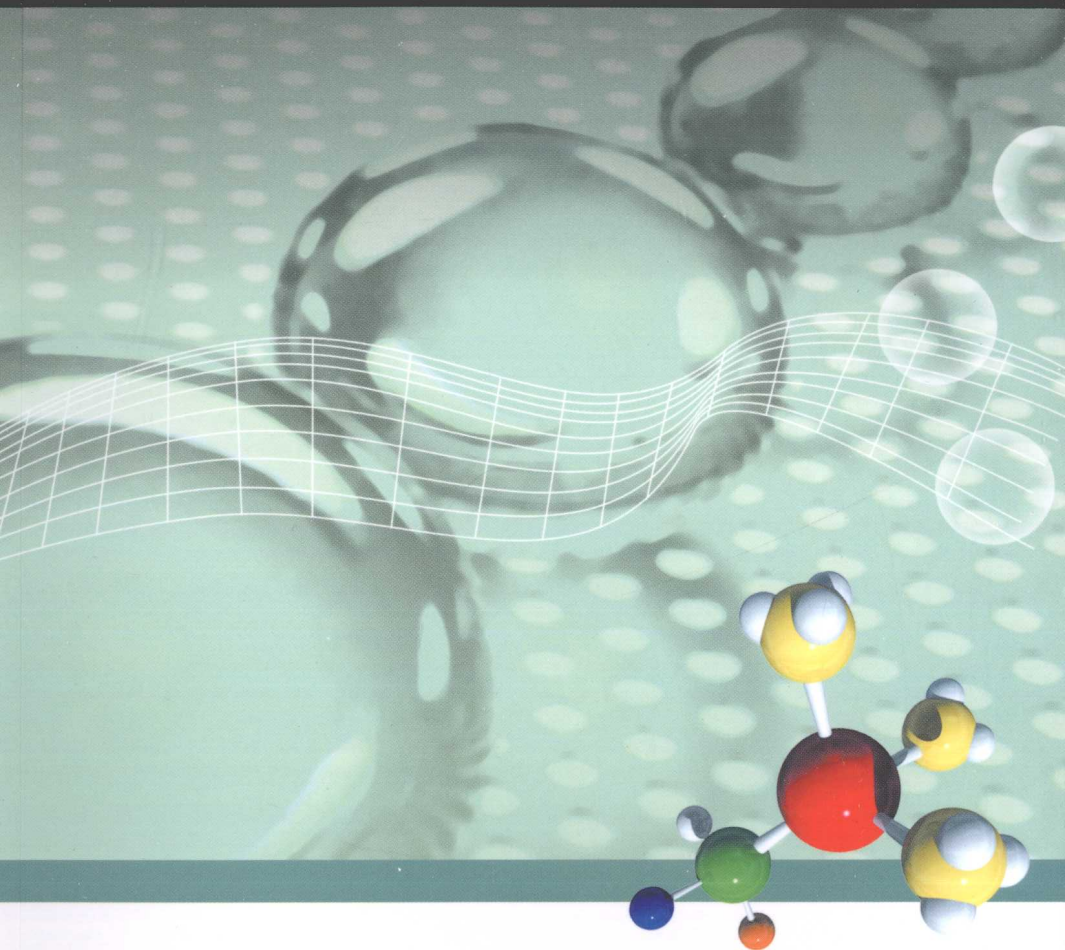
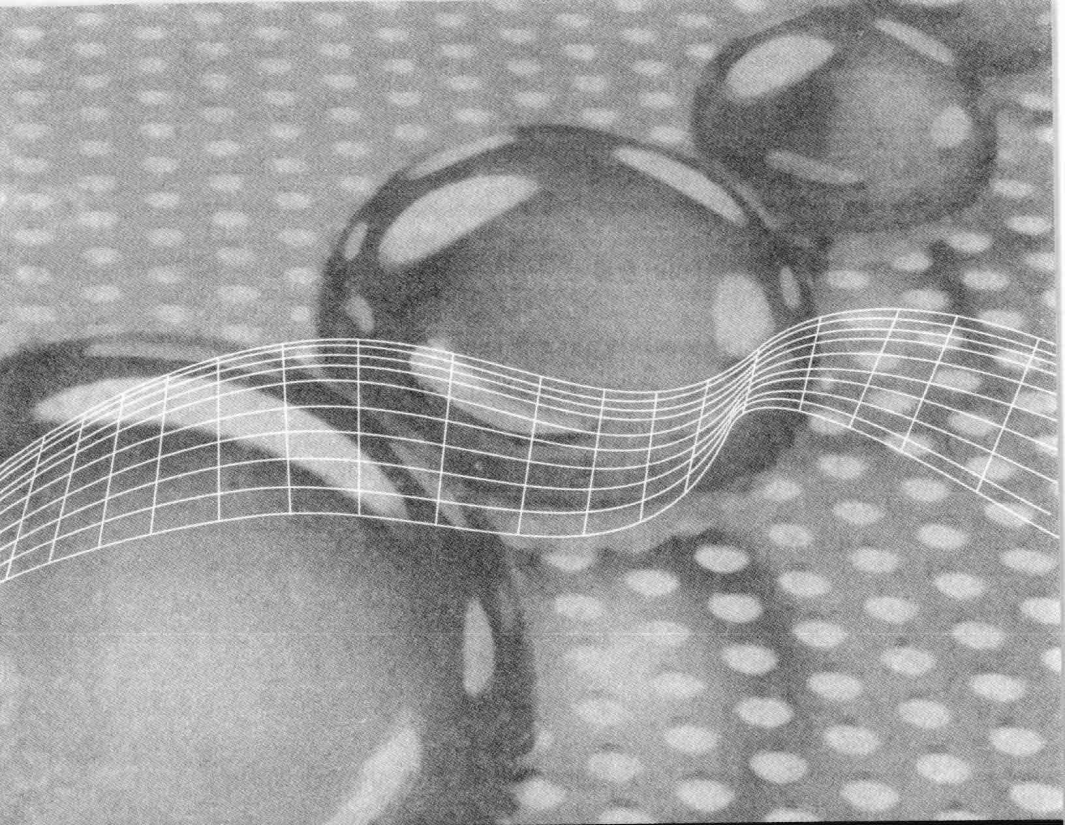




