

干酪乳杆菌 L-乳酸脱氢酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质

袁剑 秦浩 葛向阳 张伟国*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)是发酵生产 L-乳酸中催化丙酮酸转化成 L-乳酸的关键酶。以干酪乳杆菌 G-02 (*Lactobacillus casei* G-02)基因组 DNA 为模板, 克隆得到 L-LDH 基因(*ldhL*), 经序列分析后将其连接到表达载体 pET-28a(+)上, 构建成重组质粒 pET-*ldhL* 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 实现 *ldhL* 基因的表达。30 °C 加入 IPTG 诱导表达后, 经镍柱亲和层析纯化的重组蛋白样品通过 SDS-PAGE 分析, 约在 40 kD 处出现显著的特异性条带。对表达的 L-LDH 生物学特异性研究显示: 重组 L-LDH 的比酶活为 1 722 U/mg, 最适反应温度为 40 °C–45 °C; 果糖-1,6-二磷酸(FBP)为别构激活剂, 使最适 pH 向中性方向偏移(pH 为 6.6–6.8), Mn^{2+} 可拓宽最适酶活 pH 范围; Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 L-LDH 有激活作用, 而 Zn^{2+} 对 L-LDH 有抑制作用。

关键词: 干酪乳杆菌, L-乳酸脱氢酶, 克隆, 亲和层析, 酶学性质

Overexpression, purification and properties of *ldhL* gene from *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli*

YUAN Jian QIN Hao GE Xiang-Yang ZHANG Wei-Guo*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: L-lactate dehydrogenase (L-LDH) is a key enzyme which catalyzes the formation of L-lactate from pyruvate in the *Lactobacillus* sp.. The gene *ldhL* encoding L-LDH was amplified from genome DNA of *Lactobacillus casei* using PCR technique. The PCR product was cloned into pUcm-T vector and double digested with restriction endonucleases, and then the DNA fragment of *ldhL* was inserted into pET-28a(+). The recombinants expression plasmid pET-*ldhL* was obtained, and was transformed into *E. coli* BL21. After it was induced to express L-LDH with IPTG, and purified by affinity chromatography. SDS-PAGE showed that the molecular weight of specific fusion protein was 40 kD. The biochemical properties of L-LDH showed that the specific activity were up to 1 722 U/mg with optimum catalysis temperature of 40 °C–45 °C and pH of 6.6–6.8. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a

positive allosteric modifier of the enzyme, the addition of Mn^{2+} to the assay in the presence of FBP broadens the pH profile, particularly towards neutral pH values. Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} increases the activity of L-LDH, but Zn^{2+} decreases its activity.

Keywords: *Lactobacillus casei*, L-lactate dehydrogenase, Clone, Affinity chromatography, Properties

乳酸(Lactic acid)是一种重要的有机酸, 主要应用于食品、医药、日用化工、制药、纺织、环保和农业等诸多领域, 国际上对乳酸的需求正以年均 5%–8% 的速度持续增长^[1]。其中利用 L-乳酸生产的新型生物可降解高分子材料聚乳酸(PLA), 被广泛应用于人工血管、医用缝合线、缓释药物的包裹材料等医药领域^[2]。2010 年“乳酸生产菌种分子改造与高效发酵技术”再次被列入“十二五”重大攻关项目。乳酸有很好的发展前景, 但是当前我国乳酸工业在产酸率、产品质量及其生产规模上与国外相比仍存在较大差距, 特别是刚刚起步的 L-乳酸发酵产业。由此可见, 如何进一步提高乳酸产业的发酵浓度、生产强度和转化率是当前我国乳酸工业面临的首要问题。

在乳酸菌细胞内, L-乳酸脱氢酶(L-LDH)是将 EMP 途径得到的丙酮酸转化成 L-乳酸的关键酶, 进一步提高该酶的活力是乳酸工业菌种分子改造的关键^[3–5]。本实验室新分离收藏一株 L-乳酸同型发酵的干酪乳杆菌, 其发酵产物中 L-乳酸的光学纯度达到 95% 以上, 有较好的应用前景^[6–7]。但针对干酪乳杆菌乳酸脱氢酶的研究则鲜见报道, 本研究以该菌株为出发菌, 在大肠杆菌中过量表达并纯化其 L-LDH, 研究该酶的激活剂与最适催化条件, 使酶活最大化, 为随后的菌种分子改造与乳酸发酵工艺优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

