

# 重组大肠杆菌 全细胞合成苯基乳酸的研究

胡发根<sup>1,2</sup>, 沈丽<sup>2</sup>, 吉华兰<sup>2</sup>, 罗林<sup>2</sup>, 王立梅<sup>2</sup>, 齐斌<sup>2</sup>, 朱益波<sup>2,\*</sup>

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215000;

2. 常熟理工学院苏州市食品生物技术重点实验室 发酵工程技术研究中心, 江苏常熟 215500)

**摘要:**在 *E. coli* BL21 (DE3) 中过量表达 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*), 并优化该重组菌全细胞转化苯丙酮酸钠合成苯基乳酸的条件。通过单因素实验和正交实验优化诱导表达条件, 并在此基础上对全细胞转化苯丙酮酸钠合成苯基乳酸进行了优化。结果表明, 菌体 OD<sub>600</sub> 为 1.2 时添加 IPTG 至终浓度 0.2mmol/L, 25℃ 诱导 4h 后收集菌体具有最佳转化活性; 最优分批转化条件: pH7.0, 8.0g/L 苯丙酮酸钠, 20g/L 葡萄糖, 1% (v/v) 吐温-80, 菌体浓度 20g/L (干重), 37℃, 转速 200r/min 转化 0.5h, 苯基乳酸产量和转化率分别达到 4.91g/L, 56%。在上述优化条件下通过流加苯丙酮酸钠和葡萄糖, 经 6h 转化, 苯基乳酸最终产量达到 17.23g/L, 转化率为 54%。研究结果表明该重组大肠杆菌成功转化苯丙酮酸合成苯基乳酸, 具有较好的应用前景, 为系统化代谢工程改造大肠杆菌生物合成苯基乳酸的进一步研究和应用提供了有用的技术参数。

**关键词:** 大肠杆菌, D-乳酸脱氢酶, 苯基乳酸, 全细胞生物转化

## Production of phenyllactic acid by using whole-cell recombinant *Escherichia coli*

HU Fa-gen<sup>1,2</sup>, SHEN Li<sup>2</sup>, JI Hua-lan<sup>2</sup>, LUO Lin<sup>2</sup>, WANG Li-mei<sup>2</sup>, QI Bin<sup>2</sup>, ZHU Yi-bo<sup>2,\*</sup>

(1. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215000, China;

2. Research Center of Fermentation Engineering, Key Laboratory of Food and Biotechnology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

**Abstract:** D-lactate dehydrogenase was expressed in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3), the expression conditions and bioconversion medium were optimized for the production of PLA with whole-cell transformation. Single factor experiments and orthogonal experiments were used to optimize induction conditions and the transformation conditions with the engineered whole-cells transformation. The optimized induction condition for D-*ldh* expression was IPTG 0.2mmol/L and inducing for 4h at 25℃ and OD<sub>600</sub> 1.2, the optimized batch reaction conditions in phosphate buffer (pH7.0) were: 8g/L PPA, 20g/L glucose, 20g/L (dry cell weight), 1% Tween-80, 37℃, 200r/min for 0.5h with PLA production of 4.91g/L and conversion ratio of 56%. Based on the above optimized conditions, fed-batch fermentation was conducted by intermittent feed PPA and glucose. After 6h transformation, the final PLA concentration reached 17.23g/L with the conversion ratio of 54%. Results showed that PPA was efficiently transformed into PLA through engineered *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-D-*ldh*. This study not only showed a good industrial application prospect, but also laid a foundation for metabolic engineering of *E. coli* for the production of PLA.

**Key words:** *Escherichia coli*; D-lactate dehydrogenase; phenyllactic acid; whole-cell bioconversion

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)09-0147-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.09.024

苯基乳酸(phenyllactic acid, PLA), 也称 3-苯基乳酸或 2-羟基-3-苯基丙酸, 是一种广泛存在于乳

收稿日期: 2014-07-28

作者简介: 胡发根(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。

\* 通讯作者: 朱益波(1980-), 男, 博士, 副教授, 主要研究微生物转化和相关微生物改造。

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目(2013GB2C100176); 江苏省自然科学基金项目(BK20130380); 江苏省高校自然科学基金项目(13KJB550002); 江苏省“六大高峰人才”资助计划项目(NY-021); 苏州市科技支撑计划(SNG201354); 常熟市科技发展计划(CN201220)。

