

# 植物乳杆菌LY-78乳酸脱氢酶基因的生物信息学分析

李 芬<sup>1</sup>, 孙大庆<sup>1,2</sup>, 张丽萍<sup>1,2,\*</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

**摘 要:** 目的: 探究植物乳杆菌LY-78菌株全部5个乳酸脱氢酶基因及其编码蛋白质的结构和功能。方法: 应用多种生物信息学软件对植物乳杆菌LY-78菌株的5个乳酸脱氢酶基因及氨基酸序列进行结构分析和功能预测。结果: 植物乳杆菌LY-78中5个乳酸脱氢酶的核苷酸及氨基酸序列均具有较高的保守性, 均为位于细胞质的热稳定性、非分泌、非跨膜蛋白, 除了*ldhL3*基因, 其余4个基因均具有各自高度保守的功能位点和结构域, 均存在典型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>)结合位点序列GXGXXG。结论: 乳酸脱氢酶D1(D1-lactate dehydrogenase, D1-LDH)、D2-LDH、L1-LDH及L2-LDH均具有完整的功能位点和结构域, 很可能具有真正的乳酸脱氢酶活性, L3-LDH由于缺失NAD<sup>+</sup>结合结构域和功能位点, 因而可能不具有乳酸脱氢酶活性, 这些分析结果为今后植物乳杆菌乳酸脱氢酶基因改造和苯乳酸合成代谢机制研究提供了必要的理论基础。

**关键词:** 植物乳杆菌; 乳酸脱氢酶; 苯乳酸; 生物信息学

## Bioinformatic Analysis of Genes Encoding Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* LY-78

LI Fen<sup>1</sup>, SUN Daqing<sup>1,2</sup>, ZHANG Liping<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

**Abstract:** Objective: To explore the structure and function of the five lactate dehydrogenase genes and their encoded proteins from *Lactobacillus plantarum* LY-78. Methods: Several bioinformatic tools were used to analyze and predict the gene sequences and amino acid sequences of lactate dehydrogenase from the strain. Results: The nucleotide and amino acid sequences of the five lactate dehydrogenases in *L. plantarum* LY-78 were all highly conserved. The five lactate dehydrogenase proteins showed thermal stability and were non-secretory and non-transmembrane proteins, which were located in the cytoplasm. All the four genes except *ldhL3* had highly conserved functional sites and domains, and contained the highly conserved sequence GXGXXG, which had typical NAD<sup>+</sup> binding sites. Conclusion: D1-LDH, D2-LDH, L1-LDH and L2-LDH manifest complete functional sites and domains, likely having a real activity of lactate dehydrogenase. Because of the lack of NAD<sup>+</sup> binding domain and functional sites, L3-LDH may not have lactate dehydrogenase activity. These results are important for theoretical researches of genetic modification of the lactate dehydrogenase genes and the metabolic mechanism of phenyllactic acid in *L. plantarum* LY-78.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*; lactate dehydrogenase; phenyllactic acid; bioinformatic

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708017

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)08-0102-05

引文格式:

李芬, 孙大庆, 张丽萍. 植物乳杆菌LY-78乳酸脱氢酶基因的生物信息学分析[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 102-106.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708017. <http://www.spkx.net.cn>

LI Fen, SUN Daqing, ZHANG Liping. Bioinformatic analysis of genes encoding lactate dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* LY-78[J]. Food Science, 2017, 38(8): 102-106. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708017. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-06-17

基金项目: 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2016-Y37); 黑龙江省青年科学基金项目(QC2014C020)

作者简介: 李芬(1991—), 女, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: 577289557@qq.com

\*通信作者: 张丽萍(1957—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: bynkdx007@126.com

苯乳酸 (phenyllactic acid, PLA) 是一种新型天然生物防腐剂, 存在于天然蜂蜜中, 也可由多种微生物产生, 尤其是乳酸菌<sup>[1-3]</sup>。PLA对大多数食源性致病菌(细菌和真菌)具有广谱且高效的抑菌活性, 具有溶解性好、热稳定性高、有效pH值范围宽、对人体及动物细胞安全无毒等特性, 同时PLA作为丹参素的衍生物之一, 临床上可用于冠心病的治疗, 可以调节人体内胆固醇含量水平, 是重要的化工合成原材料之一, PLA还可用于抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)试剂、降血糖制剂及非蛋白质氨基酸的合成, 因此PLA在食品、医药及化工等行业中具有广阔的应用前景<sup>[4-8]</sup>。