# 高产 $L-(+)$ -乳酸 植物乳杆菌工程菌的 构建与应用

赵 辉◎著

 黑龙江大学出版社



# 高产L-(+)-乳酸 植物乳杆菌工程菌的 构建与应用

赵 辉◎著

 江苏大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

高产 L-(+)-乳酸植物乳杆菌工程菌的构建与应用 /  
赵辉著. -- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2009. 12

ISBN 978-7-81129-237-4

I. ①高… II. ①赵… III. ①乳酸-乳杆菌科 IV.  
①Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 239398 号

书 名 高产 L-(+)-乳酸植物乳杆菌工程菌的构建与应用  
著作责任者 赵辉  
出 版 人 李小娟  
责 任 编 辑 惠秀梅 赵丽华  
出 版 发 行 黑龙江大学出版社(哈尔滨市学府路 74 号 150080)  
网 址 <http://www.hljupress.com>  
电 子 信 箱 [hljupress@163.com](mailto:hljupress@163.com)  
电 话 (0451)86608666  
经 销 新华书店  
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司  
开 本 880 × 1230 1/32  
印 张 5.875  
字 数 130 千  
版 次 2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 次印刷  
书 号 ISBN 978-7-81129-237-4  
定 价 22.00 元

---

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

# 前 言

由于人体只含有  $L$ -乳酸脱氢酶,不含  $D$ -乳酸脱氢酶,因此  $D-( - )$ -乳酸是对于哺乳动物没有生理作用,不能进入代谢途径,而是在血液中积累。食用过多的  $D-( - )$ -乳酸或外科手术后体内过多积累  $D-( - )$ -乳酸,会导致  $D-( - )$ -乳酸盐酸毒症。在现代众多乳酸发酵食品中,所含乳酸多为  $DL$  混型,如能增加产品中  $L-( + )$ -乳酸的产生比例,则具有重要的意义。

增加乳酸菌产  $L-( + )$ -乳酸的比例,一直是乳酸发酵生产和乳酸发酵食品中的重大课题。国内多以诱变和发酵的方法对乳酸菌进行改造,而无论是紫外诱变还是化学诱变,突变的性质和方向不定,都不能实现定向改变菌种的目的。植物乳杆菌在青贮饲料发酵、乳酸香肠发酵、酱和酱油发酵、发酵面团、发酵蔬菜、啤酒生物酸化等发酵食品和乳酸发酵工业中都起着重要的作用,但其产生  $L$ -乳酸的比例只有 50% 左右。本研究的目的是用基因敲除的方法使植物乳杆菌的  $D$ -乳酸脱氢酶基因失活,只表达  $L$ -乳酸脱氢酶基因,从而产生高比例  $L-( + )$ -乳酸,应用于蔬菜发酵。