酸菌发酵产品和蜂蜜中的有机酸<sup>[1-3]</sup>。大量研究表明苯基乳酸可以有效抑制包括食源性致病细菌,如 *Listeria monocytogenes*、*Enterococcus faecalis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Providencia stuartii*、*Klebsiella oxytoca*, 酵母和霉菌,如 *Aspergillus ochraceus*、*Penicillium roqueforti*、*Penicillium citrinu* 等多种微生物的生长<sup>[4-7]</sup>。此外,苯基乳酸在饲料添加剂<sup>[8-9]</sup>、医药<sup>[10]</sup>、化妆品等多方面都具有广泛的应用前景。这种由乳酸菌代谢产生的芳香族有机酸不仅对人和动物细胞均无毒性,还具有抑菌谱广,水溶性和热稳定性好,作用 pH 范围宽等特点,有望作为理想的食品防腐剂而获得研究人员的广泛关注<sup>[11]</sup>。

目前为止,用于苯基乳酸转化的微生物主要有真菌(*Geotrichum candidum*)<sup>[12]</sup>,乳酸菌(*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*), 丙酸菌(*Propionibacterium jensenii* DSMZ 20535, *P. thoenii* DSMZ 20276)<sup>[13]</sup>等,其中来自 *L.plantarum* SK002<sup>[14]</sup>, *Bacillus coagulans* SDM<sup>[15]</sup> 的 L-乳酸脱氢酶和来自 *P. acidilactici* DSM 20284, *L. plantarum* SK002<sup>[14]</sup>, *Lactobacillus confusus*<sup>[16]</sup>, *B.coagulans* SDM<sup>[15]</sup> 的 D-乳酸脱氢酶,具有催化苯丙酮酸合成苯基乳酸的能力。但由于乳酸脱氢酶在微生物体内的表达受到严格调控而致使胞内乳酸脱氢酶含量较低,限制了苯基乳酸产量的提高。因此,利用基因工程技术获得高效表达乳酸脱氢酶的工程菌可能是提高苯基乳酸产量的有效途径。

本研究将来自 *L.plantarum* 的 D-*ldh* 克隆到大肠杆菌中过表达,以苯丙酮酸钠为底物,全细胞转化合成苯基乳酸。通过对基因表达条件和转化条件的优化,全细胞合成苯基乳酸,并取得较好结果,为系统化代谢工程改造大肠杆菌生物合成苯基乳酸的进一步研究和应用奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 主要试剂 D-3-苯基乳酸和苯丙酮酸标品 购自国药集团;酵母提取物,胰蛋白酶 购自 Oxoid 公司(英国);DNA 聚合酶,硫酸卡那霉素,氨苄青霉素和相关分子试剂盒 购自上海生工;限制性内切酶 购自大连宝生物公司(TaKaRa),所有实验试剂若无特殊说明均为分析纯。

1.1.2 菌种和质粒 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*(CGMCC:1.2437) 购自中国菌种保藏中心(CGMCC);pMD19-T Simple Vector 购自宝生物公司(大连);*E.coli* DH5 $\alpha$ , *E.coli* JM109, *E.coli* BL21 (DE3), pET-28a(+) 均为实验室保藏。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪、水平电泳系统、垂直电泳系统、凝胶成像系统 美国 Bio-RAD 公司;高速台式离心机 德国 Thermo 公司;恒温金属浴 德国 Eppendorf 公司;高效液相色谱仪 日本岛津公司;恒温振荡培养箱 太仓市华美生化仪器厂。

### 1.2 重组菌株的构建与诱导条件优化

1.2.1 重组大肠杆菌的构建表达和功能验证 以植物乳杆菌基因组为模板,上游引物(P1: 5' -

CGCGGATCCATGAAAATTATTGCATATGC-3') 引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引物(P2: 5' - CCAAGC TTTTAATCAAACCTTAACCTTGTC-3') 引入 *Hind* III 酶切位点,PCR 扩增得到长度为 996bp 的 DNA 片段,连接入克隆质粒 pMD19-T Simple Vector 并转化感受态 *E.coli* JM109,筛选阳性克隆,经测序验证后由 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,连接经相同酶切处理的线性表达质粒 pET-28a(+),得到重组质粒命名为 pET28a-D-*ldh*,将该重组质粒转化感受态 *E.coli* BL21 (DE3),重组子经菌落 PCR 验证后命名为 *E.coli* BL21 (DE3)/pET28a-D-*ldh*。