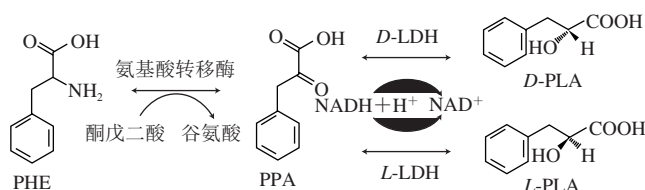


图1 微生物合成PLA的核心代谢途径<sup>[10]</sup>

Fig. 1 Metabolic pathways of PLA in microorganisms<sup>[10]</sup>

微生物中PLA合成的核心代谢途径为转氨反应及氧化还原反应(图1), 涉及的酶类主要为转氨酶和氧化还原酶两大类。苯丙氨酸(phenylalanine, PHE)经转氨酶作用生成苯丙酮酸(phenylpyruvic acid, PPA), PPA再经氧化还原酶(主要为乳酸脱氢酶)还原作用生成D型或L型PLA, 以往研究表明, PHE转化PPA是PLA合成的限速步骤, 因此乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)在PLA合成代谢途径中至关重要<sup>[4]</sup>。LDH又称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)氧化酶, 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, 广泛存在于动物组织及微生物细胞内<sup>[9]</sup>。不同微生物来源的LDH的活性差异很大, 这是由于不同微生物中ldh基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列存在差异, 进而导致酶学性质的各不相同。黑龙江八一农垦大学食品学院微生物室经筛选获得一株高产PLA的植物乳杆菌LY-78<sup>[10]</sup>, 经基因组测序获知, 该菌株具有5个不同的ldh基因, 本研究以5个ldh基因为对象, 对ldh基因的核苷酸序列及氨基酸序列进行了多维度的生物信息学分析, 探究了其编码蛋白质的结构和功能, 推定了5个LDH的结构特征和功能位点, 为今后ldh基因改造和PLA合成代谢机制研究提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物乳杆菌LY-78的5个ldh基因, 见表1。

表1 植物乳杆菌LY-78 5个ldh基因

Table 1 Five genes from *Lactobacillus plantarum*

基因名称	大小/bp	氨基酸个数	GenBank登录号
ldhD1	999	332	KM229325.1
ldhD2	993	330	KX371859
ldhL1	963	320	KM229324.1
ldhL2	930	309	KM229326.1
ldhL3	933	310	KX371860

### 1.2 方法

#### 1.2.1 ldh基因核苷酸与氨基酸序列比对及进化树构建

应用NCBI网站局部比对BLAST程序对5个ldh基因的核苷酸序列及氨基酸序列与数据库中的序列进行对比分析, 分析其保守结构域及植物乳杆菌LY-78和其他物种的LDH的亲缘关系, 并应用MEGA 6.0<sup>[12]</sup>软件对其LDH构建系统进化树。

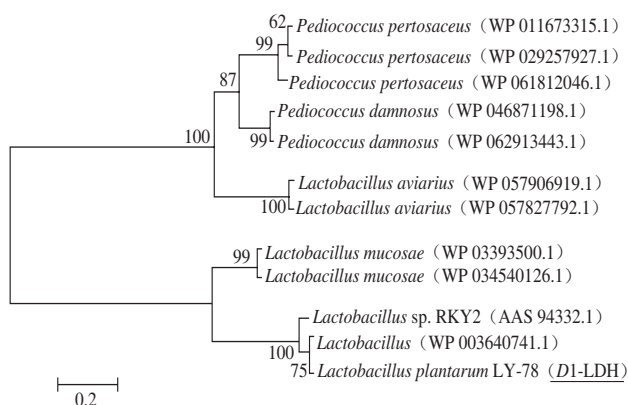
#### 1.2.2 LDH结构与功能分析

应用ExPASy中ProtParam软件预测LDH理化性质, ProtScale软件预测LDH蛋白的亲/疏水性, PROSITE软件预测LDH蛋白的功能位点及结构域; 应用CBS中SignalP 4.1 Server<sup>[13]</sup>软件预测LDH蛋白的信号肽, TMHMM Server v. 2.0软件预测LDH蛋白的跨膜区域; 应用EMBL-EBI中InterProScan<sup>[14]</sup>软件预测LDH蛋白的功能特性(如功能位点、结构域、亚细胞定位等); 最后应用SOPMA<sup>[15]</sup>及Phyre2(折叠识别法)<sup>[16-17]</sup>软件预测LDH蛋白的空间结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 ldh基因核苷酸与氨基酸序列比对分析