本书是在我的博士论文的基础上加工整理而成的。在本课

题研究过程中从2003年发酵生产的保存良好、风味正常的酸白菜中,进行乳酸菌分离和鉴定;以鉴定后的 *Lactobacillus plantarum* 为出发菌株,经没有正选择标记的基因敲除方法,使植物乳杆菌的 *D*-乳酸脱氢酶基因失活,建立了工程菌;工程菌的 *L*-乳酸脱氢酶活力占总乳酸脱氢酶活力的比例提高92.5%,*L*-乳酸的比例提高到75.7%;对工程菌的培养基进行优化,在15 L发酵罐中进行中试发酵,72 h最高产酸量  $31.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,产酸率比优化前提高了40.1%;将工程菌应用于发酵黄瓜,使 *L*-乳酸的比例提高了14.8%。将该植物乳杆菌工程菌应用于相关乳酸发酵食品和发酵法生产 *L*-乳酸,具有广阔的开发前景。

感谢导师霍贵成教授的悉心指导。从研究选题确定、方案的设计到本书的撰写都是在导师的指导下完成的。导师的治学态度和工作热情将使我终身受益。感谢黑龙江大学生命科学学院院长平文祥教授给予的关心和支持。

由于作者的能力和有限,不成熟和错误之处在所难免,请读者和同行专家批评指正。

赵 群

2009年12月

# 目 录

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 1 绪论 .....                                                 | 1  |
| 1.1 乳酸的理化性质 .....                                          | 1  |
| 1.2 $L-(+)$ -乳酸及其应用 .....                                  | 3  |
| 1.3 $L$ -乳酸生产的研究 .....                                     | 10 |
| 1.4 发酵法生产 $L$ -乳酸的研究 .....                                 | 16 |
| 1.5 植物乳杆菌的作用与应用 .....                                      | 30 |
| 2 乳酸菌的分离和初步鉴定 .....                                        | 41 |
| 2.1 乳酸菌的分离纯化 .....                                         | 41 |
| 2.2 形态学鉴定 .....                                            | 41 |
| 2.3 乳酸菌的生化鉴定 .....                                         | 43 |
| 2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i> HF1 生长产酸特性<br>的研究 ..... | 49 |
| 3 产高比例 $L-(+)$ -乳酸植物乳杆菌工程菌的构建 .....                        | 59 |
| 3.1 乳酸脱氢酶的催化反应机理 .....                                     | 59 |
| 3.2 乳酸脱氢酶分子生物学研究 .....                                     | 61 |
| 3.3 基因敲除的原理和在微生物育种上的应用 .....                               | 66 |
| 3.4 $L-(+)$ -乳酸高产植物乳杆菌工程菌<br>的构建 .....                     | 74 |

|     |                                  |     |
|-----|----------------------------------|-----|
| 3.5 | 工程菌表达特性的研究                       | 91  |
| 4   | 工程菌产乳酸发酵条件的优化                    | 95  |
| 4.1 | <i>L. plantarum</i> HF1.1 培养基的优化 | 95  |
| 4.2 | 发酵条件的优化                          | 106 |
| 4.3 | 分批中试发酵的研究                        | 110 |
| 4.4 | 补料发酵的研究                          | 111 |
| 5   | 工程菌用于发酵黄瓜的研究                     | 114 |
| 5.1 | HF3 和 HF5 生长曲线的研究                | 114 |
| 5.2 | HF3 和 HF5 最适生长温度的研究              | 115 |
| 5.3 | 菌种耐盐试验                           | 116 |
| 5.4 | 混合菌种发酵试验                         | 117 |
| 5.5 | 工程菌与野生菌对比试验                      | 119 |
| 5.6 | 黄瓜中试发酵试验                         | 121 |
| 6   | 工程菌构建与应用的探讨                      | 126 |
| 6.1 | 发酵蔬菜中乳酸菌的分离和鉴定                   | 126 |
| 6.2 | 植物乳杆菌 HF1 和 HF1.1 乳酸脱氢酶的测定       | 127 |
| 6.3 | 植物乳杆菌 HF1 和 HF1.1 乳酸旋光性的测定方法     | 128 |
| 6.4 | 基因敲除法建立植物乳杆菌工程菌的可行性探讨            | 128 |
| 6.5 | 敲除载体的构建                          | 129 |
| 6.6 | 转化子的筛选和鉴定                        | 130 |
| 6.7 | 工程菌表达的特点                         | 131 |
| 6.8 | 工程菌发酵条件的优化                       | 131 |