将活化的重组菌 *E.coli* BL21 (DE3)/pET28a-D-*ldh* 和空载体对照 *E.coli* BL21 (DE3)/pET28a(+) 按 1% 的接种量接种到装有 100mL LB 液体培养基(含 50mg/L 卡那霉素)的摇瓶中,37℃、200r/min 恒温振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,加入 1.0mmol/L 诱导剂 25℃ 诱导培养 4h 后,4℃、6000r/min 离心 10min,收集菌体用 pH7.0 磷酸钾缓冲液洗涤 2 次,重悬于 10mL 转化培养基中,反应 1h 后取样用高效液相色谱检测转化产物。同时取适量菌体 SDS-PAGE 分析乳酸脱氢酶表达情况。

1.2.2 乳酸脱氢酶诱导条件优化 采用单因素实验在摇瓶中考察诱导剂浓度,诱导温度,诱导时机和诱导时间对全细胞合成苯基乳酸的影响。重组大肠杆菌基础诱导条件:OD<sub>600</sub> 为 0.6 时添加 IPTG 至 0.6mmol/L,25℃ 诱导 4h。根据单因素实验结果,设计 4 因素 3 水平的正交实验以优化诱导表达条件(表 1)。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental design

水平	因素			
	诱导温度 (℃)	诱导剂浓度 (mmol/L)	诱导时间 (h)	诱导时机 (OD <sub>600</sub> )
-1	20	0.1	4	0.4
0	25	0.2	6	0.8
1	30	0.4	8	1.2

### 1.3 全细胞转化条件的优化

在优化的诱导条件基础上,进一步优化全细胞转化条件。分别考察磷酸缓冲液 pH、细胞干重、起始底物浓度、转化温度对转化苯丙酮酸合成苯基乳酸的影响。优化前基础转化条件:pH6.5,细胞干重 10g/L,底物浓度 9g/L,转化温度 37℃。

### 1.4 摇瓶中流加转化

在最优的诱导条件和转化条件下,将菌体悬浮于 50mL 转化液,菌体干重 20g/L,苯丙酮酸和葡萄糖起始浓度分别为 8,20g/L。分别在 0、0.5h 添加 0.4g 苯丙酮酸钠,在 1、1.5、2、4h 添加 0.2g 的苯丙酮酸钠,定时取样。

### 1.5 高效液相色谱检测

苯丙酮酸钠、苯基乳酸和葡萄糖的检测:取一定量转化液于 4℃、12000r/min 离心 20min,上清液稀释适当倍数,经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤后高效液相(岛津,

LC-20A) 检测。色谱条件: 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 有机酸分析柱; 流动相为 5mmol/L 稀硫酸; 流速 0.6mL/min; 柱温 30℃; 进样体积 5 $\mu$ L, 检测波长 210nm。其中苯丙酮酸钠和苯基乳酸用紫外检测器检测, 葡萄糖用 RID-10A 示差检测器检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组大肠杆菌的构建与功能验证

用于本研究的 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (CGMCC: 1.2437) 乳酸脱氢酶基因 (*D-ldh*) 编码 332 个氨基酸。 *E. coli* BL21 (DE3) / pET28a-*D-ldh* 经 1mmol/L IPTG、25℃ 诱导表达 4h 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。该重组菌在近 41ku 处有明显蛋白条带 (图 1, 泳道 2), 相对分子质量和预期的大小一致, 表明乳酸脱氢酶在大肠杆菌中表达成功。

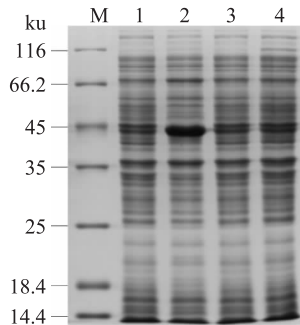


图 1 SDS-PAGE 分析乳酸脱氢酶蛋白表达

Fig.1 The analysis of D-lactate dehydrogenase protein by SDS-PAGE

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: 未诱导的重组菌; 2: 经诱导的重组菌; 3: 空质粒菌株; 4: 原始菌株。

