

诊断用 D-乳酸脱氢酶研究进展

罗维晓, 徐振上, 刘新利* (齐鲁工业大学生物工程学院/生物材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东济南 250353)

摘要 D-乳酸脱氢酶是乳酸脱氢酶根据结构进行区分的重要的一类工具酶。从不同微生物中提取的 D-乳酸脱氢酶的来源、基因工程以及固定化等方面综述了 D-乳酸脱氢酶的研究进展, 以期获取优质的诊断用 D-乳酸脱氢酶提供理论指导。

关键词 D-乳酸脱氢酶; 来源; 基因工程; 酶固定化

中图分类号 Q936 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0011-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.003

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research Progress of D-lactate Dehydrogenase for Diagnosis

LUO Wei-xiao, XU Zhen-shang, LIU Xin-li (School of Bioengineering, Qilu University of Technology / State Key Laboratory of Bio-based Materials and Green Paper Making, Jinan, Shandong 250353)

Abstract D-lactate dehydrogenases (D-LDHs) are an important class of enzymes that differentiate lactate dehydrogenases according to their structure. In this paper, the source, genetic engineering and immobilization of D-lactate dehydrogenase extracted from different microorganisms were summarized in the research progress of D-lactate dehydrogenase, in order to provide theoretical guidance for obtaining high-quality diagnostic D-lactate dehydrogenase.

Key words D-lactate dehydrogenase; Source; Genetic engineering; Enzyme immobilization

D-乳酸脱氢酶以氧化型辅酶 I (NAD^+)/还原型辅酶 I (NADH) 作为辅酶, 可以可逆催化氧化乳酸生成丙酮酸, 根据这一反应原理 D-乳酸脱氢酶在分析其他酶和生物制品中广泛应用, 在临床诊断中 D-乳酸脱氢酶作为天门冬氨酸氨基转移酶^[1]、丙氨酸氨基转移酶^[2]、同型半胱氨酸^[3]、钾离子酶法^[4]等诊断项目中的关键工具酶, 用于人体各项疾病的辅助诊断。

决定试剂性能的关键是工具酶的质量, 而工具酶的生产工艺又是决定其质量和产率的关键因素, 由于诊断试剂自身的复杂性, 作为诊断工具酶应该具备对底物专一性高、酶自身热稳定性好、酸碱耐受范围宽、比活性高、有害杂酶含量低等要求^[5], 为了能够提高工具酶的质量, 首先需要选育高产菌株, 探索最优化的发酵工艺和后提取纯化技术, 以提高酶的产率, 保证原酶质量。目前随着基因工程菌技术的不断成熟, 通过基因改造, 能够大大提高目的酶的产量以及改善酶的性质。另外为了进一步提高酶的性能以及拓展工具酶在一些特定领域内的应用, 通过酶固定化技术来达到特定的效果, 也是工具酶后期研究的不可或缺的一部分^[6]。对于乳酸脱氢酶的研究, 国内外多数以如何提高其下游产物乳酸或苯乳酸的报道较多, 黄艳娜等^[7-8]针对该问题进行了详细的报道, 对于单纯诊断用乳酸脱氢酶的国内研究相对较少^[9], 尤其是针对 D-乳酸脱氢酶的研究则更少^[10], 笔者将从 D-乳酸脱氢酶的来源、基因工程以及固定化修饰方面综述了 D-乳酸脱氢酶的研究进展。

1 D-乳酸脱氢酶的来源

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenases, LDHs)按照催化生成乳酸构型不同, 可将乳酸脱氢酶分为 D-乳酸脱氢酶(D-

LDH) 和 L-乳酸脱氢酶(L-LDH), 分别催化丙酮酸生成有光学纯度的 D-乳酸和 L-乳酸^[11-12]。乳酸脱氢酶广泛存在于微生物和动物各种组织之中, 不同来源的乳酸脱氢酶性质差异较大^[13-16], 从动物的心肌、肝、肾、骨骼肌或肺等组织器官中获取的乳酸脱氢酶主要是 L-乳酸脱氢酶, 只有少许无脊椎动物具有 D-乳酸脱氢酶^[17]; 从微生物体内获取的乳酸脱氢酶既包含 L 型的乳酸脱氢酶又包含 D 型的乳酸脱氢酶, 能够获得乳酸脱氢酶的微生物主要有芽孢杆菌、嗜热菌和乳酸菌等^[18-21]。

国外不同菌种中提取 D-乳酸脱氢酶的研究相对较早, 1972 年 Purohit 等^[17]从异水霉菌雄性杂交菌株中分离得到了 D(-)-乳酸脱氢酶, 系统介绍 D-LDH 进行分离纯化的方法步骤, 并对其性质和变构特性进行了深入研究, 并经过 6 个步骤提纯后得到的酶活性比 456.99 U/mg。Busto 等^[22]对大肠杆菌中 D(-)-乳酸脱氢酶的动力学性质进行研究, 发现原位研究的 D(-)-乳酸脱氢酶与体外研究的 D(-)-乳酸脱氢酶的动力学特性有显著差异, 为大肠杆菌产 D(-)-乳酸脱氢酶在不同条件的应用提供了依据。Ma 等^[23]从土壤中分离出 stutzeri 假单胞菌, 并对其产生的 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶活性进行了研究, 检测到 2 种立体特异性 NAD-independent 乳酸脱氢酶(iLDH)的活性, 表明 stutzeri SDM 中存在 2 种独立的酶, 为从假单胞菌中获取 D-乳酸脱氢酶提供了可能性。Satomura 等^[24]从 7 株 tokodaii 磺隆菌中发现了嗜热嗜酸酶 *S. tokodaii* 染料连接的 D-乳酸脱氢酶, 这是一种新型的 FAD 型 D-乳酸脱氢酶, 经过测量酶的分子质量约为 93 kD, 是由相同亚基组成的同源二聚体, 分子质量约为 48 kD, 并确定了其基因序列。同年 Mourier 等^[25]研究了羧酸对酵母线粒体 D-乳酸脱氢酶的动力学激活, 证明了以 D-乳酸为底物的磷酸化或非磷酸化条件下, 羧酸可以刺激线粒体呼吸速率, 并对这种调节的生理学意义进行了讨论。前期对于 D-乳酸脱氢酶的研究则主要以提高酶的产量以及提纯

作者简介 罗维晓(1990—), 男, 山东济南人, 工程师, 硕士, 从事诊断酶研究。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物活性代谢产物研究。

收稿日期 2021-03-18

工艺的研究^[26],随着市场对于诊断用 D-乳酸脱氢酶的需求的增加, Kim 等^[26]对简氏乳杆菌 D-乳酸脱氢酶的晶体结构和热力学性质进行了研究,获取了一种耐高温的 D-乳酸脱氢酶,热稳定性高达 54.5 ℃,远远高于当时市售的 D-乳酸脱氢酶(42.7 ℃),也正是由于稳定性的提高,更有利于 D-LDH 在体外诊断试剂中的应用。

2 酶的工程菌改造

在正常的生物细胞中,由于其内在活动机制原因,生物体内酶活性以及酶产量十分有限。基因工程的应用可以对已知酶的性质进行分析,改变酶的性能,扩大酶的适用范围以及增强酶的活性,以达到提高酶产量的目的。自从 Bernard 等^[27]首次报道了克隆 *L. bulgaricus* 基因组中 D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)的完整序列以来,D-乳酸脱氢酶的基因改造研究众多,而针对 D-乳酸脱氢酶基因工程的菌株研究目前主要集中在乳酸杆菌、大肠杆菌等工程菌,李剑等^[28]通过构建基因文库从 *Lactobacillus* sp. MD21 菌株中筛选到一个新的编码 D-LDH 的基因 *ldhD*,并对其编码的蛋白质的一级结构进行了初步分析,通过乳酸杆菌 L-乳酸脱氢酶基因(*ldhL*)缺失方法,获取高纯度的 D-LDH。但大多数将其他菌种的 D-乳酸脱氢酶的基因在大肠杆菌中表达,在 20 世纪 90 年代初有学者将编码 *Lactobacillus plantarum*^[29]、*Lactobacillus bulgaricus*^[27] 和 *Lactobacillus helveticus*^[30] 的 D-LDH 的基因 *ldhD* 导入大肠杆菌中进行了克隆表达; Arai 等^[31]对戊糖乳杆菌 JCM1558(ATCC 8041)乳酸脱氢酶进行定点突变,用天冬氨酸替换第 101 位的脯氨酸(P101N),P101N 表现出广泛的底物特异性,对苯丙酮酸催化活性相对较高,经过提取得到的酶活比达到 480 U/mg; Yang 等^[32]构建了 D-LDH 重组大肠杆菌菌株,使 D-LDH 酶活提高了 10 倍以上,并分析了相关途径中碳原子的代谢流向。黄艳燕等^[33]利用 PCR 的方法从鼠李糖乳杆菌基因组 DNA 中扩增到 D-(+)-乳酸脱氢酶基因 *ldhD*,并连接到载体 pSE380 上,构建表达质粒 pSE-*ldhD*,将重组质粒 pSE-*ldhD* 转化大肠杆菌 BL21(DE3),重组菌株经 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳分析表明 *ldhD* 在大肠杆菌中实现了表达,表达产物的分子量约为 37 kD,测得重组菌株的 D-乳酸脱氢酶活力为 5.4 U/mL。Mu 等^[34]克隆了嗜酸小球菌 DSM 20284 的 D-乳酸脱氢酶基因,并在大肠杆菌中表达,重组酶经镍亲和层析纯化,在 30 ℃ 和 pH 5.5 的条件下,苯丙酮酸(PPA)转化为 3-苯乳酸的效率最高,PPA 和丙酮酸的活性比分别为 140 和 422 U/mg。宋嘉宁等^[35]以肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)基因组 DNA 为模板,克隆出 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD*,将其连接到表达载体 pET-22b(+)质粒上,构建 pET-22b(+)-*ldhD* 重组质粒,检测结果 100% 正确;将重组质粒 pET-22b(+)-*ldhD* 转化到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中,通过氨苄霉素抗性平板筛选,构建大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-22b(+)-*ldhD* 基因工程菌。Jun 等^[20]筛选了 3 株不同的延森氏乳杆菌 D-LDH,通过基因组挖掘,在大肠杆菌中表达,其中 D-LDHs(D-LDH3)显示最佳反应温度(50 ℃),拥有非常强的热稳定性。蔡昱

萌等^[36]通过克隆詹氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶,将其进行体外表达,最适温度为 45 ℃,具有更好的耐热性和更高的催化活力。Huang 等^[37]通过基因工程将 D-LDHs 基因(*ldb0101*、*ldb0813*、*ldb1010*、*ldb1147* 和 *ldb2021*)被克隆并过表达来自 pUC18 诱导载体大肠杆菌 JM109,并对得到的菌株进行数值比较,提高了乳酸脱氢酶的含量和产乳酸的能力。Nakano 等^[38]为了提高 *S. laevolacticus* D-LDH 的活性,采用定点诱变的方法取代靠近底物结合位点或活性中心的部分氨基酸残基,研究发现 *S. laevolacticus* D-LDH 的 Ala234 是一个重要的氨基酸残基,对催化活性有积极的影响,双突变体 D-LDH T75L/A234S 比野生型 D-LDH 提高了 6.8 倍。基因工程改造后的 D-乳酸脱氢酶基因多数在大肠杆菌中进行克隆表达,大肠杆菌作为基因工程受体菌具有易于培养、遗传背景清楚、目标基因表达水平高、表达系统成熟完善等优势,但是 *ldhD* 序列过量表达 D-LDH 会抑制重组大肠杆菌生长^[39]。

3 乳酸脱氢酶的固定化

酶固定化方法是指将游离酶固定在载体上,使其不能自由移动的方法。游离的乳酸脱氢酶在实际应用中存在着耐酸碱性弱、耐热性不强、性质较不稳定等局限性,固定化酶能有效提高酶催化过程的性能,有效克服这些局限性。固定化酶的特性由固定化载体和固定化方法决定^[40],常见的固定化方法包括吸附法^[6]、包埋法^[41]、共价结合法^[42]、交联法^[43]等。余冲等^[44]对酶不同的固定化载体的选择和不同固定化方法进行了报道,并就各种方法的优缺点进行了详细比较,还重点介绍了酶定向固定化、多酶共固技术等新型酶固定化方法^[45-47]。陈海欣等^[48]则对传统的固定方法和固定载体选择进行对比分析的同时,提出了金属-有机框架材料(MOFs)和共价有机框架材料(COFs)作为新型载体应用到酶的固定化中。

目前对于乳酸脱氢酶的固定方法有传统方法也有创新方法。传统方法中包埋法具有方法简便操作、稳定性好等优点,早在 1988 年李慧贤等^[49]用 CNBr 活化的 Sepharose 4B 进行了包埋固定化,通过该方法使得用于诊断的乳酸脱氢酶自身稳定性和保存液稳定性方面有很大的提高,但酶活力回收相对较低。吸附法具有反应条件温和、载体廉价易得等优势,丁良等^[50]利用 X 射线微区分法,对采用吸附法合成出的以大孔吸附树脂为载体的固定化乳酸脱氢酶进行分析,确定该方法的可行性,该方法从定量的角度来研究载体的表面及内部结构与酶活性的关系,并确定酶活性最高的结构;姚莉丽^[51]以啤酒酵母菌为乳酸脱氢酶(LDH)制备的菌种来源,建立了以纳米级磁性壳聚糖微球(magnetic chitosan microspheres, M-CS)为载体固定化乳酸脱氢酶的方法同样取得了较好的效果,证明了物理法用于乳酸脱氢酶固定的可行性。交联法得到的固定化酶具有不易脱落的优势,覃建军等^[52]以磁性壳聚糖作为载体,戊二醛作为交联剂,对乳酸脱氢酶(LDH)进行固定化,得出最适条件为戊二醛浓度 6%、pH 7.5、酶的偶联时间 2 h;并对固定化酶进行性能验证,在室温下与底物重复反应 6 次后,活力仍保留 60% 以上,说明固定

化酶具有较好的热稳定性、贮存稳定性和复用性。

随着 D-乳酸脱氢酶新的固定方法和载体新技术的不断出现,在乳酸脱氢酶固定化方面同样进行了新的探索,徐俊等^[53]使用异硫氰酸酯作为载体同时将醇脱氢酶、乳酸脱氢酶和辅酶 I 进行固定,实现了多重酶的共固定化,得到的固定化三元全酶系统的辅酶再生能力为相应游离酶系统的 4 倍。鹿浔等^[54]以十六烷基三甲基溴化铵 (CATB)-辛烷-己醇反胶束体系对乳酸脱氢酶 (LDH) 进行固定化,采用反胶束法对乳酸脱氢酶进行固定,使得固定化 LDH 具有较好的热稳定;柳杨先等^[55]对反胶束体系中的催化动力学研究,进一步确认了该方法可以有效地提高 LDH 的热稳定性。Zaboli 等^[56]提出在原始碳纳米管和羧基功能化碳纳米管上固定 D-乳酸脱氢酶诊断酶的试验,并对分子动力学进行了模拟研究,结果发现,经过该方法固定的 D-乳酸脱氢酶热稳定性有较大提升,该方法可以用于工业化。关于新型载体, Ma 等^[57]又提出了使用双壁碳纳米管掺杂海藻酸凝胶生物复合材料的方法固定化乳酸脱氢酶,该方法旨在降低泄漏量、提高酶的活性,使用该方法固定化形成的复合材料的 LDH 泄漏量显著降低了 61.7%。

4 展望

随着体外诊断行业的高速发展,诊断用酶的需求量越来越大,目前国内大多数的诊断用酶均依赖进口,乳酸脱氢酶作为一种非常重要的诊断工具酶,在体外诊断领域中应用非常广泛,该领域内 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶均有应用,其中以 D-乳酸脱氢酶应用居多,由于通过微生物发酵的方法获取的 D-LDH 的酶类纯度更高,更加易于操作,因此商业化产品中多数采用该方法进行提取;而 L-乳酸脱氢酶多从哺乳动物组织器官中提取,提取要求和工艺更加复杂。此外通过微生物获取的 D-LDH 仅需要 2~8 °C 甚至常温即可实现长期稳定储存,而从动、植物体内提取的 L-乳酸脱氢酶则需要 -20 °C 或者更低的温度进行储存,这实际对酶类的应用范围起到了很大限制。

诊断用酶在使用过程中往往与其他物料混合在一起使用或储存,多数情况下,其他物料的添加会显著降低酶类的稳定性,因此这要求诊断酶需要有更高的稳定性^[58]。因此为获取优质的诊断用酶,国外的商品化诊断酶基本上都通过工程菌株来获取。进口的 D-乳酸脱氢酶中无论从酶的纯度还是酶的稳定性方面均有明显的优势,还有部分日美企业为了提高酶的性能采用固定修饰的方法对获取的酶进行固定化,尤其是一些新的酶修饰和固定化技术的应用,对于酶后期性能的提升起到不可忽视的作用,目前国内诊断用酶依然对进口依赖较大,关键原材料卡脖子情况时有发生,因此国内对于诊断用酶的研究和进一步产业化依然有巨大的发展空间。

参考文献

[1] 宋耀虹,李学仁. 天门冬氨酸氨基转移酶连续监测法最适条件的探讨[J]. 化学试剂,1991,13(2):111-114.
[2] SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of en-

zymes at 37 °C. Part 4: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase[J]. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2002, 40(7): 718-724.
[3] 王笃强,沈云龙,廖远平等. 循环酶法同型半胱氨酸检测关键酶 CBS 和 CBL 的开发及试剂盒研制初探[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(2): 81-87.
[4] BERRY M N, MAZZACHI R D, PEJAKOVIC M, et al. Enzymatic determination of sodium in serum[J]. Clinical chemistry, 1988, 34(11): 2295-2298.
[5] 罗侃,崔有宏. 诊断用酶的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2000, 21(1): 57-59.
[6] 贾峰,郑连炳,王志强. 生物酶固定化技术研究现状[J]. 资源节约与环保, 2020(4): 116.
[7] 黄艳娜,许光涛,游春苹. 乳酸菌中乳酸脱氢酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 369-373.
[8] 富敏霞,祝铃钰,贡军贤. 乳酸脱氢酶的分离纯化及其催化合成苯乳酸的研究进展[J]. 化工进展, 2018, 37(12): 4814-4820.
[9] RICHTER N, ZIENER T A, HUMMEL W. A single-point mutation enables lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* to utilize NAD⁺ and NADP⁺ as cofactor[J]. Engineering in life sciences, 2011, 11(1): 26-36.
[10] 石军峰,杨海麟,王武. 高纯度诊断用乳酸脱氢酶的制备和酶促反应[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 38-42.
[11] SIMON E S, PLANTE R, WHITESIDES G M. D-lactate dehydrogenase. Substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 1989, 22(2): 169-179.
[12] CRISTESCU M E, EGBOSIMBA E E. Evolutionary history of d-lactate dehydrogenases: A phylogenomic perspective on functional diversity in the FAD binding oxidoreductase/transferase type 4 family[J]. Journal of molecular evolution, 2009, 69(3): 276-287.
[13] AL-JASSABI S. Purification and kinetic properties of skeletal muscle lactate dehydrogenase from the lizard *Agama stellio stellio*[J]. Biochemistry, 2002, 67(7): 786-789.
[14] YANG G, JING C X, ZHU P X, et al. Molecular cloning and characterization of a novel lactate dehydrogenase gene from *Clonorchis sinensis*[J]. Parasitology research, 2006, 99(1): 55-64.
[15] LI L, SHIN S Y, LEE K W, et al. Production of natural antimicrobial compound D-phenyllactic acid using *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 whole cells involving highly active D-lactate dehydrogenase[J]. Letters in applied microbiology, 2014, 59(4): 404-411.
[16] LI S N, LI S L, LIU C Y, et al. Extraction and isolation of potential anti-stroke compounds from flowers of *Pueraria lobata* guided by *in vitro* PC12 cell model[J]. Journal of chromatography B, 2017, 1048: 111-120.
[17] PUROHIT K, TURIAN G. D(-)-lactate dehydrogenase from *Allomyces*. Partial purification and allosteric properties[J]. Archiv für mikrobiologie, 1972, 84(4): 287-300.
[18] ZHENG Z J, MA C Q, GAO C, et al. Efficient conversion of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by using whole cells of *Bacillus coagulans* SDM [J]. PLoS One, 2011, 6(4): 1-7.
[19] ZHU Y B, HU F G, ZHU Y Y, et al. Enhancement of phenyllactic acid biosynthesis by recognition site replacement of D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus pentosus*[J]. Biotechnology letters, 2015, 37(6): 1233-1241.
[20] JUN C H, SA Y S, GU S A, et al. Discovery and characterization of a thermostable D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus jensenii* through genome mining[J]. Process biochemistry, 2013, 48(1): 109-117.
[21] FURUKAWA N, MIYANAGA A, TOGAWA M, et al. Diverse allosteric and catalytic functions of tetrameric D-lactate dehydrogenases from three Gram-negative bacteria[J]. AMB Express, 2014, 4(1): 1-12.
[22] BUSTO F, SOLER J, DE ARRIAGA D, et al. *In situ* behaviour of D(-)-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*[J]. Archives of microbiology, 1984, 139(2/3): 255-259.
[23] MA C Q, GAO C, QIU J H, et al. Membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities of a newly isolated *Pseudomonas stutzeri* strain[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2007, 77(1): 91-98.
[24] SATOMURA T, KAWAKAMI R, SAKURABA H, et al. A novel flavin adenine dinucleotide (FAD) containing D-lactate dehydrogenase from the thermoacidophilic crenarchaeota *Sulfolobus tokodaii* strain 7: Purification, characterization and expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2008, 106(1): 16-21.
[25] MOURIER A, VALLORTIGARA J, YBOUOE E D, et al. Kinetic activation