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 6.9 多菌株联合发酵生产乳酸黄瓜 ..... | 134 |
| 参考文献 .....              | 137 |
| 附录 .....                | 164 |
| 附录 I 培养基 .....          | 164 |
| 附录 II 试验菌株 .....        | 169 |
| 附录 III 仪器、设备和试剂 .....   | 170 |
| 附录 IV 试剂配制 .....        | 172 |

# 1 绪 论

乳酸(Lactic acid),又名2-羟基丙酸(2-hydroxy propionic acid)或 $\alpha$ -羟基丙酸,广泛存在于植物、动物和微生物中。乳酸分子具有旋光性,按其旋光性可分为D型(左旋)、L型(右旋)和D,L混型三种。但由于人体内只含有L-乳酸脱氢酶,仅能代谢L-乳酸,因此富含L-乳酸的发酵食品对于保持人体的健康具有重要的意义。

植物乳杆菌在青贮饲料发酵、乳酸香肠发酵、酱和酱油发酵、面团发酵、蔬菜发酵、啤酒发酵等饲料、食品发酵和乳酸发酵工业中起着重要的作用。植物乳杆菌发酵属兼性异性乳酸菌发酵,即以葡萄糖为碳源进行发酵时,可产生85%以上的乳酸但不产气,产生D,L-乳酸的比例约为50%。因此,如果能够构建可以产生大量L-乳酸的植物乳杆菌工程菌,并将其应用于相应的乳酸发酵食品和发酵法中进行乳酸生产,则可以提高L-乳酸的产生比例,这对L-乳酸的生产具有十分重要的意义。

## 1.1 乳酸的理化性质

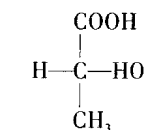
乳酸的相对分子质量为90.08,分子式为 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ,

无水乳酸纯品为白色晶体,液体乳酸纯品无色,工业品为无色到浅黄色液体。在气压为 67~133 Pa 的真空条件下反复蒸馏可以得到高纯度的乳酸,进而可以得到乳酸晶体。乳酸纯品无味,具有吸湿性,相对密度为 1.206 0(25/4 ℃),熔点为 18 ℃,沸点为 122 ℃(2 kPa 条件下),折射率( $n_D$ )为 1.439 2(20 ℃)。乳酸分子含有一个不对称的碳原子,具有旋光性,按其旋光性可分为三种: $D$  型(左旋)、 $L$  型(右旋)和  $D, L$  混型。右旋乳酸即  $L-(+)$ -乳酸水溶液的旋光率( $[\alpha]_D^{20}$ )为  $+3.3^\circ$ ,左旋乳酸即  $D-(-)$ -乳酸水溶液的旋光率是  $-3.3^\circ$ 。除这两种乳酸除旋光性不同外(旋光方向相反,比旋光度的绝对值相同),其他物理、化学性质相同<sup>[1-8]</sup>。乳酸可以参与氧化、还原、酯化、缩合等多种反应, $L-(+)$ -乳酸可充分脱水缩聚成聚  $L$ -乳酸。

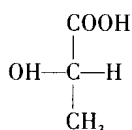
乳酸异构体的物理性质见表 1-1,乳酸分子结构式见图 1-1。

表 1-1 乳酸异构体的物理性质

| 构型   | 熔点/℃      | 比旋光度<br>( $[\alpha]_D^{20}$ ) | 解离常数<br>(25 ℃)        | 熔化热/ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
|------|-----------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
| $L$  | 52.8~54.0 | 3.3                           | $1.37 \times 10^{-4}$ | 16.87                                  |
| $D$  | 52.8~54.0 | -3.3                          | $1.37 \times 10^{-4}$ | 16.87                                  |
| $DL$ | 16.8~33.0 | 0.0                           | $1.37 \times 10^{-4}$ | 11.35                                  |