重组大肠杆菌和对照菌全细胞转化见图 2, 重组大肠杆菌苯基乳酸产量达到 5.01g/L, 比未经过诱导的重组菌提高了 4 倍多。而值得注意的是原始菌株 BL21 (DE3) 和含有空质粒的大肠杆菌也有一定的转化能力, 分别达到 0.71g/L 和 0.63g/L, 可能是胞内也有一定水平乳酸脱氢酶或其它酶系对苯丙酮酸也有一定的转化能力。结果表明, 在大肠杆菌中表达外源乳酸脱氢酶显著增强了全细胞的转化能力。

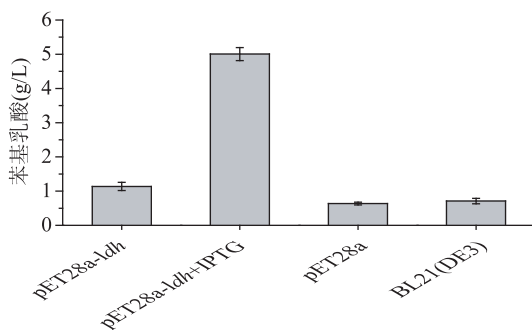


图 2 不同菌株生物合成苯基乳酸的影响

Fig.2 The bioconversion effect of native strains and recombinant strains

### 2.2 诱导条件优化

#### 2.2.1 诱导剂浓度对合成苯基乳酸的影响 当 IPTG

浓度为 0.2mmol/L 时, 苯基乳酸产量达到近 2.7g/L (图 3A)。此后随着诱导剂浓度的加大, 苯基乳酸产量逐渐下降, 值得注意的是菌体密度也发生了不同程度的下降, 当诱导剂浓度为 0.8mmol/L 时, 菌体密度相对 0.2mmol/L 诱导剂时降低了 19%, 说明诱导剂浓度过大, 对重组菌的生长有抑制作用。

2.2.2 诱导温度对合成苯基乳酸的影响 当诱导温度为 25℃ 时, 苯基乳酸产量达到最大 (图 3B)。升高诱导温度, 虽然菌体干重进一步提高, 但是该重组菌的转化效率并没有随着菌体浓度的升高而升高, 当诱导温度为 35℃ 时苯基乳酸产量只有 25℃ 的 54%。这充分说明诱导温度对重组菌转化活性有显著影响。故采用 25℃ 低温诱导有利于苯基乳酸的合成。

2.2.3 诱导时机对合成苯基乳酸的影响 合理的诱导时机不仅有利于乳酸脱氢酶大量表达, 还有利于菌体的大量获得。起始诱导时机影响重组大肠杆菌合成苯基乳酸结果见图 3C, 当菌体诱导时机  $OD_{600}$  为 0.8 时, 苯基乳酸达到 1.83g/L。

2.2.4 诱导时间对合成苯基乳酸的影响 诱导时间影响重组大肠杆菌合成苯基乳酸结果见图 3D 所示, 随着诱导时间的增加, 菌体浓度都有了一定程度的提高, 但诱导时间超过 6h 后, 苯基乳酸的产量开始下降。其原因可能是随着诱导时间的增加, 全细胞转化活性开始下降。

2.2.5 正交优化 正交实验结果见表 2。极差数据表明, 相对于诱导剂浓度、诱导时机、诱导时间, 诱导温度对苯基乳酸的合成影响最显著, 而诱导时间对结果影响不大, 故采用最佳的诱导条件组合为: 诱导温度 25℃、诱导剂浓度 0.2mmol/L、诱导时间 4h、诱导时机为菌体浓度  $OD_{600}$  达到 1.2 时添加诱导剂, 经实验验证后苯基乳酸产量达到 5.0g/L。

表 2 正交实验结果表

Table 2 Results of orthogonal experimentals

实验号	诱导温度 (°C)	诱导剂浓度 (mmol/L)	诱导时间 (h)	诱导时机 ( $OD_{600}$ )	苯基乳酸 (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	2.41
2	-1	0	0	0	2.61
3	-1	1	1	1	2.47
4	0	-1	0	1	4.21
5	0	0	1	-1	4.10
6	0	1	-1	0	3.96
7	1	-1	1	0	3.54
8	1	0	-1	1	3.78
9	1	1	0	-1	2.59
$k_1$	2.497	3.387	3.383	3.033	
$k_2$	4.090	3.497	3.137	3.370	
$k_3$	3.303	3.007	3.370	3.487	
R	1.593	0.490	0.246	0.454	

