

不对称还原苯丙酮酸的 L-乳酸脱氢酶 L-LcLDH2 的表达及生物信息学分析

李雪晴¹, 袁风娇¹, 刘艳¹, 李剑芳¹, 邬敏辰^{*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: 以干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 技术扩增一种 L-乳酸脱氢酶(L-LcLDH2)的编码基因 *Lcldh2*; 借助表达质粒 pET-28a(+) 将 *Lcldh2* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实施异源表达。实验结果表明, 细胞超声破碎液中 L-LcLDH2 催化苯丙酮酸的酶活性为 47 U/mg 总蛋白质; 采用重组 *E. coli/Lcldh2* 全细胞催化苯丙酮酸还原, 所获产物 L-苯乳酸的对映体过量(ee_p)值 > 99%。生物信息学分析表明, *Lcldh2* 开放阅读框长 906 bp, 编码含 301 个氨基酸的 L-LcLDH2, 预测其相对分子质量和等电点分别为 32 585 和 5.5; L-LcLDH2 含有典型的 NAD⁺结合位点序列(GXGXXG), 属于 NAD 依赖型 L-乳酸脱氢酶, 且是一种非分泌、非跨膜、无信号肽和定位于细胞质的酶蛋白。L-LcLDH2 的获得为生物法制备高光学纯 L-苯乳酸提供了新的酶源。

关键词: *Lactobacillus casei*; L-乳酸脱氢酶; 苯丙酮酸; 不对称还原; 表达; 生物信息学

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2019)12-0025-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.004

Expression and Bioinformatic Analysis of an L-Lactate Dehydrogenase(L-LcLDH2) for the Asymmetric Reduction of Phenylpyruvic Acid

LI Xueqing¹, YUAN Fengjiao¹, LIU Yan¹, LI Jianfang¹, WU Minchen^{*2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Using the genomic DNA from *Lactobacillus casei* CICIM B1192 as the templet, we amplified the coding gene *Lcldh2* by PCR technique, which encodes an *L. casei* L-lactate dehydrogenase (L-LcLDH2). Then, *Lcldh2* was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) mediated by an expression vector pET-28a(+). Using PPA as the substrate, L-LcLDH2 displayed the enzyme activity of 47 U/mg, by which the asymmetric reduction of the substrate PPA afforded L-PLA with enantiomeric excess (ee_p) of more than 99%. Bioinformatic prediction revealed that *Lcldh2* is 906 bp in length, encoding 301 amino acids. Theoretical relative molecular mass and isoelectric point of L-LcLDH2 is 32 585 and 5.5, respectively. L-LcLDH2 is a stable cytoplasmic protein without

收稿日期: 2017-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21676117)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。E-mail: biowmc@126.com

引用本文: 李雪晴, 袁风娇, 刘艳, 等. 不对称还原苯丙酮酸的 L-乳酸脱氢酶 L-LcLDH2 的表达及生物信息学分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 25-30.

signal peptide and has a highly conserved sequence GXGXXG. The acquisition of L-LcLDH2 has provided a new biocatalyst for the preparation of highly optically pure L-phenyllactic acid.

Keywords: *Lactobacillus casei*, L-lactate dehydrogenase, phenylpyruvic acid, asymmetric reduction, expression, bioinformatics

手性 α -羟基酸是合成许多药物、化学材料的重要前体物质^[1-2]。例如,苯乳酸(Phenyllactic acid, PLA)又名 2-羟基-3 苯基丙酸,存在两种对映异构体, D-PLA 和 L-PLA。D/L-PLA 均具有广谱且高效的抑菌活性,是一种新型天然生物防腐剂^[3],可作为饲料添加剂替代畜禽饲料的抗菌剂^[4-5]。