$L-(+)$ -乳酸



$D-(-)$ -乳酸

图 1-1 乳酸分子结构式

## 1.2 $L-(+)$ -乳酸及其应用

### 1.2.1 $L$ -乳酸

由于人体只含有  $L$ -乳酸脱氢酶,而不含  $D$ -乳酸脱氢酶,因此  $D-(-)$ -乳酸对于人体没有生理作用,不能进入代谢途径,进入人体后只能在血液中不断积累<sup>[9~10]</sup>。食用过多的  $D$ -乳酸或在外科手术 after 体内过多地积累  $D$ -乳酸,会导致  $D$ -乳酸盐毒症<sup>[10~12]</sup>。1974 年联合国粮农组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)食品添加剂联合专家委员会得到的毒理学证据表明:婴儿在出生后三个月内几乎不能利用  $DL$ -乳酸或  $D$ -乳酸,因而这两种乳酸不应出现在婴儿食品中;成人 1 kg 体重摄入  $D$ -乳酸的量不应超过 100 mg。

$L$ -乳酸及其盐类、衍生物在医疗、农业等许多行业也有广泛的用途,如  $L$ -乳酸钙、 $L$ -乳酸铁可作为补充微量元素的药品。在现代众多乳酸发酵食品中,所含乳酸多为  $DL$  混型,增加产品中  $L$ -乳酸的产生比例具有重要的意义。

酸奶是嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种在温度为 40~45 ℃、pH 值为 4.2~4.3 的条件下,对牛奶进行发酵的产物。这两种乳酸菌均属同型发酵,德氏乳杆菌保加利亚亚种产乳酸量为 2.0%~2.5%,以  $D$ -乳酸为主;嗜热链球菌产乳酸量为 0.6%~0.8%,主要是  $L$ -乳酸<sup>[13~14]</sup>。在发酵过程中,德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌的添加比例为 1:1 时被认为是形成优良酸奶风味和质地的最佳组合,之后应在 42 ℃ 的最适温度

和 2.0% 的接种量条件下进行发酵,成品酸奶通常含有 45%~60% 的  $L$ -乳酸<sup>[17]</sup>。在高质量的成品酸奶中, $L$ -乳酸与  $D$ -乳酸的比例不应低于 3:4<sup>[18]</sup>。Torriani<sup>[19]</sup>的研究结果表明,嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌之间的比例为 1.5:1.0 时,更有助于促进这两种细菌维持良好的共生关系,所生产的酸奶品质也是最优异的,而且  $L$ -乳酸的比例还会增加,更有益于人体对乳酸的吸收。食品中常见的乳酸菌所产乳酸的旋光性见表 1-2<sup>[20]</sup>。

表 1-2 食品中常见乳酸菌所产乳酸的旋光性

| 乳酸旋光性       | 菌 种                                                                                                                                                                                                    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $L-(+)$ -乳酸 | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis diacetylactis</i> ,<br><i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i>                    |
| $D,L$ -乳酸   | <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i>                                                                                                                                     |
| $D-(+)$ -乳酸 | <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leu. lactis</i> , <i>Lactobacillus</i><br><i>delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus delbruckii</i> sub-<br>sp. <i>lactis</i> |

注:产  $L$ -乳酸或  $D$ -乳酸的菌种指产生的乳酸中  $L$ -乳酸或  $D$ -乳酸占 90% 以上的菌种;产  $DL$ -乳酸的菌种指产  $L$ -乳酸或  $D$ -乳酸占 20%~75% 的菌种。

## 1.2.2 $L$ -乳酸的应用

### 1.2.2.1 食品工业

由于  $L$ -乳酸对人体无毒副作用、易吸收,可直接参与体内代谢,不掩盖食品的天然风味,因此被广泛地用做防腐剂、酸味剂和还原剂。

在罐头、酱菜、酱类、酱油和饮料等的生产中,添加  $L$ -乳酸可以替代对人体健康有毒害作用的苯甲酸钠、山梨酸钾等防腐

剂,同时又可作为这些食品柔和的酸味剂;在啤酒生产过程中,用 *L*-乳酸代替磷酸来调节麦芽汁的 pH 值,不仅有利于促进糖化,而且少量的乳酸也可以抑制杂菌的生长;乳酸乙酯是调配新香型白酒不可缺少的香料;0.3%~0.5% 的硬酯酰乳酸钙可以使面包的体积增加 30%~40%,同时可以防止面包老化<sup>[5,21-25]</sup>。通过活性乳酸菌发酵生产的富含乳酸的发酵酸奶、发酵蔬菜、发酵谷物等更是不可替代的现代食品。