L. casei G-02 由本实验室筛选并保存; 大肠杆菌 DH5 α 、JM109、BL21(DE3)和简易载体 pUCm-T 均购于上海生物工程公司; 表达载体 pET-28a(+)-本实验室保存。

1.2 酶和化学试剂

T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶, DL10000 DNA Marker、低分子量蛋白质 Marker 各种限制性

内切酶均购于大连宝生物公司; NADH、X-gal、FBP、IPTG、丙酮酸钠、各种试剂盒、引物合成、亲和层析柱空柱均购自上海生物工程公司; Goldview 购于赛百盛公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂; 琼脂糖镍柱购于浙江争光股份实业有限公司。

1.3 培养基和培养条件

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, 玉米浆 40, $(NH_4)_2SO_4$ 5, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $CaCO_3$ 10 用于干酪乳杆菌培养;

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10 用于大肠杆菌培养。

1.4 方法

1.4.1 分子克隆: 基因组 DNA 的提取纯化、质粒 DNA 的提取纯化、DNA 酶切、连接和转化、感受态细胞制备均参照文献[8], 根据 GenBank 中查到干酪乳杆菌 L-LDH 基因序列, 设计 *ldhL* 基因的特异性引物:

上游引物: 5' -CGCGGATCCGTGGCAAGTATTACGGATAAGG-3';

下游引物: 5' -CCGCTCGAGCTGACGGGTTTCGATGTCGT-3'。

为了便于克隆和连接, 上游引物 5' 端设计了 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 5' 端设计了 *Xho* I 酶切位点。以 *L. casei* G-02 基因组为模板, 对 *ldhL* 基因进行 PCR 扩增: PCR 反应体系为 50 μ L; 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62.2 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测。

将胶回收的目的 PCR 产物亚克隆到 pUCm-T 简易载体上, 用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 根据蓝白斑筛选出阳性克隆, 经双酶切和 PCR 扩增鉴定后, 获得阳性克隆质粒 pUCm-T-*ldhL*, 送上海生物工程公司测序。

1.4.2 重组质粒的构建: 将 pUCm-T-*ldhL* 与表达载体 pET-28a(+)-用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 连接、转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 通过双酶切鉴定

获得含有阳性克隆的重组质粒,命名为 pET-*ldhL*。将 pET-*ldhL* 转化到 *E. coli* BL21(DE3)中,即得到重组菌 *E. coli* BL21(pET-*ldhL*)。

1.4.3 目的基因的表达:以含质粒 pET-28a(+)的菌株为对照,将含有重组质粒的 BL21 菌株接种于 3 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 mg/L)中,37 °C 培养过夜,以 1% 的接种量接种于新鲜的 LB 培养基中,培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,30 °C 诱导表达 8 h。取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 分析,以 12% 的凝胶作为分离胶,电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.4.4 重组 L-LDH 的纯化:将重组菌 *E. coli* BL21 (pET-*ldhL*) 接种于 LB 液体培养基中,按上述方法培养,诱导表达。冷冻离心收集菌体,用 PBS 溶液洗涤 2 次,用结合缓冲液悬浮菌体,超声波破碎得粗酶液,采用亲和介质填充层析柱对重组蛋白进行纯化,上样前预先 3 倍柱体积的结合缓冲液平衡亲和柱,上样后以洗脱缓冲液洗脱杂蛋白,再以解析缓冲液洗脱重组蛋白,纯化的蛋白用 SDS-PAGE 分析。

结合缓冲液: pH 7.4, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl;

洗脱缓冲液: pH 7.4, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑;

解析缓冲液: pH 7.4, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑。

1.4.5 乳酸脱氢酶活性的测定:乳酸脱氢酶活性分析参见文献[9],基本原理是鉴于 NADH 在 340 nm 处有最大吸收峰,通过光吸收峰值的改变定量测定酶的含量。丙酮酸钠和 NADH 分别用 0.05 mol/L 乙酸缓冲液或者 0.05 mmol/L 咪唑缓冲液溶解,取 2 只配对的比色皿,一只加入 3 mL 丙酮酸钠溶液作为空白对照,另一只比色皿中依次加入 2.9 mL 丙酮酸钠溶液和 0.1 mL NADH 溶液并混匀,置于分光光度计样品槽中,检测原始 NADH 吸光值,待读数稳定后,马上加入 2 μ L 的纯化的酶液,开始光度计读数,每 15 s 测定一次吸光值,反应结束后得到 $\Delta A_{340nm}/\text{min}$ 值,根据公式计算酶活力。酶活的定义为:在 40 °C、pH 6.7 时,每分钟氧化 1 μ mol 的 NADH 所用的酶量为 1 个酶活力单位。计算公式如下:

$$\text{LDH 活力单位(U/mL)} = \frac{V_T \times \Delta A}{6.22 \times V_S}$$

式中: V_T 为反应总体积, mL; V_S 为样品体积, mL; ΔA 为每分钟吸光度的降低值。

比酶活定义为:每毫克酶蛋白所含的酶活单位(U/mg)。

蛋白质浓度测定方法:Bradford 法^[10],以不同浓度的牛血清白蛋白(BSA)做标准曲线。

2 结果与分析

2.1 *ldhL* 基因克隆及重组质粒的构建

以 *L. casei* G-02 基因组为模板对 *ldhL* 基因进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小约为 1.0 kb。将 PCR 产物纯化后与 pUCm-T 简载体连接,经测序分析,*ldhL* 基因长度为 981 bp,这表明已扩增到 *ldhL*。将 pUCm-T-*ldhL* 与表达载体 pET-28a(+)双酶切和纯化后,连接转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,提取质粒双酶切、电泳验证,结果见图 1,表明已成功构建重组质粒,命名为 pET-*ldhL*。

2.2 重组 *ldhL* 基因的诱导表达及重组 LDH 的纯化将重组质粒 pET-*ldhL* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞中,在 LB 培养基中培养,经 IPTG 诱导后收集菌体,经 SDS-PAGE 电泳分析,结果见

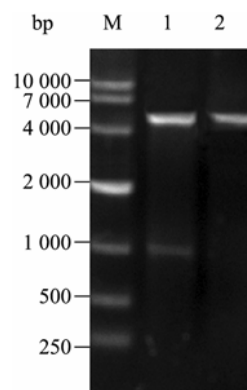


图 1 重组质粒 pET-*ldhL* 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid pET-*ldhL*

M: DNA marker DL10000; 1: Recombinant plasmid pET-*ldhL* digested by *Bam*H I and *Xho* I; 2: Plasmid pET-28a(+) digested by *Bam*H I and *Xho* I.

图 2。重组菌株经诱导表达后, 与对照菌株相比, 约在 40 kD 处出现明显蛋白条带, 除去融合表达前端的融合标签, 与文献报道分子量一致。

经镍柱亲和层析时, 先用洗脱缓冲液洗去杂蛋白后, 再用含 200 mmol/L 咪唑的解洗缓冲液将目的蛋白洗脱下来, 纯化的蛋白如图 3 所示。

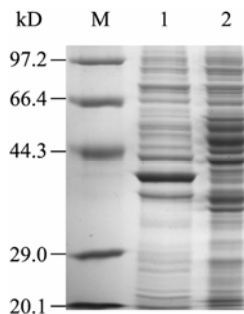


图 2 重组质粒 pET-ldhL 在 *E. coli* 中的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pET-ldhL expression products in *E. coli* (BL21)

M: Protein weight marker; 1: pET-ldhL expression products in *E. coli* (BL21); 2: pET-28a(+) expression products in *E. coli* (BL21).

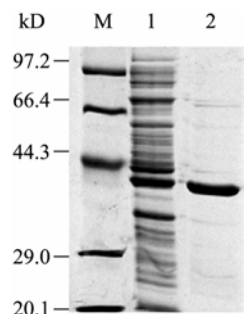


图 3 亲和层析纯化的重组 L-LDH 的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified L-LDH by affinity chromatography purification

M: Protein weight marker; 1: pET-ldhL expression products in *E. coli* (BL21); 2: The purified pET-ldhL expression products.