L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase, L-LDH, EC 1.1.1.27),是脱氢酶中十分重要且研究较多的一种酶,也是生物体内糖酵解途径中一种关键的氧化还原酶。已有研究发现多种 L-LDH 可不对称还原苯丙酮酸(phenylpyruvic acid, PPA)生成 PLA,如嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)的 bsLDH^[6],副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)的 L-LDH^[7]和凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) NL01 的 L-nLDH^[8]等。但是不同的 L-LDH 不对称还原 PPA 的能力存在明显差异,如贾江花等^[9]克隆了来源于植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)中的 L1-LDH 和 L2-LDH 基因,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中实现了表达,重组 L1-LDH 对 PPA 的比活性为 71.06 U/mg,而重组 L2-LDH 对 PPA 的比活性为 0.06 U/mg。来源不同的 L-LDH 对 PPA 的活性差异更加明显,如王颖^[10]等将来源于巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* Z2013513) L-LDH 酶基因在 *E.coli* 中实现了表达,重组 L-LDH 粗酶液的酶活性仅为 3.4 U/mg。因此,利用分子生物学手段不断挖掘出性状优良的 L-LDH,仍然是目前研究发展的趋势。

本研究以干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* CICIMB1192)基因组为模板,通过 PCR 扩增出一种编码 L-乳酸脱氢酶(L-LcLDH2)的基因 *Lcldh2*,并借助 pET-28a(+)将 *Lcldh2* 在 *E.coli* BL21(DE3)中实施异源表达。采用表达 L-LcLDH2 的 *E. coli* *Lcldh2* 全细胞催化 PPA,测定 PLA 的产量与对映体纯度。以 PPA 为底物,测定重组 L-LcLDH2 粗酶液的酶活性。最后,借助生物信息学软件分析 L-LcLDH2 的理化性质和功能特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和培养基 克隆质粒 pUCm-T 购自 Sangon 上海公司;表达质粒 pET28a(+), *L. casei* CICIMB1192, *E. coli* JM109 和 *E. coli* BL21(DE3)由作者所在实验室保藏;MRS 培养基:酵母提取物 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 20 g/L、硫酸锰 0.25 g/L、乙酸钠 5 g/L、硫酸镁 0.58 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、柠檬酸二铵 2 g/L、吐温 80 1 mL,调 pH 至 6.2。LB 液(固)体培养基:酵母提取物 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L、20 g/L 琼脂粉。

1.1.2 主要试剂和仪器 rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 大连公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、250 bp ladder marker 和低相对分子质量 protein marker 购自 Sangon 上海公司;PPA 购自 Sigma-Aldrich 美国公司;D/L-PLA 和 L-PLA 购自安耐吉化学上海公司;NADH 购自百灵威上海公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。液相色谱仪 Waters-2695 和紫外检测器 Waters-2489 购自 Waters 美国公司;液相色谱柱 ProntoSIL C18(150 mm×4.6 mm×0.25 μ m)购自德国 Bischoff 公司,手性液相色谱柱 OD-H(250 mm×4.6 mm×5 μ m)购自大赛璐药物手性技术(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 搜索出 NCBI 公布的 *L.casei* 基因组中的 L-LcLDH2 氨基酸序列(KTE98134),根据其对应的核苷酸序列,设计一对扩增 *Lcldh2* 的特异性 PCR 引物,委托上海 Sangon 公司合成。

Ldh-F: 5' - CATATGATGGCAAGAACAATTGG
T-3' 下划线部分为 *Nde* I 酶切位点

Ldh-R: 5' - CTCGAGCTTCATTTTTTCAAAGGT
ATC-3' 下划线部分为 *Xho* I 酶切位点

1.2.2 L-LcLDH2 基因的克隆 挑取 *L.casei* CICIMB1192 单菌落于 5 mL MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C、

220 r/min 培养过夜,取 1.4 mL 菌液用于总DNA 提取^[11]。以此总DNA 为模板,Ldh-F 和 Ldh-R 为引物,进行 PCR:94 °C 预变性 4 min,30 个循环 (94 °C 30 s、53 °C 30 s 和 72 °C 60 s),72°C 充分延伸 10 min。将纯化的目的 PCR 产物与 pUCm-T 连接获重组质粒 pUCm-T-Lcldh2,转化 *E.coli* JM109,蓝白斑筛选和 DNA 测序。将测序正确的重组质粒经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,割胶回收 *Lcldh2*,与经同样双酶切的 pET-28a(+) 连接,获重组表达质粒 pET-28a(+)-*Lcldh2*,转化 *E. coli* BL21(DE3),DNA 测序验证。