### 1.2.2.2 医药工业

在医药工业中,乳酸可以直接用做消毒剂,如内服肠用消毒剂和含漱、涂布用清洗剂;乳酸钠可以配制成输液用的溶液,用于治疗酸中毒、高钾血症,解除因腹泻所致的脱水、由糖尿病和胃炎引起的中毒;乳酸钙有补充钙质、固齿和助长骨骼发育的作用;乳酸酯类物质主要用做溶剂,用于溶解药物,可增加人体对药物的吸收量,降低副作用,还可以制成片剂的润滑剂;*L*-乳酸亚铁、*L*-乳酸锌都是补充金属元素的良好药品或保健品。由聚 *L*-乳酸制成的缓释胶囊制剂、可生物降解手术缝合线、生物植入片等在临床上有广泛应用。聚 *L*-乳酸具有良好的生物相容性和可降解性,但材料缺乏骨结合能力,对 X 射线具有穿透性,不利于临床上显影观察。将聚 *L*-乳酸与羟基磷灰石(HA)颗粒复合有助于提高材料的初始硬度和刚性,延缓材料的早期降解速度,便于骨折的早期愈合。随着聚乳酸的降解吸收,HA 在体内逐渐转化为自然骨组织,从而提高材料的骨结合能力和材料的生物相容性,此外还可以提高材料对 X 射线的阻拒作用,便于临床显影观察<sup>[26-30]</sup>。

1.2.2.3 化学工业

在化学工业中,*L*-乳酸是生物可降解塑料聚乳酸的原料,聚乳酸很有可能代替聚氯乙烯(PVC)和聚丙烯(PP)等不可降解的塑料,以消除由“白色污染”所造成的环境危机。同时,聚乳酸具有良好的机械性能、透明性、透气性而被广泛地应用于农业、制造业等领域。乳酸可用做烟草的保湿剂和皮革的柔顺剂;可配制清洁用品、护肤品和沐浴露,对皮肤有一定的保健效果,可以明显改善皮肤结构,乳酸钠可用做皮肤的增白剂和用于治疗皮肤干燥症;乳酸酯具有溶解性好、增塑性、无毒、易回收等特点,是可降解的环保型有机溶剂,可用做香料、合成树脂涂料、胶黏剂、印刷油墨、人造珍珠的高级溶剂和用于石油管道的清洗;乳酸酮可用于电镀工业,乳酸胺可用做饲料添加剂<sup>[31-35]</sup>。

表 1-3 *L*-乳酸的应用

| 应用领域 | 用 途                                                                                                                                    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 食品工业 | 用做饮料酸味剂、食品防腐剂;用于果蔬和肉类的保藏;制作乳酸发酵食品;在啤酒糖化过程中调节 pH 值                                                                                      |
| 医药工业 | 用做医院、车间等场所的消毒剂; <i>L</i> -乳酸钠可用于治疗酸中毒及高钾血症; <i>L</i> -乳酸钙、 <i>L</i> -乳酸亚铁和 <i>L</i> -乳酸锌可用于人体补充金属元素;聚 <i>L</i> -乳酸可制成缓释胶囊、生物降解纤维、生物植入片 |
| 化学工业 | 制成可降解塑料;作为皮革柔顺剂                                                                                                                        |
| 其他工业 | 用做烟草保湿剂、纤维光泽剂;制成化妆品                                                                                                                    |

### 1.2.3 乳酸的生成途径

乳酸菌将葡萄糖或有机物降解生成丙酮酸,丙酮酸接受 3-磷酸甘油醛脱氢酶形成的 NADH 上的氢,在乳酸脱氢酶的催化下形成乳酸。根据利用的底物和生成产物的不同,乳酸菌生成乳酸的代谢途径可分为:同型乳酸菌的果糖和葡萄糖发酵;异型乳酸菌的果糖和葡萄糖发酵;乳酸菌的戊糖发酵;双歧杆菌的乳酸发酵;乳酸菌的柠檬酸和苹果酸发酵。葡萄糖和果糖的同型乳酸菌发酵直接生成 3-磷酸甘油醛,再由 3-磷酸甘油醛形成丙酮酸。其他类型的乳酸发酵一般先形成 5-磷酸木酮糖,再由 5-磷酸木酮糖形成 3-磷酸甘油醛,进而形成丙酮酸。

