoping

(Institution of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

Abstract: D-Lactic acid was produced with high purity by *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64. However, the key lactate dehydrogenase responsible for this biosynthesis remained undetermined. To address this, a systematic approach was implemented: Complete genome sequencing was conducted to annotate potential dehydrogenase genes, semiquantitative PCR was utilized to prioritize target candidates, and the putative D-lactate dehydrogenase gene was cloned *in vitro*, expressed heterologously, and purified for biochemical analysis. Enzymatic properties including substrate affinity and thermostability were characterized, establishing a foundation for subsequent strain engineering aimed at metabolic pathway optimization. The catalytic properties of LDH2 (OYT93_08575) were systematically characterized through biochemical assays. It was identified as encoding the key D-lactate dehydrogenase, with optimal reaction conditions determined to be pH8.0 and 30 °C. Kinetic analysis revealed that the K_m values were calculated as 0.578 mmol/L for pyruvate and 0.275 mmol/L for NADH. Notably, catalytic constant (K_{cat}) of 45.04 s^{-1} and catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) of $7.88 \times 10^4 \text{ L/(mol \cdot s)}$ were observed for pyruvate, respectively, suggesting superior substrate affinity and turnover capacity. Substrate specificity profiling demonstrated that oxaloacetic acid and phenylpyruvate were also catalytically converted by this enzyme, though with lower efficiency compared to the primary substrate.

Key words: *Leuconostoc pseudomesenteroides*; complete genome sequencing; D-lactic acid; D-lactate dehydrogenase; enzymatic property; enzymatic kinetic

收稿日期: 2024-07-24

基金项目: 江西省科学院重点研发计划项目 (2022YSBG22011, 2021YSBG21014, 2022YSBG21007)。

作者简介/通信作者*: 李鹏 (1986-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 乳酸菌合成乳酸遗传改造及 II 型毒素-抗毒素系统的识别和功能鉴定, E-mail:

pengli_jx@126.com

乳酸(lactic acid, LA)是世界公认的三大有机酸之一,广泛应用于食品、医药等行业^[1]。单体乳酸包含 D-乳酸及 L-乳酸两种同分异构体,由于人体只能代谢 L-乳酸,使得 L-乳酸在食品及工业领域具有更广的应用前景,并且 L-乳酸研究和开发的历史更长^[2]。因此,相对于 D-乳酸,微生物发酵生产 L-乳酸的相关技术更加成熟。然而,一方面, D-乳酸是多种手性化合物的合成前体,另一方面,高光学纯度 D-乳酸在聚乳酸材料领域的开发和应用,导致全球对 D-乳酸的需求量急剧增加^[3]。

通过化学合成、酶合成及微生物发酵等方法均可以合成乳酸。然而,相对于化学合成及酶合成等方法,微生物发酵合成乳酸具备生产过程安全可靠、反应条件温和及成本较低等优势,已经成为合成乳酸尤其是高光学纯度乳酸的主要途径^[4]。将能够利用可发酵型碳水化合物合成乳酸的革兰氏阳性菌统称为乳酸菌,目前已知的乳酸菌至少有 11 个属^[5]。目前报道比较多的产 D-乳酸的发酵菌株包括德氏乳杆菌^[6]和芽孢乳杆菌^[7]。

乳酸菌中乳酸合成途径中的关键酶是乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),根据催化产物的不同,LDH 有 D-LDH(EC 1.1.1.28) 及 L-LDH(EC 1.1.1.27)两种,分别催化丙酮酸的还原产生 D-乳酸及 L-乳酸。乳酸菌基因组通常包含多个 LDH 编码基因,然而,一般只有一个或两个 LDH 能够有效表达且具备催化活性,如肠膜明串珠菌 ATCC8293 基因组包含 7 个 LDH 编码基因,然而研究发现只有 LEUM_1756、LEUM_2043 和 LEUM_0445 三个 LDH 能够有效表达^[8],而来源于菊糖芽孢乳杆菌的三个 LDH,只有 LDH1 能够有效催化丙酮酸还原产生乳酸^[9],类似的现象也发生在柠檬明串珠菌中^[10]。目前,关于乳酸菌中 LDH 的酶学性质的研究较多,如来自植物乳杆菌^[11]、棒状乳杆菌^[12]、乳酸乳杆菌^[13]、德氏乳杆菌^[14]、詹氏乳杆菌^[15]、肠膜明串珠菌^[16]、菊糖芽孢乳杆菌^[9]及柠檬明串珠菌^[17]等编码的 LDH 的酶学性质已被报道。

然而,假肠膜明串珠菌来源的 LDH 的研究相对较少,并且不同来源的 LDH 在酶学特性方面存在较大差异。前期工作中,本课题组在腐烂的果品中成功分离到了一株乳酸菌,经过分子鉴定,命名为假肠膜明串珠菌 HL64,发酵实验结果表明该菌株能合成光学纯度 99.8% 以上的 D-乳酸;并且发酵 24 h 可以产生 62.18 g/L 的 D-乳酸,通过补充碳源,发酵 72 h 后, D-乳酸的产量提高到了 78.74 g/L^[18]。为探索该菌株 D-乳酸的合成潜力,后续将对 D-乳酸合成通路及其竞争通路进行遗传改造,然而,目前还不清楚该菌株中负责 D-乳酸合成的关键乳酸脱氢酶。鉴于此,本研究以高光学纯度 D-乳酸产生菌假肠膜明串珠菌 HL64 为研究对象,通过全基因组测序,识别假肠膜明串珠菌 HL64 菌株基因组中潜在的 LDH 编