1.2.3 L-LcLDH2 的诱导表达 测序正确的转化子命名为 *E.coli/Lcldh2*,而仅含 pET-28a(+) 转化子命名为 *E.coli/pET-28a*。分别挑取 *E.coli/Lcldh2* 和 *E.coli/pET-28a* 单菌落接种于 2 mL 含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 过夜培养。以 2 g/dL 的接种量转接于新鲜的 100 mL LB 培养基中,37 °C 培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 溶液,16 °C 诱导 10 h。8 000 r/min、5 min 离心收集菌体,经磷酸钠盐缓冲液 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄,100 mmol/L,pH 7.0) 洗涤 2 次后制备含 100 mg/mL 湿细胞的菌悬液,用于 SDS-PAGE 电泳分析及后续研究。另取一定量含 50 mg/mL 湿细胞的菌悬液,超声破碎后,4 °C,12 000 r/min,离心 10 min 后取上清液即为粗酶液。采用 Bradford 法^[12] 测定蛋白质含量。

1.2.4 L-LcLDH2 酶活性的测定 L-LcLDH2 的酶活性测定方法: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 30 °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。酶活力单位 (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)。

1.2.5 全细胞转化 PPA 生成 PLA 于 1 mL 离心管中加入 300 μL 菌悬液和 250 μL 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0),37 °C 保温 5 min,再依次加入 50 μL 葡萄糖 (终浓度 50 mmol/L) 和 400 μL PPA (终浓度 10 mmol/L),反应 1 h 后,取 200 μL 反应液加入 800 μL 甲醇终止反应,过 0.22 μm 有机滤膜。按照方法 1.2.6 进行 HPLC 分析;另取 200 μL 反应液,用 1 mL 乙酸乙酯进行萃取,上层有机相经无水硫酸钠干燥后过 0.22 μm 有机滤膜,按照方法 1.2.6 进行对映选择性分析。

1.2.6 HPLC 分析 PPA 和 PLA 采用反相 HPLC 分析 PPA 及 PLA,色谱柱为 ProntoSILC18 (150 mm×4.6 mm×0.25 μm),分析条件:流动相为体积分数 0.05% 三氟乙酸/水 (A) 和体积分数 0.05% 三氟乙酸/甲醇 (B) 混合液,梯度洗脱程序为 (体积分数):0~15 min 20%~65% B;15~16 min 65%~100% B;16~19 min 保持 100% B,紫外检测器,柱温 30 °C,流速 1 mL/min。检测波长为 210 nm,PPA 和 PLA 的保留时间依次为 11.372 min,12.858 min。

采用正相 HPLC 进行手性分析^[3],色谱柱为 Daicel OD-H (250 mm×4.6 mm×5 μm),分析条件:流动相为正己烷/异丙醇/三氟乙酸 (98:2:0.05,体积比),紫外检测器,柱温 30 °C,流速 1 mL/min,检测波长为 210 nm,D-PLA 和 L-PLA 的保留时间依次为 33.896 min,35.806 min。依据峰面积计算 L-PLA 的 $ee_p = [L-PLA - D-PLA / (L-PLA + D-PLA)] \times 100\%$ 。

1.2.7 L-LcLDH2 的生物信息学分析 运用表 1 列出的软件和程序分析 L-LcLDH2 的理化性质和功能特性。

表 1 序列分析工具

Table 1 Tools applied for sequence analysis

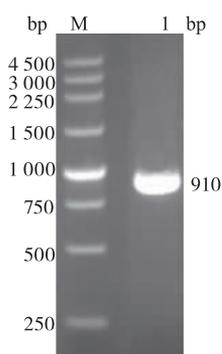
功能	软件与网站
氨基酸序列的同源性分析	Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2), ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPrript/cgi-bin/ESPrript.cgi)
蛋白质理化性质分析	ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)
功能位点和结构域	PROSITE (http://prosite.expasy.org)
跨膜区预测	TMHMM Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)
亚细胞定位预测	PSORT (http://www.psort.org/)
亲/疏水性预测	ProtScale (http://web.expasy.org/protscale/)
信号肽预测	SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
二级结构预测	SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)
三级结构预测与分析	SWISS-MODEL (https://www.swissmodel.expasy.org) PyMOL (http://www.pymol.org/)