2.3 乳酸脱氢酶活性的测定

用紫外分光光度计分别测定了已纯化的酶液和空白对照大肠杆菌的酶活力, 在最适反应条件下, 即 3 mL 的反应体系下: pH 6.8 的 50 mmol/L 咪唑缓冲液, 含 20 mmol/L 丙酮酸, 0.174 mmol/L NADH, 4 mmol/L FBP, 3 mmol/L Mn^{2+} 。重组乳酸脱氢酶的比酶活为 1 722 U/mg, 而空白对照大肠杆菌检测不到酶活力。

2.4 重组乳酸脱氢酶反应的最适温度和 pH 值

最适温度的确定: 温度对酶的催化活力影响很大。将已纯化的酶液和反应缓冲液在不同温度下保温后, 在 pH 为 6.5 的咪唑缓冲液, 含有 20 mmol/L 丙酮酸, 0.174 mmol/L NADH, 4 mmol/L FBP 下检测酶活, 其结果如图 4 所示: L-LDH 在 30 °C–60 °C 保温后, 该酶都保持有较高的活性, 而超过 60 °C 后酶活力迅速降低。这表明干酪乳杆菌中的 L-LDH 具有较大的温度适应范围, 且最适反应温度范围为 40 °C–45 °C, 与发酵工艺参数中最佳发酵温度为 41 °C 一致, 在此温度条件下酶活力较高, 使发酵较快速积累乳酸。

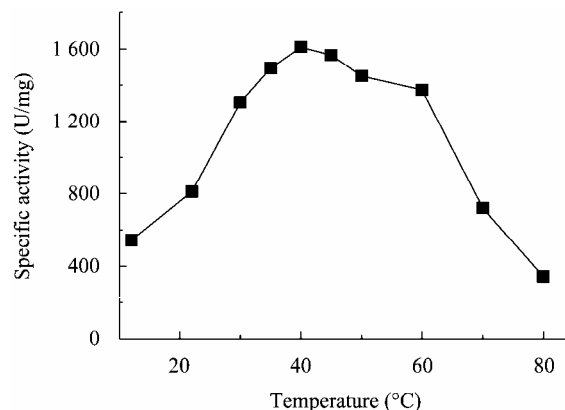


图 4 温度对 L-LDH 催化反应速度的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of L-LDH

最适 pH 值的测定: 用不同 pH 值的 0.05 mmol/L 乙酸缓冲液或 0.05 mmol/L 咪唑缓冲液溶解丙酮酸钠和 NADH, 取相同体积的纯酶液, 在 40 °C 条件下, 催化相同浓度的反应底物(添加或者不添加激活剂), 以比酶活为纵坐标, 不同反应的 pH 为横坐标作图, 结果如图 5 所示: 在不添加激活剂的曲线中, 最适 pH 在 4.5–4.8 之间, 但 pH 超过 6.1 后, 酶活力迅速降低, 以致在碱性方向基本检测不到酶活。当在底物溶液中添加激活剂 FBP 时能大幅度提高酶活(接近 1.7 倍), 而且使最适 pH 向中性方向偏移, 最适 pH 均为 6.6–6.8 之间。 Mn^{2+} 的加入, 促进了 FBP 与 L-LDH 的亲合性, 在提高酶活力的同时, 进一步拓宽了乳酸脱氢酶的最适 pH 范围, 甚至在 pH 为 8.4 时仍能检测到酶活。

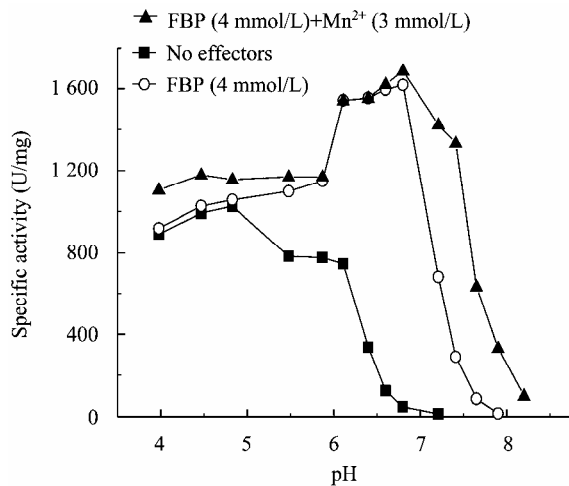


图5 在添加或不添加激活剂时 pH 对 L-LDH 催化反应速度的影响

Fig. 5 Effect of the pH on the activity of L-LDH with and without the addition of effectors