### 2.3 全细胞转化条件优化

在最佳的诱导条件下, 考察了重组菌全细胞转化过程中影响苯基乳酸产量的因素。结果见图 4, 最

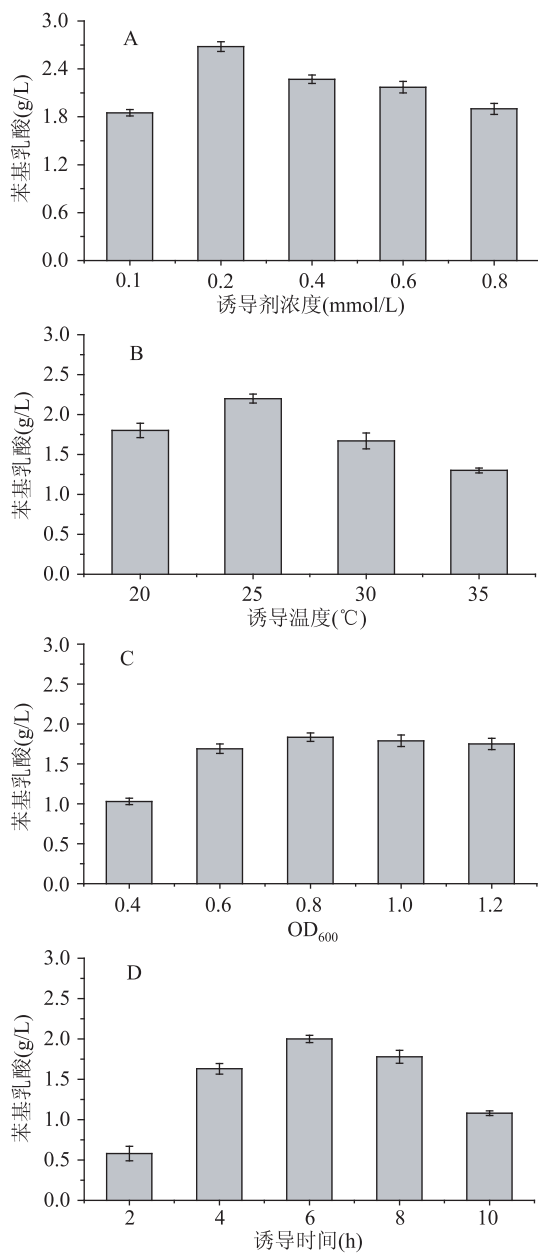


图3 诱导条件的优化

Fig.3 Optimization of induction condition

注:A:诱导剂浓度对苯基乳酸生产的影响;  
B:诱导温度对苯基乳酸生产的影响;  
C:诱导时机对苯基乳酸生产的影响;  
D:诱导时间对苯基乳酸生产的影响。

优 pH 为 7.0,最佳转化温度为 37°C,最佳的底物浓度为 8g/L,最佳的生物量为 20g/L。同时对表面活性剂吐温-80 在生物转化中对苯基乳酸合成影响的研究结果见图 5,和对照组相比,在转化开始时向转化液中添加不同浓度的吐温-80,苯基乳酸产量均有不同程度的提升。当吐温-80 达到 1% (v/v) 时,苯基乳酸产量达到 4.91g/L,比对照组的 3.8g/L 提高了 29%,转化率也达到了 56%。这是因为吐温-80 是一种非离子型表面活性剂,与细胞膜相互作用改变了细胞膜的通透性,有利于底物输入和产物输出。然而浓度过高可能会破坏细胞膜的完整性,对微生物有抑制或杀死作用<sup>[17]</sup>。