2 结果与分析

2.1 L-LcLDH2 编码基因 *Lcldh2* 的克隆

以 *L.casei* 基因组为模板,按 1.2.2 方法进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分析。结果在 1 000 bp

下方出现一特异性条带,大小与预期基本相符(见图1)。将其克隆至 pUCm-T 获重组质粒 pUCm-T-*Lcldh2*。DNA 测序结果显示,*Lcldh2* 开放阅读框长 906 bp,编码 301 个氨基酸。*Lcldh2* 与模板的同源性为 99.45%,*Lcldh2* 的核苷酸序列中第 181 位由模板对应的 G 变为 A,其氨基酸序列中第 61 位点的氨基酸残基由模板对应的 Val 变为 Ile。



M:DNA Marker; 1:*Lcldh2*

图 1 *Lcldh2* 的 PCR 扩增

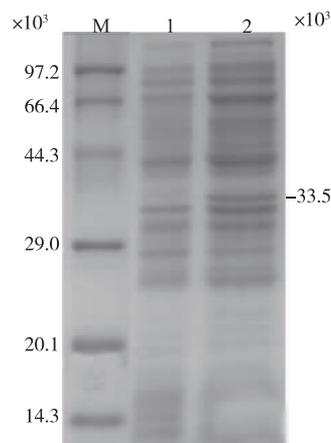
Fig. 1 PCR amplification of *Lcldh2*

2.2 L-LcLDH2 的诱导表达

按 1.2.4 方法将 *E. coli*/pET-28a 和 *E. coli*/*Lcldh2* 进行了诱导表达。SDS-PAGE 结果显示,诱导的 *E. coli*/*Lcldh2* 全细胞约在相对分子量 33.5×10^3 (表观相对分子量)处有一明显的特异性蛋白质条带(图 2,泳道 2),而 *E. coli*/pET-28a 在此处无特异性蛋白质条带(图 2,泳道 1),表明 *Lcldh2* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功实现了异源表达。表达产物 L-LcLDH2 的粗酶液催化 PPA 的酶活性为 47 U/mg,显著高于来源于 *Bacillus megaterium* Z2013513 的重组 L-LDH 的酶活性(3.4 U/mg)^[10]。

2.3 全细胞催化 PPA 生成 L-PLA

按照 1.2.6 方法,测定了 *E. coli*/*Lcldh2* 和 *E. coli*/pET-28a 全细胞在 1 h 催化 10 mmol/L PPA 后生成 PLA 的浓度。在 37 °C、220 r/min 条件下,10 mmol/L PPA 经 30 mg/mL *E. coli*/*Lcldh2* 全细胞转化 1 h 后,生成 3.5 mmol/L 的 PLA,底物摩尔转化率为 35%,而不含 *Lcldh2* 的 *E. coli*/pET-28a 催化 PPA 生成 PLA 的浓度仅为 0.07 mmol/L,即含 *Lcldh2* 的重组菌转化 PPA 生成 PLA 的量比宿主菌提高了 49 倍。产物的手性分析结果显示,L-PLA 的 $ee_p > 99\%$,表明 L-LcLDH2 具有很高的对映选择性。



M:Protein marker; 1:*E. coli*/pET-28a; 2:*E. coli*/*Lcldh2*

图 2 重组 *E. coli* 全细胞的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the whole cell of recombinant *E. coli*