2.5 不同金属离子对酶活性的影响

由于 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 是某些酶的激活剂, 在最适反应条件下, 反应体系中添加一定浓度的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 和 $CaCl_2$, 研究不同金属离子以及离子浓度变化对酶活性的影响。实验结果如图 6 所示: Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 L-LDH 有激活作用, 而 Zn^{2+} 却是 L-LDH 的抑制剂。从图 5 和图 6 中可以看出, Mn^{2+} 确实有激活作用, 最适浓度为 3 mmol/L, 但高于此浓度, Mn^{2+} 的激活作用却逐渐降低。 Ca^{2+} 的激活作用随浓度升高而增大, 所以在发酵体系中加入适量的 $CaCO_3$ 不仅可以激活 L-LDH, 还可以使发酵体系中 pH 稳定在酶活最适

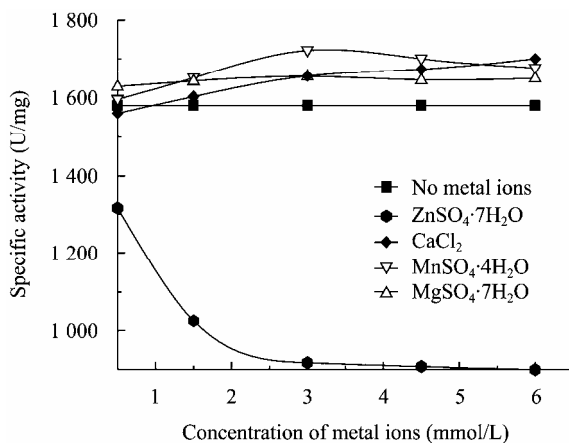


图6 不同金属离子对 L-LDH 酶活性的影响

Fig. 6 Effect of divalent metal ions on the activity of L-LDH

反应范围内, 从而加快乳酸生成。 Mg^{2+} 的激活作用随浓度变化影响不大, 但是 Mg^{2+} 为糖酵解途径中多个关键酶的激活剂, 其中在发酵体系中添加 Mg^{2+} 可以提高磷酸果糖激酶活性, 以提高糖酵解速率。 Zn^{2+} 对 L-LDH 有抑制作用, 随着离子浓度增加, 抑制现象愈明显。

3 讨论

郭怡璠等^[11]以米根霉菌(*As3.819*)基因组为模板, 扩增到 963 bp 的 *ldhL* 基因片段并构建重组质粒 pET30a-*ldhL*, 诱导表达蛋白条带约为 43 kD, 经酶活分析重组蛋白的酶活力为 98 U/mL, 但 *ldhL* 基因在米根霉菌中是十分保守的, 与其他米根霉菌相比同源率为 99.38%, 氨基酸序列的同源率为 100%。黄彦等^[12]以乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)基因组为模板, 克隆得到 *ldhL* 基因, 构建重组质粒 pET-*ldhL* 实现 *ldhL* 基因的表达, 酶活力达到 6.49 U/mL, 是野生菌酶活力(2.82 U/mL)的 2.3 倍, 最适反应温度为 27 °C–30 °C, 最适 pH 为 5.0–5.3。李剑等^[13]构建一株产 D,L-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) MD-1 的基因文库并分离克隆得到 *ldhL* 基因, 序列分析表明 *ldhL* 基因编码的蛋白质有 3 个保守区域, 其中 Gly13–Asp50 保守区域是 NADH 的结合位点, Asp73–Ile100 和 Asn123–Arg154 保守区是酶的活性部位。该 *ldhL* 基因和其他乳杆菌的 *ldhL* 基因序列相似性为 64.11%, 氨基酸序列相似性为 68.19%, 诱导表达的粗蛋白酶活性为 4.64 U/mg。李宁军等^[14]以 *Lactococcus lactis* 基因组为模板 PCR 扩增得到 *ldhL* 基因, 以大肠杆菌-双叉双歧杆菌的穿梭质粒 pHJ 为基础构建重组质粒 pHJ-*ldhL*, 表达的重组蛋白分子量约为 36 kD, 粗抽提液中 L-LDH 的比酶活为 5.5 U/mg。

关于干酪乳杆菌中乳酸脱氢酶的性质研究未见报道。本研究以 *L. casei* G-02 基因组为模板, 利用 PCR 技术扩增出 *ldhL* 基因, 经测序和 NCBI 的 BLAST 比对分析, 与 GenBank 公布的 *L. casei* BL23 中 *ldhL* 基因序列的同源率为 99%, 氨基酸序列的同源率为 100%, 说明 *ldhL* 基因在干酪乳杆菌中是非常保守的。进一步构建重组质粒 pET-*ldhL*, 并将其