- of yeast mitochondrial D-lactate dehydrogenase by carboxylic acids[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1777(10): 1283–1288.
- [26] KIM S, GU S A, KIM Y H, et al. Crystal structure and thermodynamic properties of d-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus jensenii*[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2014, 68: 151–157.
- [27] BERNARD N, FERAIN T, GARMYN D, et al. Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Letters*, 1991, 290(1/2): 61–64.
- [28] 李剑, 唐赞, 梁凤来, 等. D-乳酸脱氢酶基因克隆及其表达[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 491–495.
- [29] TAGUCHI H, OHTA T. D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of biological chemistry*, 1991, 266(19): 12588–12594.
- [30] KOCHHAR S, HOTTINGER H, CHUARD N, et al. Cloning and overexpression of *Lactobacillus helveticus* D-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli*[J]. *European journal of biochemistry*, 1992, 208(3): 799–805.
- [31] ARAI K, KAMATA T, UCHIKOBA H, et al. Some *Lactobacillus* L-lactate dehydrogenases exhibit comparable catalytic activities for pyruvate and oxaloacetate[J]. *Journal of bacteriology*, 2001, 183(1): 397–400.
- [32] YANG Y T, SAN K Y, BENNETT G N. Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion[J]. *Metabolic engineering*, 1999, 1(2): 141–152.
- [33] 黄艳艳, 黄靖华, 卢福芝, 等. 鼠李糖乳杆菌 D-(+)-乳酸脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *生物技术通报*, 2010(12): 196–200.
- [34] MU W M, YU S H, JIANG B, et al. Characterization of D-lactate dehydrogenase from *Pediococcus acidilactici* that converts phenylpyruvic acid into phenyllactic acid[J]. *Biotechnology letters*, 2012, 34(5): 907–911.
- [35] 宋嘉宁, 黄志兵, 刘璐, 等. 肺炎克雷伯氏菌 D-乳酸脱氢酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(2): 79–83.
- [36] 蔡昱萌, 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.
- [37] HUANG Y N, YOU C P, LIU Z M, et al. Cloning of D-lactate dehydrogenase genes of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and their roles in D-lactic acid production[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(3): 1–7.
- [38] NAKANO K, SAWADA S, YAMADA R, et al. Enhancement of the catalytic activity of d-lactate dehydrogenase from *Sporolactobacillus laevolacticus* by site-directed mutagenesis[J]. *Biochemical engineering journal*, 2018, 133: 214–218.
- [39] BUNCH P K, MAT-JAN F, LEE N, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 1997, 143(1): 187–195.
- [40] 柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 等. 酶的固定化技术最新研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 188–203.
- [41] YUAN C S, LIU S M, WNUK S F, et al. Design and synthesis of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents[J]. *Advances in antiviral drug design*, 1996, 2(2): 41–88.
- [42] NELSON J M, GRIFFIN E G. Adsorption of invertase[J]. *Journal of the American chemical society*, 1916, 38(5): 1109–1115.
- [43] WANG X, MAKAL T A, ZHOU H C. Protein immobilization in metal-organic frameworks by covalent binding[J]. *Australian journal of chemistry*, 2014, 67(11): 1629–1631.
- [44] 余冲, 孙秀丽, 王东旭, 等. 酶固定化载体及固定方法最新研究进展[J]. *广东化工*, 2021, 48(2): 60–62, 78.
- [45] SCHOEVAART R, WOLBERS M W, GOLUBOVIC M, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)[J]. *Biotechnology bioengineering*, 2004, 87(6): 754–762.
- [46] CZYRKO J, SLIWIAK J, IMIOLCZYK B, et al. Metal-cation regulation of enzyme dynamics is a key factor influencing the activity of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 4476–4480.
- [47] YUAN C S, SASO Y, LAZARIDES E, et al. Recent advances in S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors and their potential clinical applications[J]. *Expert opinion on therapeutic patents*, 1999, 9(9): 1197–1206.
- [48] 陈海欣, 张赛男, 赵力民, 等. 固定化酶: 从策略到材料设计[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(1): 88–95.
- [49] 李慧贤, 汪静英. 固定化乳酸脱氢酶的研究[J]. *生物工程学报*, 1988, 4(1): 70–72.
- [50] 丁良, 姚子华, 李彤. 固定化乳酸脱氢酶活性的 X 射线微区分析[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(2): 56–59.
- [51] 姚莉丽. 乳酸脱氢酶的制备及其固定化研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [52] 覃建军, 刘璇, 柳畅先. 壳聚糖固定化乳酸脱氢酶的制备及酶学性质研究[J]. *分析科学学报*, 2009, 25(5): 571–574.
- [53] 徐俊, 楼一心, 朱正华. 异硫氰酸酯法固定化醇脱氢酶乳酸脱氢酶和辅酶 I[J]. *华东化工学院学报*, 1989, 15(4): 436–440.
- [54] 虞浔, 程洁, 柳畅先. 反胶束固定化乳酸脱氢酶的催化动力学性质研究[J]. *分析科学学报*, 2008, 24(3): 280–282.
- [55] 柳畅先, 胡亚楠, 马璐. 乳酸脱氢酶在 CTAB-戊醇反胶束体系中的催化动力学研究[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2012, 31(3): 10–13.
- [56] ZABOLI M, RAISSI H, ZABOLI M, et al. Stabilization of D-lactate dehydrogenase diagnostic enzyme via immobilization on pristine and carboxyl-functionalized carbon nanotubes, a combined experimental and molecular dynamics simulation study[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2019, 661: 178–186.
- [57] MA L J, WEN J P, LU W Y, et al. Efficient immobilization of lactate dehydrogenase in biocomposites of double-walled carbon nanotube-doped alginate gel[J]. *Enzyme and microbial technology*, 2008, 42(3): 235–241.
- [58] 刘雪凌, 林贝. 载体固定化酶的应用及前景展望[J]. *广州化工*, 2020, 48(9): 22–24.