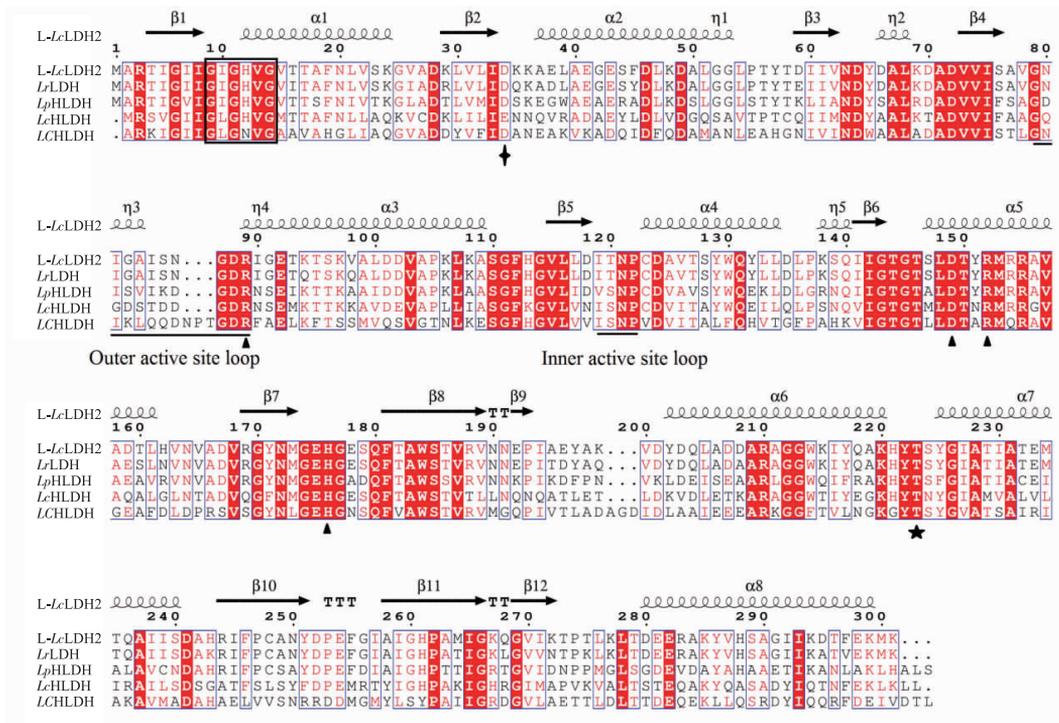
另外,反相液相检测结果分析表明,全细胞催化 PPA 生成 L-PLA 的同时产生了一定量的副产物,经质谱检测确定该副产物为苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)。微生物代谢途径中 Phe 可在转氨酶的作用下转化为 PPA,该反应为可逆反应。因此在 *E. coli*/*Lcldh2* 全细胞催化 PPA 生成 PLA 的反应中,*E. coli* 自身携带的转氨酶可转化少量的 PPA 生成 Phe。

2.4 L-LcLDH2 的生物信息学分析

2.4.1 L-LcLDH2 的一级结构分析 按照 1.2.7 方法预测了 L-LcLDH2 的理化特性和功能特性,结果显示,L-LcLDH2 的分子式为 $C_{1451}H_{2296}N_{388}O_{447}S_8$,理论相对分子质量为 32 585,理论等电点为 5.5,平均亲水系数为 -0.117,表现出强亲水性,不稳定指数为 11.87,是一种稳定蛋白质,位于细胞质,无信号肽和跨膜区域,由此推测 L-LcLDH2 是一种非分泌型、非跨膜蛋白,保留在细胞质中,直接参与物质代谢。

运用 ClustalW2 和 ESPript 3.0 对 L-LcLDH2 与 4 种不同的 L-LDH 进行了多序列比对及保守序列和催化活性位点的分析(图 3)。L-LcLDH2 与 *L. rhamnosus* L-LDH, *L. perolens* L-HicLDH, *L. composti* L-HicLDH, *L. confuses* L-HicLDH 的同源性分别为 92%、64%、53%、43%。如图 3 所示,L-LcLDH2 存在典型的 NAD^+ 结合位点序列(GXGXXG, X-任意氨基酸)。L-LcLDH2 的底物识别位点为 Thr²²³,催化活性位点为 Arg⁸⁹、Asp¹⁴⁸、Arg¹⁵¹ 和 His¹⁷⁶。另外,Asp³⁴ 是 NAD^+ 结构域中决定 L-LDH 的辅酶为 NADH 而不