对5个ldh基因的核苷酸序列进行BLAST比对分析, 结果显示ldhD1和ldhD2与植物乳杆菌ldhD核苷酸序列一致性均达96%~100%, ldhL1、ldhL2和ldhL3与植物乳杆菌ldhL核苷酸序列一致性均达91%~100%, 这表明植物乳杆菌中ldhD和ldhL基因的核苷酸序列具有高度的保守性。



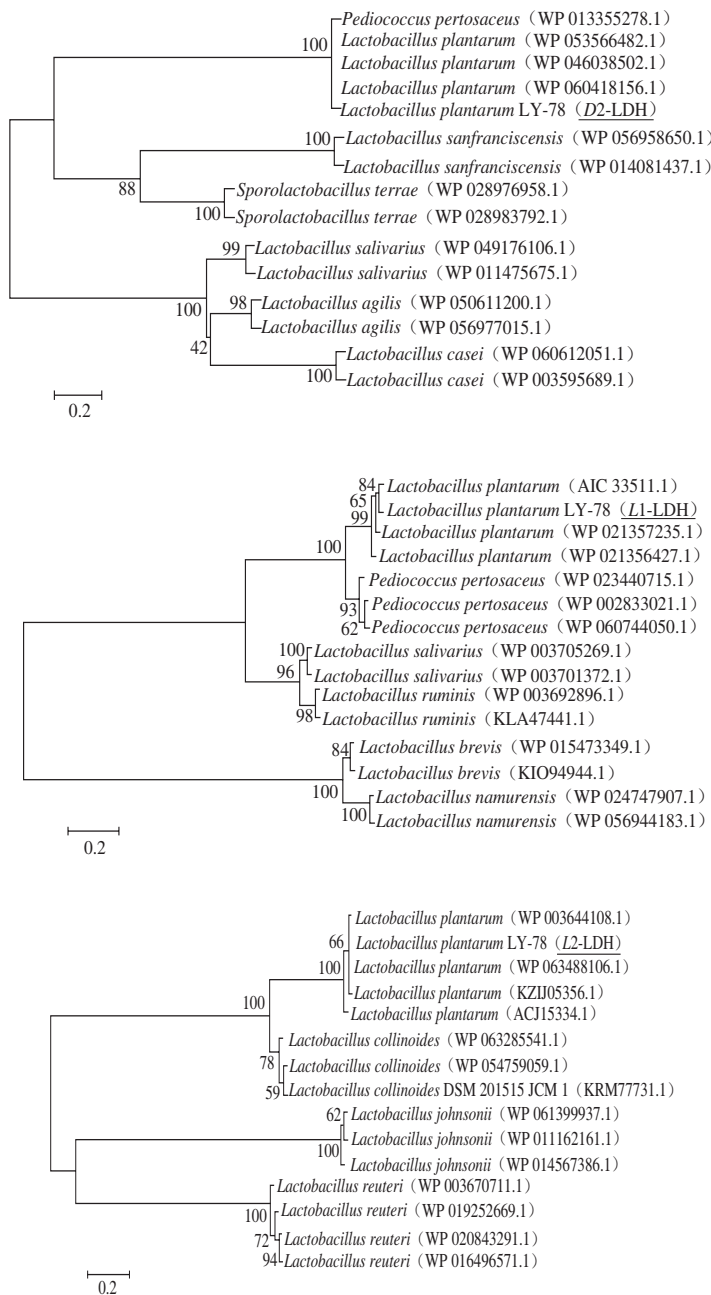


图2 LDH氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of LDH

以LDH氨基酸序列比对结果为基础,采用邻位相接法(Neighbor-Joining)<sup>[18]</sup>对LDH构建氨基酸序列系统进化树,枝长代表分歧度,枝上的数字为Bootstrap 1 000次的置信度,结果见图2。4个 $ldh$ 基因在各自的氨基酸序列进化树中,均分别与植物乳杆菌聚类在同一类群,而其他物种的LDH也各自聚为一类,这表明在序列相似性基础上,LDH的氨基酸序列在相同物种中具有较高的保守性,亲缘关系较近,存在着共同的起源或者进化模式;而不同物种之间的LDH序列相似性差异显著,亲缘关系较远,这在一定程度上反映了物种的进化关系。因此,