码基因,利用半定量 PCR 等手段鉴定负责 D-乳酸合成的关键 LDH 基因,在 *E. coli* 中对 LDH 基因进行过表达及纯化,研究关键 LDH 的酶学性质,包括反应最适温度、pH 及其动力学参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究涉及的菌株和质粒详细信息见表 1;DL-乳酸钠标准品 美国 Sigma 公司;葡萄糖、木糖、酵母粉、蛋白胨、琼脂粉、琼脂糖及异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)等试剂 生工生物工程(上海)股份有限公司;高保真 DNA 聚合酶、无缝克隆试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、RNA 抽提试剂盒

南京诺唯赞生物科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;丙酮酸、草酰乙酸、苯丙酮酸、 α -酮戊二酸、NADH 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

表 1 本研究所用菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	基因型/来源
假肠膜明串珠菌 HL64	本实验室分离
大肠杆菌 TOP10	F-, mcrAΔ(mrr-hsd RMS-mcrBC), ϕ 80, lacZΔM15, ΔlacX 74, recA1, araΔ139, Δ(ara-leu)7697, galU, g alK, rps, (Str) endA1, nupG/Novagene
大肠杆菌 BL21(DE3)	F-, ompT, gal, dcm, lon, hsdSB(rB- mB-), (DE3)/Novagene
pACYCDuet-1	P15A ori, lacI, cat, two MCSs/Novagene
pACYCldh1	LDH1表达质粒/本研究构建
pACYCldh2	LDH2表达质粒/本研究构建
pACYCldh3	LDH3表达质粒/本研究构建

HE-120 水平电泳仪、VE-180 垂直电泳仪、5200 Multi 成像仪 上海天能科技有限公司;T100PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司;ZHY-2102C 摆床 上海智诚分析仪器制造有限公司;SPX-250B-Z 培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;D30 分光光度计 德国 eppendorf 公司;e2695 高压液相色谱仪、2414 示差检测器、2489 紫外检测器 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 假肠膜明串珠菌 HL64 用 MRS 培养基(葡萄糖 10 g/L、酵母粉 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、 KH_2PO_4 0.25 g/L、 K_2HPO_4 0.25 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L、 NaCl 0.02 g/L, pH6.8)培养, 30 ℃ 摆床振荡培养 16 h。大肠杆菌相关菌株用 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、 NaCl 5 g/L)培养,于 37 ℃ 摆床振荡培养 12 h, 根据不同的抗性加入相关抗生素。

1.2.2 假肠膜明串珠菌 HL64 全基因组序列测定及基因组注释 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照其说明书所述步骤提取假肠膜明串珠菌 HL64 基因组 DNA 后,采用二代 illumina 及三代 Nanopore

测序技术相结合的方法测定假肠膜明串珠菌 HL64 全基因组序列, 由武汉贝纳科技有限公司完成。首先, illumina 测序获得 12941726 条有效 reads, 使用拼接工具 Unicycler (version: 0.5.0) 对二代测序获得的 reads 进行组装, 获得基因组骨架^[19]。其次, Nanopore 测序获得 222881 条平均读长为 6811.5 bp 的 reads, 并利用该数据对基因组骨架进行拼接, 最终获得假肠膜明串珠菌 HL64 的完整基因组序列, 并提交至 NCBI GenBank 数据库, 序列编号是 CP113947。利用 Prokka (version: 1.14.6) 预测假肠膜明串珠菌 HL64 全基因组的编码基因^[20], 并通过与 nr 库进行比对预测编码基因功能。利用 CDD 数据库, 对所有的蛋白进行直系同源簇分类 (clusters orthologous group, COG 分类)^[21]。分别利用 RNAmmer^[22] 及 tRNAscan-SE^[23] 识别 rRNA 操纵子及 tRNA 基因。

1.2.3 半定量 PCR 以 MRS 为培养基, 分别收集 20、24 及 48 h 的假肠膜明串珠菌 HL64 培养物, 利用 RNA 抽提试剂盒, 按照说明书操作, 抽提总 RNA, 用 DNase I 于 37 °C 处理 RNA 5 min, 消化残留的基因组 DNA 后, 利用逆转录试剂盒合成 cDNA。分别设计 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 的特异性引物 *ldh1*-qF/R、*ldh2*-qF/R 及 *ldh3*-qF/R (表 2), 通过 qPCR 计算引物的扩增效率 (控制在 90%~110% 之间)^[24]。以 cDNA 为模板, 以 *ldh1*-qF/R、*ldh2*-qF/R 及 *ldh3*-qF/R 为引物, PCR 扩增 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 的 cDNA (设置 PCR 条件为 94 °C 5 min, (94 °C 30 s-55 °C 30 s-72 °C 10 s) 循环 25 次, 72 °C 5 min), 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 通过判断条带的强弱分析同一个生长时期 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 的 mRNA 水平差异。