是 NADPH 的关键氨基酸,因此,L-LcLDH2 是一种 NADH 依赖型 L-LDH。



L-LcLDH2:*L.casei* L-LDH(this paper);LrLDH:*L.rhamnosus* L-LDH(WP_064558087);LpHLDH;*L.perolens* L-HicLDH (WP_057819072);LcHLDH:*L.composti* L-HicLDH(WP_035453610);LCHLDH:*L.confuses* L-HicLDH(1HYH)
 星形记号标记的为底物识别位点 Thr²²³;三角形记号标记的为催化位点 Arg⁸⁹、Asp¹⁴⁸、Arg¹⁵¹ 和 His¹⁷⁶;菱形标记的为 Asp³⁴

图3 L-LcLDH2 与其他来源的 L-LDHs 的多序列比对和保守区域分析

Fig. 3 Alignment of multiple sequences and analysis of conserved motifs of L-LcLDH2 with other L-LDHs

2.4.2 L-LcLDH2 的二级结构预测和三维结构的同源建模 运用 SOPMA 预测 L-LcLDH2 的二级结构显示,L-LcLDH2 含有 40.2%的 α -螺旋,19.93%的延伸链,7.97%的 β -转角和 31.89%的无规则卷曲。运用 SWISS-MODEL 和 PyMOL 对 L-LcLDH2 的三维结构进行了同源建模和分析(图 3)。在蛋白质数据库中搜索出了与 L-LcLDH2 同源性为 43%的来源于融合乳杆菌(*L.confuses*)的 L-2-羟异己酸脱氢酶(L-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase,L-HicDH,PDB:1HYH)晶体结构。基于 L-HicDH 结构与功能的研究^[14],推测 L-LcLDH2 由 α 螺旋和 β 折叠形成的 NAD 结合结构域和催化结构域所构成。NAD 结合结构域主要由 6 个 β 折叠和 5 个 α 螺旋组成,而催化结构域主要由 6 个 β 折叠和 4 个 α 螺旋组成。已有研究表明^[15],L-LcLDH2 的催化活性位点高度保守,活性中心由 Arg⁸⁹、Asp¹⁴⁸、Arg¹⁵¹ 和 His¹⁷⁶ 组成。当 α -羧基酸与酶结合时,Arg¹⁵¹ 的胍基结合到底物的羧基形成一个稳定的盐桥^[16],Arg⁸⁹ 的胍基和 His¹⁷⁶

的咪唑基共同与底物的 α -羧基结合,其中 His¹⁷⁶ 提供质子,而 Asp¹⁴⁸ 稳定去质子化的 His¹⁷⁶,这些位点共同催化 α -羧基酸上的 α -羧基还原成羟基生成 α -羟基酸^[6]。

3 结语

L-LDH 在生物催化过程中具有重要的应用价值,通过基因工程实现 L-LDH 异源高效表达是降低其工业应用成本、适应工业应用的有效手段^[17]。本研究从 *L.casei* CICIMB1192 基因组中成功克隆了一种编码 L-LcLDH2 的基因 *Lcldh2* 并实现了该基因在 *E.coli* BL21(DE3)中的异源表达,L-LcLDH2 的催化活性位点为 Arg⁸⁹、Asp¹⁴⁸、Arg¹⁵¹ 和 His¹⁷⁶,具有典型 NAD⁺结合位点序列,是一种 NAD 依赖型 L-LDH。采用 *E. coli*/Lcldh2 全细胞不对称还原 PPA,可生成高光学纯度 L-PLA。本研究为生物催化法制备手性 L-PLA 提供了新的工具酶,也为进一步利用该酶生产 L-PLA 提供了理论支持。