转化至 *E. coli* BL21(DE3)中, 成功实现了 *ldhL* 基因的表达, 重组蛋白经亲和层析纯化并 SDS-PAGE 分析显示约在 40 kD 处出现明显的特征蛋白条带, 通过活性分析, L-LDH 的比酶活为 1 722 U/mg, 表明 *ldhL* 基因的表达产物具有较高的生物活性, 最适反应温度为 40 °C–45 °C, 果糖-1,6-二磷酸(FBP)为别构激活剂, 使最适 pH 向中性方向偏移(pH 为 6.6–6.8), 且大幅度提高酶活(接近 1.7 倍), Mn^{2+} 的加入促进了 FBP 与 L-LDH 的亲合性, 拓宽了最适酶活 pH 范围。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 L-LDH 有激活作用, 而 Zn^{2+} 对 L-LDH 有抑制作用。

从链球菌^[15–16]的研究可知, FBP 通过影响别构酶 L-LDH 的活力, 改变发酵代谢途径的方向和通量: 在细胞内 FBP 充足时, 发酵产物主要是乳酸; 而细胞内 FBP 缺乏时, 发酵产物主要是乙酸、甲酸和乙醇。因此必须适当调节葡萄糖碳源流向糖酵解途径和磷酸戊糖途径, 使之积累更多的 FBP, 以达到最大程度积累乳酸的目的。这种代谢调控机制同样适用于以 FBP 为乳酸脱氢酶变构激活剂的干酪乳杆菌细胞。从酶活性分析中可以看出, 当底物丙酮酸和 NADH 的初始浓度很低时, 酶活量很低, 因此发酵体系中必须有充足的丙酮酸和 NADH。要达到这一目的, 必须在加速糖酵解途径的同时抑制有氧呼吸, 在糖酵解途径中, ATP 是合成 FBP 关键酶磷酸果糖激酶和 L-LDH 的强抑制剂。FBP 一方面通过醛缩酶转化为甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸, 最终生成底物丙酮酸; 另一方面又作为 L-LDH 的变构激活剂。所以, 胞内 FBP 的浓度决定着胞内乳酸的合成速率。因此, 为了达到最快和最大程度地积累乳酸, 如何调控胞内 FBP 浓度、能量水平、还原力以及几种酶激活剂浓度, 是研究的下一个目标。

参 考 文 献

- [1] 钱志良, 胡军, 雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 49–53.
- [2] Ohara H, Okuyama H, Sawa S, et al. Development of industrial production of high molecular weight poly-L-lactate from renewable resources[J]. Nippon Kagaku Kaishi, 2001(6): 323–331.
- [3] de Vries W, Kapteijn WMC, van der Beek EG, et al. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures[J]. Gen Microbiol, 1970, 63(3): 333–345.
- [4] Gordon GL, Doelle HW. Purification, properties and immunological relationship of L(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*[J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 67(2): 534–555.
- [5] Arai K, Hishida A, Ishiyama M, et al. An absolute requirement of fructose 1,6-bisphosphate for the *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase activity induced by a single amino acid substitution[J]. Protein Engineering, 2002, 15(1): 35–41.
- [6] Ge XY, Qian H, Zhang WG. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism[J]. Microbiol Biotechnol, 2010, 20(1): 101–109.
- [7] Ge XY, Yuan J, Qin H, et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature[J]. Applied Microbiol Biotechnol, 2011, 89(1): 73–78.
- [8] Sambrook J, Ruseel DW. Molecular Cloning[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [9] 李建武, 萧能, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 351–353.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 39–47.
- [11] 郭怡璠, 迟玉杰, 王君伟. 米根霉菌 *ldhL* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1016–1020.
- [12] 黄彦, 韦宇拓, 张黎, 等. 乳酸片球菌 L-乳酸脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 68–71.
- [13] 李剑, 唐赶, 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.
- [14] 李宁军, 李琳, 江培翊, 等. 外源乳酸脱氢酶基因在双歧杆菌中的表达[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2002, 41(6): 660–663.
- [15] Crow VL, Pritchard GG. Fructose-1,6-diphosphate activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis* kinetic properties and factors affecting activation[J]. J Bacteriol, 1977, 131(1): 82–91.
- [16] Thomas TD, Turner KW, Crow VL. Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products, and regulation[J]. J Bacteriol, 1980, 144(2): 672–682.