表 2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物	序列 (5'-3')
<i>ldh1</i> -qF	ACTCGTCAATGCCTCTCGTG
<i>ldh1</i> -qR	ATGCGCTCATCTGCTATCCC
<i>ldh2</i> -qF	GTTGGGCACCAACAATTGGG
<i>ldh2</i> -qR	CGCATACAATTCTGTCCAGCG
<i>ldh3</i> -qF	CGTGGATCGTGCTAGTGGTT
<i>ldh3</i> -qR	TGGTGAGTAAGCCGCAACAT
<i>ldh1</i> F	tcatcaccacagccaggatccgATGACTAGTGTTCGAAA TGATGAAGAA
<i>ldh1</i> R	gccgagctcgaaattcgatccTTATATTCATGTGTTGAAGTGGCG
<i>ldh2</i> F	tcatcaccacagccaggatccgATGAAGATTTGCTTACGGTATTG
<i>ldh2</i> R	gccgagctcgaaattcgatccTTAATATTTAAGTCAATAGCTGGCG
<i>ldh3</i> F	tcatcaccacagccaggatccgATGAAAATTTAATGTATAACGCCGT
<i>ldh3</i> R	gccgagctcgaaattcgatccTCATCTCAAAATTTCATTTGGT

1.2.4 LDH 过表达载体的构建 以假肠膜明串珠菌 HL64 基因组为模板, 分别以 *ldh1*F/R、*ldh2*F/R 及 *ldh3*F/R 为引物 (表 2), 扩增 D-乳酸脱氢酶编码基因 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3*, 利用无缝克隆试剂盒将其克隆至 pACYCDuet-1 的 *Bam*H1 位点, 获得表达质

粒 pACYCldh1、pACYCldh2 及 pACYCldh3。

1.2.5 LDH 的诱导表达及纯化 将表达质粒 pACYCldh1、pACYCldh2 及 pACYCldh3 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 获得相应的表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pACYCldh1、*E. coli* BL21(DE3)/pACYCldh2 及 *E. coli* BL21(DE3)/pACYCldh3。为方便阐述, 以 LDH1 的表达与纯化为例。*E. coli* BL21(DE3)/pACYCldh1 接种于含 25 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 过夜培养, 1% 接种至含 25 μg/mL 氯霉素的新鲜 LB 培养基, 在 200 r/min、37 °C 培养直至 OD600 达到 0.5~0.6 之间, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 LDH1 的表达。诱导结束后, 在 8000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体。用 buffer A (25 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 通过超声破碎菌体, 菌体裂解液于 12000 r/min、4 °C 条件下离心 45 min, 保留上清, 即为粗酶液。基于重组蛋白 LDH1 中的 His 标签, 利用 Ni-NTA 柱进行亲和层析纯化 LDH1。利用 buffer B (25 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑) 洗涤杂质蛋白, 然后用 buffer C (25 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑) 洗脱, 获得目标蛋白 LDH1。最终利用 buffer D (25 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油) 通过超滤对目标蛋白 LDH1 进行脱盐及浓缩。利用 SDS-PAGE 电泳检测目标蛋白 LDH1 的表达与纯度。

1.2.6 LDH 活力测定 配制以下丙酮酸还原反应体系 (500 μL): 0.5 μg 酶蛋白、0.5 mmol/L NADH、10 mmol/L 丙酮酸溶解于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH8.0)。由于 NADH 参与该反应, 因此可以根据 NADH 在 340 nm 波长处吸光度的减少速率定义 LDH 的酶活。1 min 减少 1 μmol NADH 所需酶量为 1 个酶活力单位, 即酶活力 = ΔNADH (μmol)/t (min)。1 mg 酶蛋白所含的酶活力单位数为比活力, 即比活力 = 酶活力/蛋白量 (mg), 其中蛋白含量通过 BCA 方法测定 (标准曲线方程: $y=0.8079x+0.6487$, $R^2=0.9946$)。

采用改良的高效液相色谱法检测 LDH 过表达菌株 (*E. coli* BL21(DE3)) 的代谢物中乳酸的构型^[25]。具体色谱条件: 紫外检测器, 波长 265 nm, 色谱柱为 SUMI-CHIRAL OA-5000 (φ4.6 mm × 150 mm); 柱温: 40 °C、进样量: 5 μL、流速: 1.0 mL/min、流动相: 1 mmol/L CuSO₄。

1.2.7 温度和 pH 对 LDH 酶活的影响 设置反应温度为 30 °C, 分别在不同 pH 缓冲液测定 LDH 的酶活力, 将最适 pH 的酶活力定义为最高酶活, 相对酶活力 100%。不同 pH 的缓冲液的配制: pH3~5 (50 mmol/L 乙酸钠缓冲液)、pH6~7 (50 mmol/L 磷酸缓冲液)、pH8~10 (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液) 及 pH11~13 (50 mmol/L 甘氨酸缓冲液); 设置 pH