LDH在乳杆菌属中既有物种之内的保守性,又具有物种之间相对变异性,较真实地反映了不同物种间的自然演化进程,作为分子标记,可为乳杆菌属中各物种之间亲缘关系的远近和分类提供一定的参考。

## 2.2 LDH理化性质与功能结构分析

表2 LDH氨基酸序列分析结果

Table 2 Analysis of amino acid sequences of LDH

理化性质	D1-LDH	D2-LDH	L1-LDH	L2-LDH	L3-LDH
理论分子质量/D	37 181.2	35 548.3	34 187.7	33 115.8	33 182.9
理论等电点	4.88	4.65	4.86	5.32	4.41
不稳定指数	24.60	22.03	34.95	18.75	32.51
脂肪指数	91.36	106.76	95.41	102.56	109.19
平均亲水系数	-0.264	0.068	-0.098	0.063	0.237
功能位点	148~175 195~217 224~240	149~176 225~241	176~182	174~180	无
结构域	2~114 103~301 7~329	1~116 104~301 4~329	4~148 147~316	1~146 145~306	141~301
亚细胞定位	细胞质				
信号肽	无				
跨膜区域	无				

对5个 $ldh$ 基因的氨基酸序列预测结果分别见表2和图3。由表2可知,D1-LDH与L1-LDH亲水性较高,D2-LDH、L2-LDH及L3-LDH疏水性较高,这可能与D2-LDH、L2-LDH及L3-LDH中疏水性氨基酸Ala、Val和Leu所占比例较高有关,此结果与ProtParam在线预测结果相一致,表明预测结果相对准确;依据其不稳定指数均小于40且脂肪指数均较高,推测其为耐热、稳定性蛋白;5个LDH蛋白均位于细胞质,均无信号肽区域及跨膜区域,由此推测5个LDH均为非分泌型、非跨膜蛋白,从而推测LDH在细胞质中合成后不进行蛋白转运,而是保留在细胞基质中,直接与代谢底物作用。



图3 LDH保守功能位点及结构域预测结果

Fig. 3 Prediction of conserved functional sites and domains of LDH



应用BLAST、PROSITE和InterProScan软件分别对LDH的功能位点和结构域进行在线预测,结果显示3种预测结果相一致,表明预测结果相对准确,可信度高。由表2、图3可知,LDH具有各自高度保守的功能位点和结构域。据报道可知在生物体内,LDH都必须在辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 的辅助下,才能催化丙酮酸和乳酸之间的可逆转化,在可逆反应中LDH的每一个亚基可以和一个辅酶分子及一个底物分子相结合,并独立地发生反应;该反应在 $\text{NAD}^+$ 的辅助下,使LDH可逆地催化氧化去质子化乳酸,转化成 $\text{H}^+$ 和去质子化的丙酮酸,与此同时, $\text{NAD}^+$ 与来自底物的 $\text{H}^+$ 相结合生成 $\text{NADH}^{[19]}$ 。对5个LDH的氨基酸序列进行分析可知,其均存在 $\text{NAD}^+$ 结合位点的典型高度保守序列,即GXGXXG。其结合口袋的特点是结合 $\text{NAD}^+$ 的氧化还原酶二核苷酸结合区域内的 $\beta\alpha\beta$ 折叠的第一个 $\beta$ - $\alpha$ 转角处都有GXGXXG高度保守序列,结合机制是 $\text{NAD}^+$ 通过二磷酸搭桥从而结合在此酶的 $\beta$ - $\alpha$ 转角处,即在 $\beta$ - $\alpha$ 的转角处形成二磷酸盐桥;此序列的前2个甘氨酸残基高度保守,确保了转角及螺旋N-端的正电荷与带负电的磷酸基团发生相互作用 $^{[20]}$ 。由此初步推测,植物乳杆菌LY-78中5个LDH可能均具有促进PPA转化为PLA的作用。