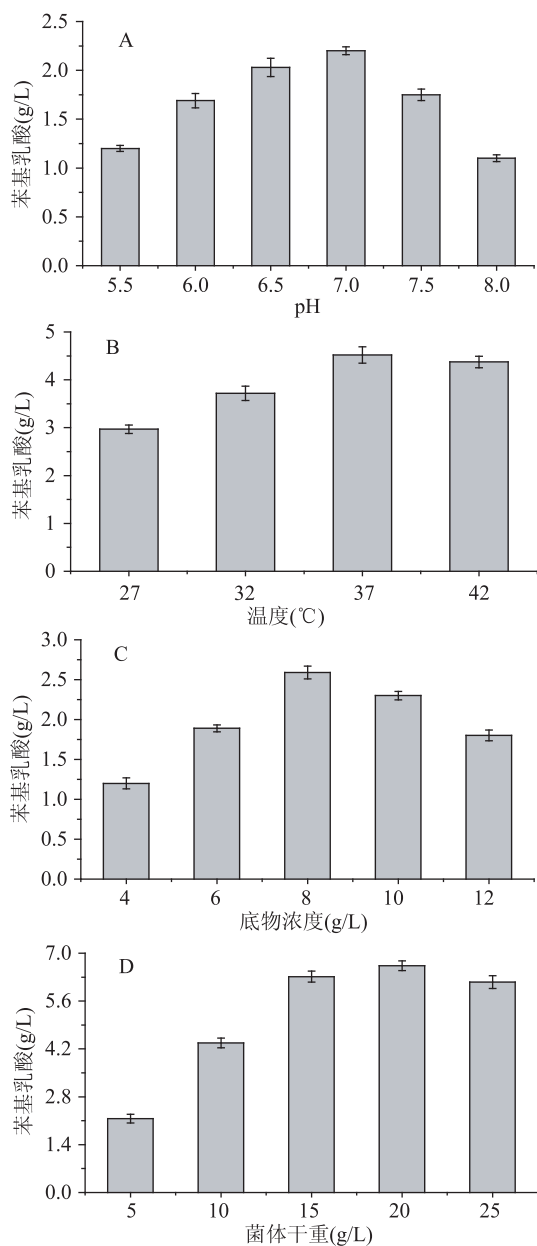


图4 生物转化条件的优化

Fig.4 Optimization of bioconversion conditions

注:A:pH 对苯基乳酸生产的影响;  
B:转化温度对苯基乳酸生产的影响;  
C:底物浓度对苯基乳酸生产的影响;  
D:生物量对苯基乳酸生产的影响。

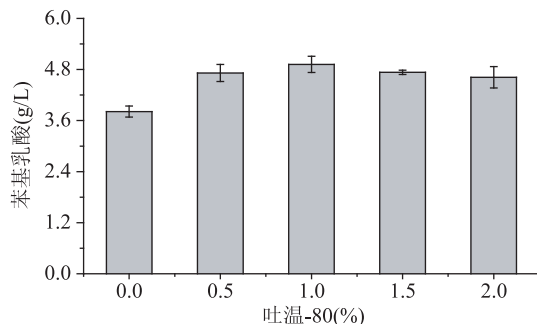


图5 吐温-80 对转化合成苯基乳酸的影响

Fig.5 Effect of Tween-80 on PLA production

## 2.4 底物流加强化苯基乳酸合成

通过分批添加底物可以有效避免转化过程中的底物抑制,有利于产物的合成。在反应的前 1h,苯丙酮酸钠快速转化成苯基乳酸(图 6)。随后,菌体转化活力逐渐下降,经 6h 转化和底物添加,最终苯基乳酸浓度为 17.23g/L,生产率为 2.87g/L/h,转化率达到 54%。与乳酸菌 *Lactobacillus* sp.SK007, *L. plantarum* CRL 778, *L. plantarum* 1081<sup>[13]</sup>相比,本研究获得的重组大肠杆菌全细胞转化反应体系简单,产物易于纯化,生产强度大,转化率高等特点。但另一方面,该工程菌有效转化时间短,从而限制了该重组菌的最终产物浓度以及底物转化率。来自植物乳杆菌的乳酸脱氢酶为 NADH 依赖型的脱氢酶<sup>[18]</sup>,在转化苯丙酮酸的过程中,需要辅酶 NADH 的参与,该重组菌转化时间短的原因之一可能是由胞内缺乏辅因子所引起。Shuhuai Yu<sup>[18]</sup>报道将来自戊糖片球菌 D-乳酸脱氢酶中加入甲酸脱氢酶进行双酶反应可以显著提高苯基乳酸产量。本研究首次将重组大肠杆菌全细胞运用于合成苯基乳酸的研究,与 Wanmeng Mu<sup>[19-20]</sup>报道运用 *Lactobacillus* sp.SK007 通过培养基优化和底物流加策略发酵生产苯基乳酸(17.38g/L)产量接近,比其转化率 51.1% 有所提高。但和 Zhaojuan Zhan<sup>[15]</sup>报道用凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans* SDM)全细胞生产苯基乳酸(产量 37.3g/L,转化率 70%)相比,产量和产率还有待进一步提高。本研究的优势主要体现在以下两个方面。第一,大肠杆菌作为外源基因表达的宿主,遗传背景清晰,技术操作简单,培养条件简单,生长周期短等特点有利于对大肠杆菌进行代谢工程改造,如通过胞内辅因子再生提高苯基乳酸的产量。第二,全细胞转化反应需要培养大量的菌体,大肠杆菌高密度发酵技术已经比较成熟,为苯基乳酸工业化大规模生产提供了理论依据。