为8,分别在不同温度(20~70℃)中测定LDH的酶活力,酶活力最高的温度为最适反应温度,相对酶活力为100%。

1.2.8 LDH2对不同底物的酶活力及动力学常数测定 选取与丙酮酸结构相似的草酰乙酸、 α -酮戊二酸及苯丙酮酸测定LDH2对不同底物的酶活力,反应体系同LDH2催化丙酮酸还原反应体系。测定LDH2分别对丙酮酸及NADH的动力学常数,反应在最适温度(30℃)和pH(pH8)条件下进行,丙酮酸浓度为0.625、1.25、2.5、5、10 mmol/L(NADH浓度为0.5 mmol/L),NADH浓度为0.0625、0.125、0.25、0.5、0.75、1.0 mmol/L(丙酮酸浓度为10 mmol/L)^[16]。测定LDH2的动力学参数时,利用GraphPad Prism 9的非线性拟合分析获得米氏方程相关参数 K_m 及 V_{max} 值。公式为 $K_{cat}=V_{max}/E$,其中E为LDH2的浓度。

1.3 数据处理

本研究中每个反应设置三个重复,利用GraphPad Prism 9处理相关数据。

2 结果与分析

2.1 假肠膜明串珠菌HL64的全基因组信息

假肠膜明串珠菌HL64的基因组包括一条约2.05 Mb的环形染色体,没有质粒,基因组的基本特征见表3。该染色体编码2006个潜在蛋白,其中1660个蛋白具有明确COG分类(图1)。与其他已测序明串珠菌一样,HL64基因组也编码4个rRNA操纵子(16S-23S-5S),还包含69个tRNA基因。基于序列相似性,在HL64基因组中识别到了三个可能与D-乳酸合成相关乳酸脱氢酶编码基因,分别是OYT93_01120、OYT93_08575及OYT93_10335(图1)。另外,OYT93_09405与OYT93_09400分别编码XylA与XylB,同时,HL64基因组还编码木糖转运蛋白XylP(OYT93_05960)及XylT的同源蛋白(OYT93_01040),表明HL64具备木糖代谢能力,与前期的发酵实验结果相一致。

2.2 乳酸脱氢酶编码基因转录水平的比较分析

为了确认HL64中参与D-乳酸合成的关键乳酸脱氢酶,本研究通过半定量PCR手段表征不同乳酸脱氢酶的mRNA水平。为便于阐述,分别将OYT_

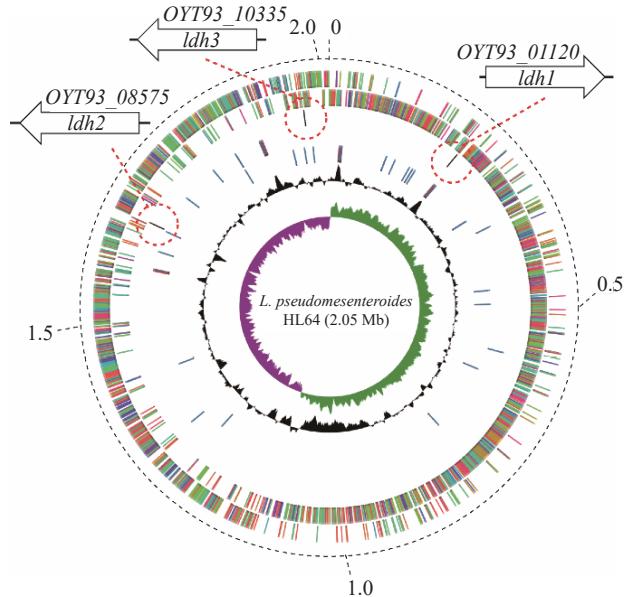


图1 假肠膜明串珠菌HL64基因组编码三个潜在的D-乳酸脱氢酶

Fig.1 Genome of *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64 encoded three putative D-lactate dehydrogenases (D-LDHs)

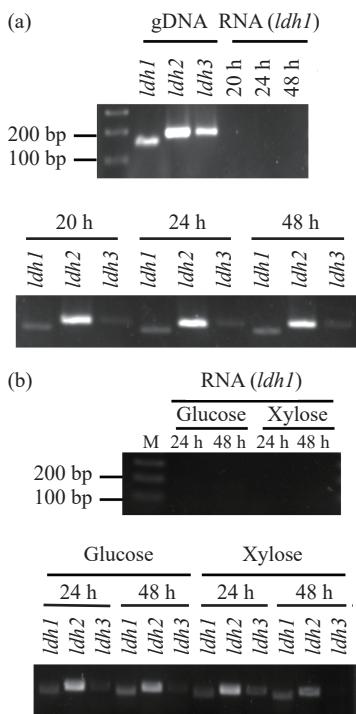
注:第一圈(从内向外):GC偏态性,第二圈:GC含量,第三及四圈:位于正负链的tRNA及rRNA基因,第五圈:潜在的LDH编码基因,第六和七圈:位于正负链的开放阅读框,并进行COG分类。基因组圈图用在线工具proksee绘制^[29]。

01120、OYT_08575及OYT_10335命名为ldh1、ldh2及ldh3(图1)。半定量PCR结果显示,无论处于何种生长阶段,ldh2的mRNA水平均明显高于ldh1及ldh3(图2(a))。其次,还检测了在乳酸发酵过程中ldh转录水平差异。在实验室条件下发酵合成乳酸过程中,无论以葡萄糖还是木糖为碳源时,ldh2的mRNA水平同样明显高于ldh1和ldh3(图2(b))。以上结果表明,ldh2在HL64不同生长阶段及发酵过程中的转录水平均高于ldh1及ldh3,暗示ldh2可能编码D-乳酸合成关键脱氢酶。此外,ldh1、ldh2及ldh3包含不同的核糖体结合位点(RBS),分别是GACTA、GGAGG及GGATA,而RBS(GGAGG)的翻译起始效率最高^[30],表明LDH2的翻译效率同样比LDH1及LDH3高。因此,可以初步确定LDH2负责假肠膜明串珠菌HL64中D-乳酸的合成。