依据对LDH的氨基酸序列的预测结果可知,D1-LDH存在3个功能位点,分别位于148~175、195~217、224~240,其氨基酸序列依次为VGVI~~GTGRIGRAA~~IDIFKGF~~GAKVIGYD~~、LYAQA~~DVITLHV~~PA~~LKDNYHMLN~~、MKDGAYILN~~FARGTLID~~;D2-LDH存在2个功能位点,分别位于149~176、225~241,其氨基酸序列依次为VGII~~GAGRIGGTAARL~~FHGLGAKVIA~~YD~~、MKTDAYLINASRG~~PVIV~~;L1-LDH存在一个功能位点,位于176~182,其氨基酸序列为MGEHGDS;L2-LDH存在一个功能位点,位于174~180,其氨基酸序列为LGEHGDS;而L3-LDH未预测到其功能位点。上述两处划线部分的氨基酸序列为典型的GXGXXG序列,推测其为 $\text{NAD}^+$ 的结合位点,其余功能位点与LDH活性直接相关,是LDH与底物结合并发挥催化作用的部位,并且在这些功能位点中均存在高度保守的含组氨酸的序列,而组氨酸是唯一侧链基团 $\text{pK}_a$ 值在7.0左右的氨基酸,通常在生物氧化过程中作为质子供体,因此推测在LDH中这几个组氨酸发挥质子供体的作用,即在植物乳杆菌LY-78代谢合成PLA途径中,组氨酸负责将质子传递给底物PPA,促使其发生还原反应转化生成PLA。由于L3-LDH未预测到功能位点,推测其可能不具有PPA催化活性。

### 2.3 LDH蛋白的二级结构分析

对5个LDH的二级结构进行在线预测,由图4可知,LDH的二级结构中主要以 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主。蛋

白质的功能作用主要取决于其空间结构,其中对骨架起稳定作用的主要是 $\alpha$ -螺旋,可起到跨膜传递的作用 $^{[21]}$ ;而酶的功能部位常常位于无规则卷曲这种构象区域 $^{[22]}$ ,之前所预测的D1-LDH(148~175)及D2-LDH(149~176)的 $\text{NAD}^+$ 的结合位点就位于无规则卷曲构象区域,这表明预测结果相对准确可靠;与此同时,无规则卷曲可使空间结构中的自由能达到最大而促进蛋白质结构稳定 $^{[23]}$ ,故LDH结构中比例较多的无规则卷曲可能使其具有较高的热稳定性,而此结果也与之前ProtParam软件所预测LDH为耐热、稳定性蛋白的结果相一致。

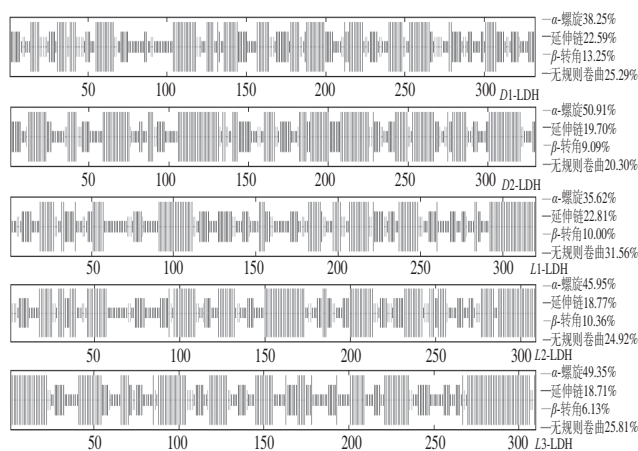
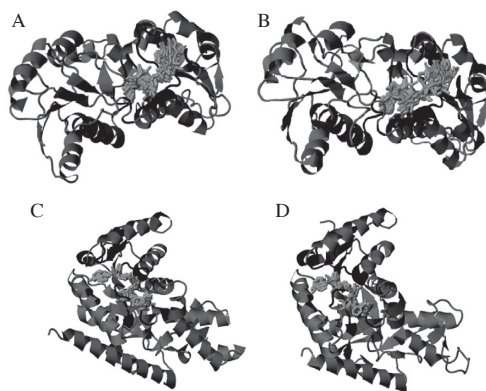