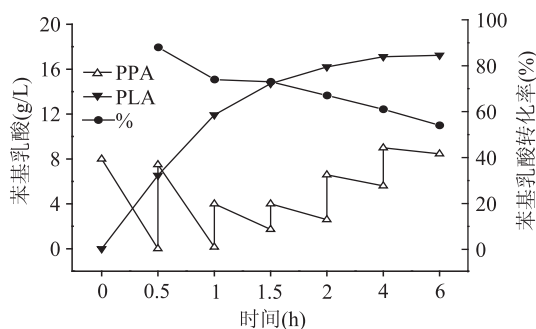


图 6 底物流加培养生产苯基乳酸的时间曲线

Fig.6 Time course of PLA production in fed-batch fermentation with intermittent PPA feeding

## 3 结论

目前,苯基乳酸的研究主要集中于高产菌种的筛选,不同来源微生物脱氢酶的研究和发酵策略的改善。本研究利用基因工程技术成功将 *Lactobacillus plantarum* subsp.*Plantarum* (CGMCC:1.2437) D-乳酸脱氢酶在大肠杆菌中克隆表达,并将该重组大肠杆菌全细胞运用于苯基乳酸的合成。摇瓶转化结果表

明,以苯丙酮酸钠为底物,在最优的诱导条件和转化条件下,苯基乳酸产量达到 17.23g/L,转化率达到 54%。*Lactobacillus* sp.SK007<sup>[3,19]</sup>全细胞转化苯丙酮酸产量为 1.12g/L,转化率达到 56%,而通过培养基的优化苯基乳酸产量达到 2.30g/L,转化率仅为 46%。同国内外现有报道相比,本文苯基乳酸产量和转化率都达到了较高水平,为进一步代谢工程改造大肠杆菌生物合成苯基乳酸奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4084-4090.
- [2] Tuberoso C I G, Bifulco E, Caboni P, et al. Lumichrome and Phenylactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(1): 364-369.
- [3] Li XF, Jiang B, Pan BL. Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenylactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29: 593-597.
- [4] Dieuleveux V, Gueguen M. Antimicrobial effects of D-3-phenylactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese [J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(10): 1281-1285.
- [5] Dieuleveux V, Lemarinier S, Gueguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenylactic acid [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40(3): 177-183.
- [6] Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, et al. Production of phenylactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233(2): 289-295.
- [7] Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal Activity of Phenylactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 634-640.
- [8] Wang J P, Yoo J S, Lee J H, et al. Effects of phenylactic acid on production performance, egg quality parameters, and blood characteristics in laying hens [J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2009, 18(2): 203-209.
- [9] Wang J P, Lee J H, Yoo J S, et al. Effects of phenylactic acid on growth performance, intestinal microbiota, relative organ weight, blood characteristics, and meat quality of broiler chicks [J]. Poultry Science, 2010, 89(7): 1549-1555.
- [10] Ebdrup S, Pettersson I, Rasmussen H B, et al. Synthesis and biological and structural characterization of the dual-acting peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist ragaglitazar [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 46(8): 1306-17.
- [11] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾. 新型生物防腐剂-苯基乳酸在食品中的研究与应用 [J]. 食品与发酵工业, 2007(5): 87-91.