表3 假肠膜明串珠菌HL64基因组的基本特征

Table 3 General features of *L. pseudomesenteroides* HL64 genome

特征	<i>L. pseudomesenteroides</i> HL64	<i>L. mesenteroides</i> KNU-2	<i>L. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> KG16-1	<i>L. suionicum</i> DSM 20241
染色体长度(bp)	2050591	1973419	1965841	2026850
G+C含量(%)	39	37.9	36.9	37.6
开放阅读框数量	2006	1957	1601	1997
rRNA操纵子数量	4	4	4	4
tRNA基因数量	69	71	67	72
质粒数量	0	4	3	1
GenBank号(染色体)	CP113947	CP089782	LN890331	CP015247
参考文献	本研究	[26]	[27]	[28]

图 2 半定量 PCR 比较 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 的转录水平差异Fig.2 Transcription levels of *ldh1*, *ldh2* and *ldh3* compared by semiquantitative PCR

注: (a)以 MRS 为培养基, *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 在 20、24 及 48 h 等不同生长阶段的转录水平差异; (b)分别以葡萄糖及木糖为碳源发酵乳酸过程中 *ldh1*、*ldh2* 及 *ldh3* 的转录水平差异。

2.3 假肠膜明串珠菌 HL64 中 LDH 的表达、纯化及活性分析

为了进一步确认 LDH2 是否可以将丙酮酸还原成乳酸, 本研究构建了乳酸脱氢酶的大肠杆菌过表达菌株, 最终通过 Ni 柱亲和层析获得了目标蛋白 His₆-LDH1 (~37 kDa)、His₆-LDH2 (~38 kDa) 及 His₆-LDH3 (~38 kDa) (图 3)。在体外反应中, 以丙酮酸为底物, NADH 为辅因子, 通过检测 NADH 的消耗

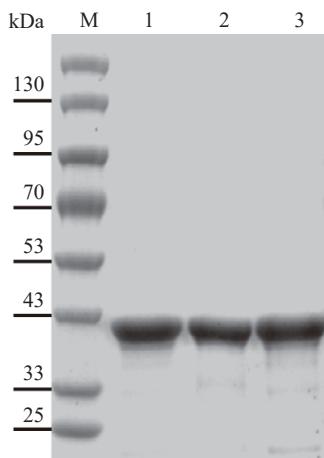


图 3 Ni 柱亲和层析纯化 LDHs

Fig.3 Purification of LDHs by Ni column affinity chromatography

注: 泳道 M: 蛋白 marker, 泳道 1、2 和 3 分别是 His₆-LDH1、His₆-LDH2 和 His₆-LDH3。

量 (340 nm 吸收值的变化) 来判断丙酮酸的还原反应进程。图 4 结果显示, 与阴性对照一样, LDH1 及 LDH3 的反应体系中 NADH 均没有明显变化, 在 LDH2 的反应体系中, NADH 被迅速消耗, 以上结果表明在假肠膜明串珠菌 HL64 编码的三个 LDH 中, 只有 LDH2 具备催化丙酮酸还原反应的活性。为了