图4 LDH二级结构预测结果

Fig. 4 Prediction of secondary structure of LDH

### 2.4 LDH蛋白的三级结构分析



A. D1-LDH; B. D2-LDH; C. L1-LDH; D. L2-LDH.

图5 LDH三级结构预测结果

Fig. 5 Prediction of tertiary structure of LDH

对5个LDH的三级结构进行在线预测,见图5。依据结果分析可知,LDH与模板的覆盖度均为100%,其中D1-LDH与1J4A的同源性为52%;D2-LDH与4XKJ的同源性为62%;L1-LDH、L2-LDH与1EZ4的同源性分别为99%和54%;而L3-LDH与1EZ4同源性较低,仅为20%,因此未预测出其三级结构,由此更进一步证明了L3-LDH不具备活性。对比空间结构的主要构成元件含量及分

布, 得出二级与三级结构结果相一致, 表明预测模型的可信度很高。由图5可知, D1-LDH和D2-LDH、L1-LDH和L2-LDH, 即D型和L型具有各自相似的三维空间结构, 依据相关报道可知GXGXXG序列中的甘氨酸并不直接参与NAD<sup>+</sup>的结合, 其真正的意义是维持三级结构, 从而促进其他残基与NAD<sup>+</sup>的相互作用, 即典型序列的作用是不改变这些残基的空间位置和环境, 这也充分证明LDH具有高度保守的结构域<sup>[20]</sup>。从图5可知LDH都具有经典的Rossmann折叠, 且图5中蓝色区域为催化位点, 绿色区域为GXGXXG高度保守序列形成的NAD<sup>+</sup>的结合位点, 这为辅酶磷酸基可以更加接近活性中心进行氢键的结合提供了空间, 通过将其结合到辅酶结合域C-末端的 $\beta$ -折叠延伸结构上, 从而实现NAD<sup>+</sup>的氧化或还原, 即这种空间构象在植物乳杆菌LY-78代谢合成PLA途径中, 更有利于PPA发生还原反应转化生成PLA。

### 3 讨论

细菌中LDH一般可分为2种, 一种是以NAD<sup>+</sup>为辅酶的LDH (NAD-dependent LDH, nLDH), 具有D型和L型2种构象; 另一种是含黄素辅酶 (flavin adenine dinucleotide/flavin mononucleotide, FAD/FMN) 和细胞色素C的LDH (NAD-independent LDH, iLDH), 是非NAD<sup>+</sup>依赖型; L型构象nLDH又分2类, 一类为在生理条件下需要1,6-二磷酸果糖 (1,6-fructose diphosphate, FDP) 来激活, 另一类则不需要, 某些细菌nLDH在缺少FDP时几乎没有活性<sup>[24]</sup>。在乳酸菌中, LDH均具有较强的稳定性及高度的专一性, nLDH是糖酵解途径中的关键酶, 主要存在于细胞质中, 但其酶活力大小在不同菌种或菌株中差异显著<sup>[25]</sup>, 推测这可能是多数乳酸菌可以合成PLA但产量不同的主要原因之一。本实验所研究的5个LDH均属于nLDH, 经分析D1-LDH、D2-LDH、L1-LDH及L2-LDH均具有nLDH保守的功能结构域和催化位点, 可能具有催化PPA生成PLA的能力, 因此这4个基因很可能是植物乳杆菌LY-78高产PLA的关键基因。经分析L3-LDH可能不具LDH活性, 一种原因是它缺失NAD<sup>+</sup>结合结构域和催化位点 (图3), 另一种原因可能是由于L3-LDH需要FDP激活。