(下转第 157 页)

影响,钙离子会显著增强 A、C 的 POD 的活性,在加工和贮藏过程中应注意排除此离子,以防止木瓜品质变化。

### 参考文献

- [1]肖培根,李大鹏,杨世林,等.新编中药志第二卷.[M].北京:化学工业出版社,2002:107.
- [2]国家药典委员会.中国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:57.
- [3]尹凯,高慧媛,李行诺,等.皱皮木瓜的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2006,23(12):760-763.
- [4]张秀秀,曹帮华,侯蕊,等.皱皮木瓜果实发育过程中主要成分变化的研究[J].陕西农业科学,2012(1):39-43.
- [5]刘婕,王文,卢奎,等.皱皮木瓜多糖的提取及其抗氧化活性研究[J].河南工业大学学报:自然科学版,2011,32(1):48-52.
- [6]刘世尧,白志川,李加纳.重庆皱皮木瓜挥发性成分的 GC-MS 分析[J].中药材,2012,35(5):728-733.
- [7]柳建平.皱皮木瓜超氧化物歧化酶分离纯化研究[J].安徽农业科学,2009,37(1):222-223.
- [8]张国庆,董明,李娜,等.宣木瓜多酚氧化酶酶学特性与抑制剂研究[J].食品科学,2011,32(10):288-291.

(上接第 146 页)

- [12]温永柱,范文来,徐岩,等.白酒中 5 种生物胺的 HPLC 定量分析[J].食品工业科技,2013,34(7):305-308.
- [13].食品中生物胺含量的测定.GB/T 5009.208-2008.中华人民共和国国家标准.
- [14]Dugo G M, Vilasi F, Torre G L L, et al. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines [J]. Food Chemistry, 2006, 95(4):672-676.

(上接第 151 页)

- [12]Dieuleveux V, Vanderpyl D, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti - Listeria compounds produced by *Geotrichum candidum*. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2):800-803.
- [13]Mu W, Yu S, Zhu L, et al. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad - spectrum antimicrobial compound [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(5):1155-63.
- [14]Jia JH, Mu WM, Zhang T, et al. Bioconversion of phenylpyruvate to phenyllactate: gene cloning, expression, and enzymatic characterization of D- and L-lactate dehydrogenases from *Lactobacillus plantarum* SK002 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(1):242-51.
- [15]Zheng ZJ, Ma CQ, 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):19030-19030.
- [16]Tokuda C, Ishikura Y, Shigematsu M, et al. Conversion of *Lactobacillus pentosus* D - lactate dehydrogenase to a D -

- [9]Veda P, Pandey Swati, Singh Rupinder, et al. Purification and Characterization of Peroxidase from Panaya (*Carica papaya*) Fruit [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167:367-376.
- [10]Dunford H B, Stillman J S. On the function and mechanism of peroxidase [J]. Coord Chem Rev, 1976, 19:187-251.
- [11]Hamid M, Khalil - ur - Rehman. Potential applications of peroxidases [J]. Food Chemistry, 2009, 115(4):1177-1186.
- [12]丁薪源,曹建康.果实过氧化物酶酶学特性研究进展 [J]. 食品科技, 2012, 37(10):62-66.
- [13]敬海明,邓玉,成丽丽,等.韭菜过氧化物酶的分离纯化及性质. [J]. 食品科学, 2012, 33(15):226-230.
- [14]Yihong Hu, Juan Wu, Ping Luo, et al. Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(11):2752-2756.
- [15]Thimmaraju Rudrappa, Venkatachalam, Roohie Kaunain, et al. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Food Chemistry, 2007, 105:1312-1320.
- [16]罗万春,薛超彬.昆虫酚氧化酶及其抑制剂 [M]. 北京:科学出版社,2010:33-36.
- [17]韩涛,李丽萍.果实和蔬菜中的过氧化物酶 [J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1):69-73.

- [15]Veciana - Nogues M T, Hernandez - Jover T M - F a E A. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products [J]. J AOAC Int, 1995:78(74)1045-1050.

- [16]Martín - lvarez P J, Marcobal, Polo C, et al. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines [J]. European Food Research and Technology, 2005, 222(3-4):420-424.

- hydroxyisocaproate dehydrogenase through a single amino acid replacement [J]. Journal of bacteriology, 2003, 185(16):5023-5026.

- [17]钱欣平,阳永荣,孟琴.生物表面活性剂对微生物生长和代谢的影响 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(3):75-78.

- [18]Yu SH, Zhu LJ, Zhou C, et al. Enzymatic production of D-3 - phenyllactic acid by *Pediococcus pentosaceus* D - lactate dehydrogenase with NADH regeneration by *Ogataea parapolyomorpha* formate dehydrogenase [J]. Biotechnology Letters, 2013, 36(3):27-31.

- [19]Mu WM, Chan C, Li XF, et al. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3):1366-1370.

- [20]Mu WM, Liu FL, Jia JH, et al. 3 - Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH - control in fed - batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21):5226-5229.