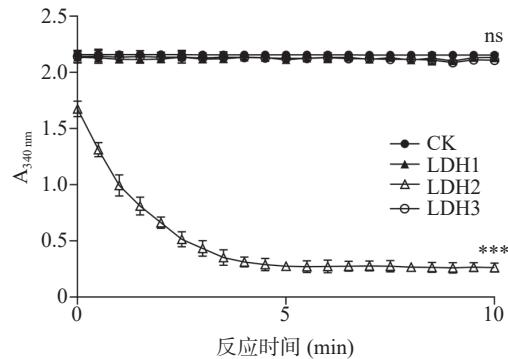


Fig.4 Reduction activity of different LDHs to pyruvate

注: ns: 与最高活性没有显著差异, ***: 与最高活性存在显著差异 ($P < 0.01$)。

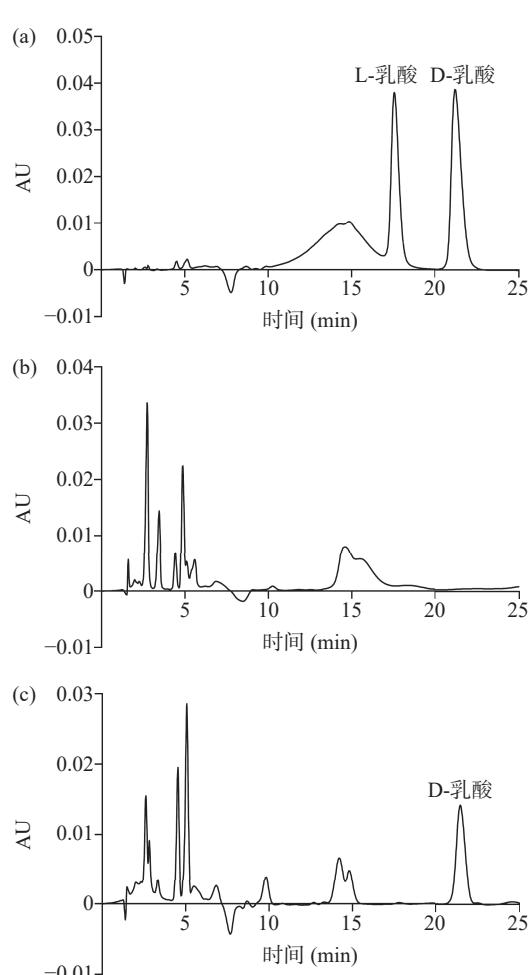


图 5 HPLC 检测 LDH2 过表达菌株中乳酸的构象

Fig.5 Lactic acid conformation in strain overexpressing LDH2 determined by HPLC

注: (a)、(b) 和 (c) 分别是 HPLC 检测 DL-乳酸标准品、携带空质粒 pACYCDuet-1 及 pACYCldh2 的大肠杆菌上清。

检测 LDH2 是否催化丙酮酸还原生成 D-乳酸, 通过 HPLC 检测过表达 LDH2 大肠杆菌的发酵产物中乳酸的构型。结果如图 5(c) 显示, 在 IPTG 诱导下过表达 LDH2 后, 在过表达菌株的上清中可以检测到与标准品 D-乳酸具有相同保留时间的产物(21.5 min 左右)(图 5(a)、图 5(c)), 判断该产物为 D-乳酸。而在阴性对照中, 在相同的保留时间并没有检测到类似的产物(图 5(b)), 表明 LDH2 可以将丙酮酸还原成 D-乳酸。

2.4 乳酸脱氢酶 LDH2 的最适反应温度及 pH

如图 6(a) 所示, LDH2 的活性在 20~40 °C 之间相对稳定, 在 30 °C 时, 具有最高酶活, 在 50 °C 反应条件下, LDH2 的相对酶活降为 80%, 一旦反应温度超过 60 °C, 导致 LDH2 的失活。与肠膜明串珠菌来源的 LDH(LEUM_1756) 及其他乳酸菌的 LDH 相比, LDH2 对温度的稳定性范围相对较宽。图 6(b)

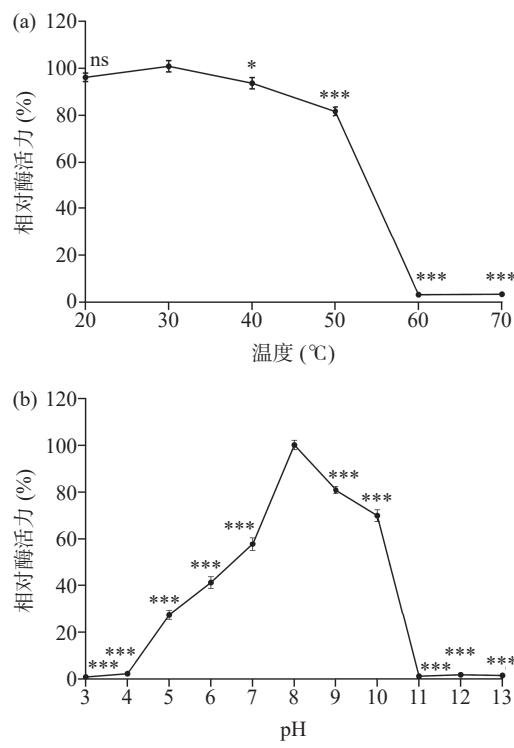


图 6 温度和 pH 对 LDH2 活性的影响

Fig.6 Effects of temperature and pH on the activity of LDH2
注: (a) 温度对 LDH2 活性的影响, (b) pH 对 LDH2 活性的影响, ns: 与最高活性没有显著差异, *: 与最高活性存在显著差异($P<0.05$), ***: 与最高活性存在极显著差异($P<0.01$)。

表明 LDH2 在 pH8 的条件下具有最高酶活, pH 在 7~10 范围内, LDH2 保持 60% 以上的活力, 然而, 当 pH<6 或 pH>10, LDH2 的活性则急剧下降。

2.5 LDH2 对不同底物的活力及其酶动力学参数

LDH 一般具有较宽的底物宽泛性, 除了以丙酮酸为底物外, LDH 可能还能催化与丙酮酸相似的底物的转化, 因此, 为了确定 LDH2 是否能催化其他底物的转化, 选取与丙酮酸相似的化合物草酰乙酸、苯丙酮酸及 α -酮戊二酸作为底物, 通过检测 NADH 的消耗表征底物的转化。图 7 结果显示, LDH2 对草酰乙酸及苯丙酮酸具有一定的催化活性, 而不能催化 α -酮戊二酸的转化, 但与丙酮酸相比, LDH2 对草酰乙酸及苯丙酮酸的催化活性均比较低。其中, LDH2 对草酰乙酸的催化活性大于苯丙酮酸, 表明丙酮酸是 LDH2 的最适底物。