综上所述, 本研究利用多种软件对植物乳杆菌LY-78菌株全部5个ldh基因进行了多维度的生物信息学分析, 预测了5个LDH的理化性质、结构域、功能位点及空间结构, 推测ldhD1、ldhD2、ldhL1及ldhL2是植物乳杆菌LY-78高产PLA的关键基因, 在PLA合成代谢途径中起到至关重要的作用, 而L3-LDH很可能不具有LDH活性。这些分析结果为下一步ldh基因克隆、表达、改造研究提供了必要的理论分析基础, 并对今后乳酸菌的PLA代谢机制研究具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] MU Wanmeng, YU Shuhuai, ZHU Lanjun, et al. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(5): 1155-1163. DOI:10.1007/s00253-012-4269-8.
- [2] XU Guochao, ZHANG Lingling, 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. DOI:10.1016/j.jbiotec.2015.12.011.
- [3] PREMA P, SMILA D, PALAVESAM A, et al. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(3): 379-386. DOI:10.1007/s11947-008-0127-1.
- [4] 李兴峰. 乳杆菌生物合成苯乳酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 1-117.
- [5] 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. DOI:10.1111/lam.12293.
- [6] CORTÉS-ZAVALETA O, LÓPEZ-MALO A, HEMÁNDEZ-MENDOZA A, et al. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 173: 30-35. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016.
- [7] ZHENG Zhaojuan, MA Cuiqing, GAO Chao, et al. Efficient conversion of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by using whole cells of *Bacillus coagulans* SDM[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): e19030. DOI:10.1371/journal.pone.0019030.
- [8] LI Xingfeng, NING Yawei, LIU Dou, et al. Metabolic mechanism of phenyllactic acid naturally occurring in Chinese pickles[J]. Food Chemistry, 2015, 286: 265-270. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.01.145.
- [9] 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. DOI:10.1023/A:1016300808378.
- [10] 李士龙. 传统发酵食品中高产苯乳酸菌株的筛选及发酵工艺条件优化[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2012: 1-51.
- [11] 胡发根. 重组大肠杆菌全细胞转化合成D-苯基乳酸的基础研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015: 1-64.
- [12] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729. DOI:10.1093/molbev/mst197.
- [13] PETERSEN T N, BRUNAK S, HEIJNE G V, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786. DOI:10.1038/nmeth.1701.
- [14] JONES P, BINNS D, CHANG Y H, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1-5. DOI:10.1093/bioinformatics/btu031.
- [15] COMBET C, BLANCHET C, GEURJON C, et al. NPS@: network protein sequence analysis TIBS[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(3): 147-150. DOI:10.1016/S0968-0004(99)01540-6.
- [16] KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. Nature Protocols, 2015, 10(6): 845-858. DOI:10.1038/nprot.2015.053.
- [17] WASS M N, KELLEY L A, STEMBERG M J. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(2): W469-W473. DOI:10.1093/nar/gkq406.
- [18] HENAO J D, RINCÓN M S, FILGUEIRA D J J. "Head to Tail" tool analysis through clustalw alignment algorithms and construction of distance method neighbor-joining trees based on genus fusarium genomic distances[J]. Advances in Computational Biology, 2014, 232: 97-102. DOI:10.1007/978-3-319-01568-2\_14.
- [19] LAIDLER K J, BUNTING P S. The chemical kinetics of enzyme action[M]. London: Oxford University Press, 1973: 342.
- [20] 崔东冰. 计算机辅助的酶与烟酰胺辅酶结合规律以及酶对烟酰胺辅酶特异性利用改造的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014: 1-103.
- [21] PEREA M, LUGTENBURG I, MAYOL E, et al. TAlphaDB and TMbetaDB: web servers to study the structural role of sequence motifs in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -barrel domains of membrane proteins[J]. BMC Bioinformatics, 2015, 16: 266. DOI:10.1186/s12859-015-0699-5.
- [22] 周兴文, 李纪元, 范正棋. 金茶花查尔酮异构酶基因全长克隆与表达的初步研究[J]. 林业科学研究, 2012, 25(1): 93-99.
- [23] 何宣, 王白羽, 张晓磊, 等. 小黑麦碳酸酐酶蛋白质三维结构预测[J]. 生物技术通报, 2012(2): 151-158.
- [24] ZHAO Rui, ZHENG Sui, DUAN Cuicui, et al. NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis*[J]. FEBS Open Bio, 2013, 3: 379-386. DOI:10.1016/j.fob.2013.08.005.
- [25] DOELLE H W. NAD-dependent and NAD-independent lactate dehydrogenase in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria[J]. Bacteriology, 1977, 108(6): 1284-1289.