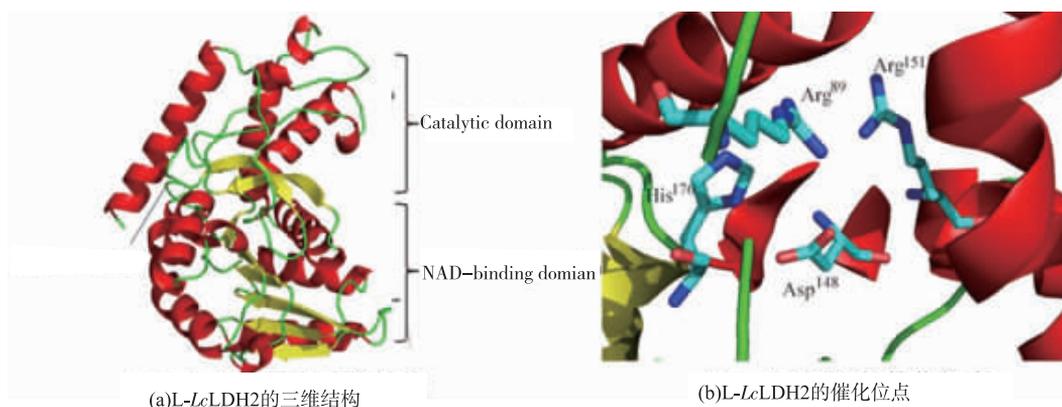


图 4 L-LcLDH2 的三维结构和催化活性位点

Fig. 4 Three-dimensional structure and catalytic sites of L-LcLDH2

参考文献:

- [1] COPPOLA G M, SCHUSTER H F. α -Hydroxy acids in enantioselective synthesis[M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1997.
- [2] SENKPEIL R F, PANTALEONE D P, TAYLOR P P. Production of α -hydroxy-carboxylic acids using a coupled enzyme system [P]. European patent, 1326993.2007-05-23.
- [3] MU W M, YU S H, ZHU L J, et al. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 95: 1155-1163.
- [4] WANG J P, YOO J S, LEE J H, et al. Effects of phenyllactic acid on growth performance, nutrient digestibility, microbial shedding, and blood profile in pigs[J]. **Journal of Animal Science**, 2009, 87: 3235-3243.
- [5] WANG J P, YOO J S, LEE J H, et al. Effects of phenyllactic acid on production performance, egg quality parameters, and blood characteristics in laying hens[J]. **Journal of Applied Poultry Research**, 2009, 18: 203-209.
- [6] ASLAN A S, BIRMINGHAM W R, KARAGULER NG, et al. Semi-rational design of *Geobacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase to access various chiral α -hydroxyacids[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016, 179: 474.
- [7] 赵婷. 副干酪乳杆菌乳酸脱氢酶的克隆表达及酶学性质的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [8] ZHENG Z J, ZHAO M Y, 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.
- [9] 贾江花. 乳酸脱氢酶的克隆表达及酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [10] WANG Yin, FAN Ming, XUE Sumei, et al. Production of L-phenyllactic acid from whole-cell recombinant *Escherichia coli*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2015(12): 13-17. (in Chinese)
- [11] 卢福芝. 鼠李糖乳杆菌 D- 乳酸脱氢酶基因的克隆表达及同源重组质粒的构建[D]. 南宁: 广西大学, 2010.
- [12] BRADFORD M M. 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.
- [13] XU G C, ZHANG L L, NI YE. 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.
- [14] NIEFIND K, HECHT H J, SCHOMBURG D. Crystal Structure of L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus* at 2.2 Å Resolution. an example of strong asymmetry between subunits[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1995, 251: 256-281.
- [15] DUNN C R, WILKS H M, HALSALL D J, et al. Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework[J]. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, 1991, 332: 177-184.
- [16] HOU Ruobing, CHEN Zhida, BIAN Jiang, et al. Progress on the mechanism of L-lactate dehydrogenase catalyzed reaction[J]. **Chemistry**, 2000(1): 15-21. (in Chinese)
- [17] CARREA G, RIVA S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents [J]. **Angewandte Chemie-International Edition**, 2000, 39(13): 2226-2254.