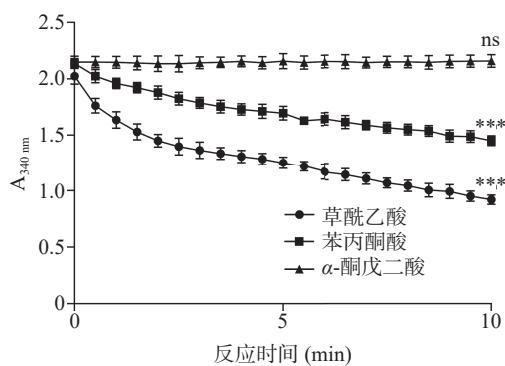


图 7 LDH2 催化其他底物还原活性

Fig.7 Reduction activity of LDH2 to other substrates

注: ns 与 *** 分别表示反应结束后 NADH 量与初始反应的 NADH 差异不显著及差异极显著($P<0.01$)。

以丙酮酸和 NADH 为底物, 在 LDH2 最适反应条件下测定 LDH2 对丙酮酸及 NADH 的动力学参数 K_m 、 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 。LDH2 对丙酮酸及 NADH 的 K_m 分别为 0.578 mmol/L 及 0.275 mmol/L, 对丙酮酸的 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 分别为 45.04 s^{-1} 及 $7.88 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 对 NADH 的 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 分别为 29.04 s^{-1} 及 $11.45 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ (表 4)。虽然 LDH2 对丙酮酸的 K_{cat}/K_m 小于肠膜明串珠菌 ATCC8293 的 LDH1(LEUM1756) 及 LDH2(LEUM2043), 但接近詹氏乳杆菌的 LDH, 比植物乳杆菌的 LDH 的 K_{cat}/K_m 高 1 倍。结果表明, 假肠膜明串珠菌 HL64

表 4 假肠膜明串珠菌 L64 中乳酸脱氢酶 LDH2 的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of LDH2 from *L. pseudomesenteroides* L64

动力学参数	假肠膜明串珠菌 HHL64 LDH2		詹氏乳杆菌 D-LDH	植物乳杆菌 D-LDH	肠膜明串珠菌 ATCC8293 D-LDH1	肠膜明串珠菌 ATCC8293 D-LDH2
	丙酮酸	NADH	丙酮酸	丙酮酸	丙酮酸	丙酮酸
K_m (mmol/L)	0.578±0.05	0.275	0.2	2.7	0.58	1.27
K_{cat} (s^{-1})	45.05±4.2	29.04	26.3	91.3	2900	421
K_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)	$(7.88 \pm 1.48) \times 10^4$	11.45×10^4	11×10^4	3.4×10^4	4.99×10^6	33.1×10^4
文献	本研究	本研究	[15]	[15]	[8]	[16]

编码的 LDH2 对丙酮酸具有较强的亲和力及催化效率, 具备一定的 D- 乳酸合成潜力。

3 结论

本研究通过对假肠膜明串珠菌 HL64 全基因组序列的测定, 共识别到了三个与 D- 乳酸合成相关的 D- 乳酸脱氢酶, 利用半定量 PCR 确定 LDH2 (OYT93_08575) 是负责 D- 乳酸合成的关键酶。以假肠膜明串珠菌 HL64 基因组为模板, 成功构建了三个潜在 LDH 编码基因的重组表达载体 pACY-Cldh1、pACYCldh2 及 pACYCldh3, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中成功实现异源表达。通过体内及体外实验, 进一步证实 LDH2 是假肠膜明串珠菌 HL64 中负责 D- 乳酸合成的唯一乳酸脱氢酶。与其他乳酸菌 D-LDH 的酶学性质相比, LDH2 对丙酮酸底物的亲和力和催化效率与詹氏乳杆菌 LDH 接近, 明显强于植物乳杆菌的 LDH。然而, LDH2 的耐热性较差, 从而限制了其高温发酵合成乳酸的潜力。除了催化丙酮酸还原生成乳酸外, LDH2 还具备催化苯丙酮酸转化的活性, 但活性较低。菊糖芽孢乳杆菌中 D-LDH1 的 307 位氨基酸残基 Ile 突变成 Met 后, 导致其催化苯丙酮酸的活性显著降低, 而催化丙酮酸的活性显著升高。序列比对发现在 LDH2 中相对应的位置, 即 308 位的 Met 而非 Ile 残基, 可能正是该关键氨基酸的差异导致了 LDH2 对苯丙酮酸的低催化活性, 因此, 通过定点突变 M308I 可能能够提高 LDH2 对苯丙酮酸的催化活性。最后, 假肠膜明串珠菌 HL64 基因组编码与木糖转运与代谢的功能蛋白 XylP(OYT93_05960)、XylT(OYT93_01040)、XylA (OYT93_09405) 及 XylB(OYT93_09400), 表明该菌株具备有效利用木糖的潜力, 后续可以尝试通过基因工程等手段提高假肠膜明串珠菌 HL64 利用木质纤维素资源发酵乳酸的能力, 从而降低乳酸发酵成本。本研究的结果为后续改造假肠膜明串珠菌 HL64 发酵生产 D- 乳酸提供理论依据。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] KUMAR A, SINGH J, BASKAR C. Lactic acid production and its application in pharmaceuticals. in: bioactive natural products in drug discovery [M]. Singapore: Springer Singapore, 2020: 467–484.
- [2] MATTEY M. The production of organic acids [M]. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12(1–2): 87–132.
- [3] 甄光明. 乳酸及聚乳酸的工业发展及市场前景 [J]. 生物产业技术, 2015(1): 42–52. [ZHEN Guangming. Industrial development and market prospect of lactic acid and polylactic acid [J]. Bioindustrial Technology, 2015(1): 42–52.]
- [4] ABDEL-RAHMAN M A, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 877–902.
- [5] PLAVEC T V, BERLEC A. Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria [J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 297.
- [6] DE LA TORRE I, LADERO M, SANTOS V E. Production of D-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(24): 10511–10521.
- [7] BAI Z, GAO Z, SUN J, et al. D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue [J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 346–352.
- [8] 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 and Microbial Technology, 2012, 51(5): 274–279.
- [9] CHENG Y Y, PARK T H, SEONG H, et al. Biological characterization of D-lactate dehydrogenase responsible for high-yield production of D-phenyllactic acid in *Sporolactobacillus inulinus* [J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(11): 2717–2729.
- [10] LIU J X, PIAO H J, LIU C L, et al. Characterization of key enzymes for D-lactic acid synthesis in *Leuconostoc citreum* KM20 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2022, 27(6): 921–929.
- [11] JIA J H, MU W M, ZHANG T, et al. Bioconversion of phenylpyruvate to phenyllactate: Gene cloning, expression, and enzymatic characterization of D- and L-lactate dehydrogenases from *Lactobacillus plantarum* SK002 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(1): 242–251.
- [12] GU S A, JUN C H, JOO J C, et al. Higher thermostability of L-lactate dehydrogenases is a key factor in decreasing the optical purity of D-lactic acid produced from *Lactobacillus coryniformis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 58–59: 29–35.
- [13] SINGHVI M, JADHAV A, GOKHALE D. Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the D-lactate dehydrogenase levels leading to increased D-lactic acid productivity [J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 736–739.
- [14] SUN Y, GAO G S, CAI T. Enzymatic characterization of D-lactate dehydrogenase and application in alanine aminotransferase activity assay kit [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6459–6471.
- [15] 蔡呈萌, 朱凌峰, 王丽敏, 等. 来自詹氏乳杆菌的耐热 D- 乳酸脱氢酶的酶学性质研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 460–466. [CAI Yumeng, ZHU Lingfeng, WANG Limin, et al. Biochemical characterization of a novel thermostable D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus jensenii* [J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 460–466.]
- [16] 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 Ling, GONG Jinyan, YUAN Haina, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 [J]. Food Science, 2020, 41(18): 153–158.]
- [17] 文宇萍, 刘金熙, 金清, 等. 柠檬明串珠菌 KM20 中 D- 乳酸脱氢酶的特性 [J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 36–42. [WEN Yuting, LIU Jinxi, JIN Qing, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase in *Leuconostoc citreum* KM20 [J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 36–42.]
- [18] 黄筱萍, 王通, 李鹏, 等. 高光纯 D- 乳酸生产菌株假肠膜明串珠菌 HL64-1 的分离鉴定及其发酵特性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 133–141. [HUANG Xiaoping, WANG Tong, LI

- Peng, et al. Isolation, identification and fermentation characterization of *Leuconostoc pseudomesenteroides* HL64-1 producing D-Lactic acid with high optical purity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(11): 133–141.]
- [19] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [20] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068–2069.
- [21] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33–36.
- [22] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100–3108.
- [23] CHAN P P, LIN B Y, MAK A J, et al. tRNAscan-SE 2.0: Improved detection and functional classification of transfer RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(16): 9077–9096.
- [24] RUIJTER J M, BARNEWALL R J, MARSH I B, et al. Efficiency correction is required for accurate quantitative PCR analysis and reporting[J]. *Clinical Chemistry*, 2021, 67(6): 829–842.
- [25] 张媛, 王小艳, 陈博, 等: 基因工程改造植物乳杆菌生产光学纯 D-乳酸 [J]. *当代化工*, 2019, 48(4): 674–678,682. [ZHANG Yuan, WANG Xiaoyan, CHEN Bo, et al. Genetically engineered *Lactobacillus plantarum* production of optical pure D-lactic acid [J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2019, 48(4): 674–678,682.]
- [26] YOON J A, KWUN S Y, PARK E H, et al. Complete genome sequence data of *Leuconostoc mesenteroides* KNU-2 and *Weissella hellenica* MBEL1842 isolated from kimchi[J]. *Data Brief*, 2023, 47: 108919.
- [27] ANDREEVSKAYA M, HULTMAN J, JOHANSSON P, et al. Complete genome sequence of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* KG16-1, isolated from vacuum-packaged vegetable sausages[J]. *Stand Genomic Sciences*, 2016, 11: 40.
- [28] CHUN B H, LEE S H, JEON H H, et al. Complete genome sequence of *Leuconostoc suionicum* DSM 20241(T) provides insights into its functional and metabolic features[J]. *Stand Genomic Sciences*, 2017, 12: 38.
- [29] GRANT J R, ENNS E, MARINIER E, et al. Proksee: In-depth characterization and visualization of bacterial genomes[J]. *Nucleic acids research*, 2023, 51(W1): 484–492.
- [30] DUAN Y T, ZHANG X J, ZHAI W J, et al. Characterization and implications of prokaryotic ribosome-binding sites across species [J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2022, 2(4): 676–684.