丙酮酸除可在乳酸脱氢酶的作用下生成乳酸外,还会在丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的作用下生成乙醇,或经丙酮酸脱氢酶系进入 TCA 循环产生能量和中间代谢产物。因此高产乳酸的菌株应具有较高的乳酸脱氢酶活性和弱化的丙酮酸脱氢酶活性及丙酮酸脱羧酶活性,而且不以乳酸为唯一碳源。丙酮酸在相应的 *L*-乳酸脱氢酶或 *D*-乳酸脱氢酶的作用下,分别生成 *L*-乳酸和 *D*-乳酸<sup>[20,36-39]</sup>。

#### 1.2.3.1 同型乳酸菌的葡萄糖和果糖发酵

同型乳酸菌葡萄糖和果糖发酵的过程如图 1-2 所示。反应式如下:



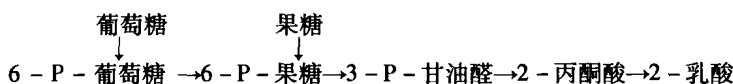


图 1-2 同型乳酸菌的果糖和葡萄糖发酵

### 1.2.3.2 异型乳酸菌的葡萄糖和果糖发酵

异型乳酸菌葡萄糖和果糖发酵的过程如图 1-3 所示。反应式如下：

#### ①葡萄糖



#### ②果糖

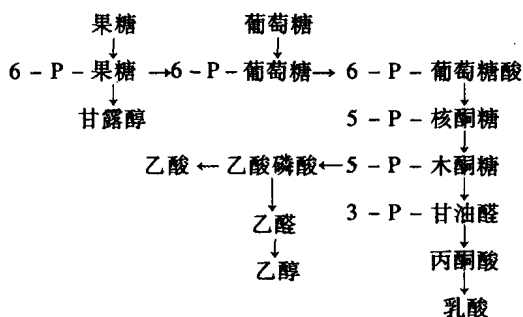
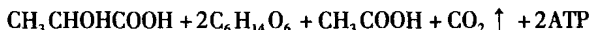
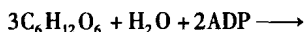


图 1-3 异型乳酸菌的果糖和葡萄糖发酵

### 1.2.3.3 乳酸菌的戊糖发酵

乳酸菌的戊糖发酵途径如图 1-4 所示。反应式如下：



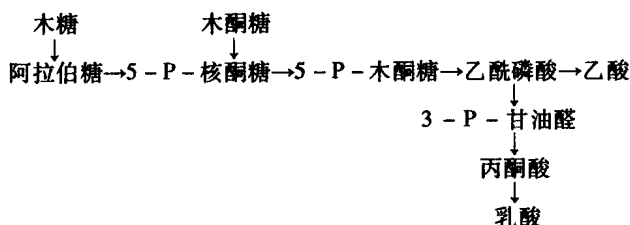


图 1-4 乳酸菌的戊糖发酵

#### 1.2.3.4 双歧杆菌的乳酸发酵

双歧杆菌的乳酸发酵途径如图 1-5 所示。反应式如下:

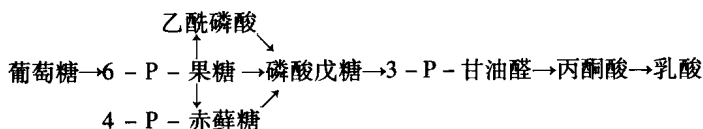
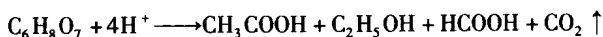
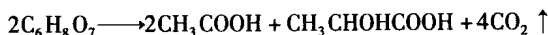
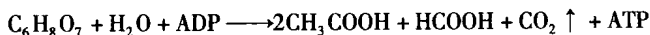


图 1-5 双歧杆菌的乳酸发酵

### 1.2.3.5 乳酸菌的柠檬酸和苹果酸发酵

乳酸菌的柠檬酸和苹果酸发酵途径如图 1-6 所示。反应式如下:

### ①柠檬酸发酵:



### ②苹果酸发酵:

