

不同微生物的 α -乙酰乳酸脱羧酶的生理生化特性的研究*

何秀萍 怀文辉 郭文洁 张博润**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要:分析测定了不同微生物的 α -乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)酶活力,结果表明不同来源的 ALDC 酶活力有较大差异,酶反应速度曲线存在明显差异,酶反应体系的 pH 对 ALDC 酶活力有明显的影响,如乳酸乳球菌的 ALDC 酶反应最适 pH 为 6.6,而产气气杆菌的 ALDC 酶反应的最适 pH 为 5.8;酶反应体系中加入不同浓度的亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸对不同来源的 ALDC 酶活性有较明显的影响。

关键词:微生物, α -乙酰乳酸脱羧酶, 生理生化特性

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0018-04

STUDY ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF α -ACETOLACTATE DECARBOXYLASES FROM DIFFERENT MICROBES

HE Xiu-Ping HUAI Wen-Hui GUO Wen-Jie ZHANG Bo-Run

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract: The enzyme activity of α -Acetolactate Decarboxylases (ALDC) from different microbes was studied, the results demonstrated that it was quite different among them. There were diversities of their enzyme reaction velocities. It was clear that the enzyme activity was affected by the pH of the enzyme reaction system, for example, the optimum pH of ALDC from *Lactococcus lactis* was 6.6, while for *Aerobacter Aerogenes* it was 5.8. Addition leucine, valine and isoleucine into enzyme reaction system obviously affected the enzyme activity of ALDC from different microbes.

Key words: Microbe, α -Acetolactate Decarboxylase, Physiological and biochemical properties

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3950016)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 3950016)

** 通讯作者

收稿日期: 2000-01-07, 修回日期: 2000-04-13

α -乙酰乳酸脱羧酶(EC 4.1.1.5, 简称 ALDC) 存在于多种细菌中, 它参与 α -乙酰乳酸代谢, 将 α -乙酰乳酸转化为乙偶姻。目前还未在真菌、海藻和原生动物等真核生物中发现该酶的存在^[1~4]。 α -ALDC 可以降低啤酒酿造中双乙酰的生成, 加快啤酒的熟化, 缩短啤酒发酵周期, 有着重要的应用前景。本文报道了不同来源的 ALDC 的部分生理生化特性的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

醋化醋杆菌 (*Acetobacter aceti*) 1.38、1.54、1.61; 产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 1.489、1.876; 乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 1.1690、1.18、1.91; 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS1、BS2; 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 1.17; 弱氧化醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) 1.188; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 1.89 等均为本实验室保存菌株。

1.2 试剂及仪器

α -乙酰乳酸乙酯来购自 Aldrich 公司, 溶菌酶购自 Sigma 公司, α -萘酚和肌酸分别购自北京赢海精细化工厂和军事医学科学院。

1.3 培养基和培养条件

NVP 培养基: 蛋白胨 10g, 葡萄糖 20g, 酵母粉 5g, 丙酮酸钠 1g, 硫酸镁 0.1g, 氯化锌 0.1g, pH 7.0 定容 1L。上述菌株按 10% 接种量接种在 NVP 培养基中, 37°C 摇床培养 18h。

1.4 ALDC 酶活力的测定

按文献[5]进行。

2 结果与讨论

2.1 不同菌株 ALDC 酶活力的测定

按照酶活测定方法, 在完全相同条件下测定了 16 个不同种属菌株的 ALDC 酶活力(3 次实验平均值), 部分结果见表 1。从表中数据可见不同菌株的 ALDC 酶活力有较大差异。从中选出酶活力较高、代表不同种属的菌株 1.38、1.876、1.91 和 BS1 作进一步研究。

表 1 不同菌株 ALDC 酶活力比较

菌 株	1.38	1.54	1.61	1.489	1.876	1.17	1.91	BS1	BS2
酶活力(IU/mL 培养液)	0.35	0.13	0.08	0.16	0.26	0.12	0.38	0.72	0.31

2.2 不同反应时间酶活力的变化

按实验所述方法制备菌株 1.38、1.876、1.91 和 BS1 粗酶液, 用于后续分析。分别测定了不同菌株粗酶液反应体系在各个时间的乙偶姻生成量和 ALDC 酶活力。实验结果(图 1)表明菌株 1.876 和 1.91 的 ALDC 粗酶液在 10min 以内反应速度基本保持恒定, 随着反应时间的延长, 酶反应速度逐渐下降, 表现的是典型的酶反应速度曲线; 而菌株 1.38 和 BS1 则不是典型的酶反应速度曲线。菌株 1.38 的 ALDC 粗酶液从反应 5min 到 10min, 酶活力(酶反应速度)降低了 42%, 并且随时间的延长, 酶活力没有表现出降低的趋势; 菌株 BS1 的 ALDC 粗酶液的 ALDC 酶活力在反应 10min 时达到最大, 以后随时间的延续, 酶活力基本保持不变。上述结果表明不同菌种的 ALDC 酶反应速度曲线存在差异。

2.3 酶反应体系 pH 对 ALDC 酶活力的影响

配制 pH 在 5.0~7.2 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,用不同 pH 的缓冲液分别制备不同菌株的 ALDC 粗酶液。反应体系由相应 pH 的酶液和底物组成。ALDC 酶活测定结果表明酶反应体系的 pH 对不同来源的 ALDC 酶活力有明显的影响(图 2),如乳酸乳球菌 1.91 的 ALDC 酶反应最适 pH 为 6.6,在 pH 5.8~7.0 范围内酶活性比较稳定;而产气气杆菌 1.876 的 ALDC 酶反应的最适 pH 为 5.8,在 pH 5.5~6.0 范围内酶活性比较稳定。

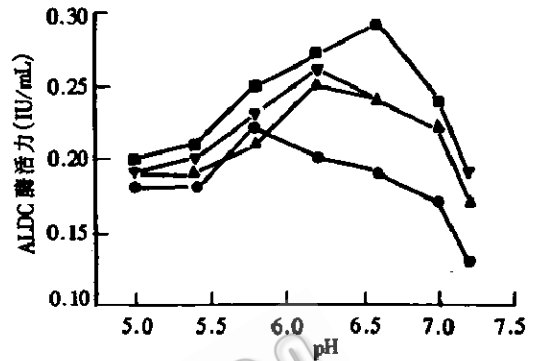
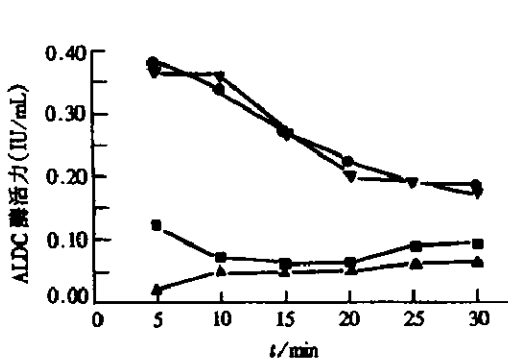


图 1 不同菌株 ALDC 酶反应速度及酶活力变化曲线 图 2 反应体系 pH 对不同菌株 ALDC 酶活性的影响
● 1.91, ▲ BS1, ■ 1.38, ▼ 1.876 ● 1.876, ▲ BS1, ■ 1.91, ▼ 1.38

2.4 不同氨基酸对 ALDC 酶活性的影响

在酶反应体系中加入不同浓度的亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸,测定它们对 ALDC 酶活性的影响。结果表明这 3 种氨基酸对不同菌株的 ALDC 酶活性的影响不同。这 3 种氨基酸对乳酸乳球菌 1.91 的 ALDC 酶活性表现出激活作用,最高酶活分别在 40mmol/L 亮氨酸、20mmol/L 异亮氨酸和 20mmol/L 缬氨酸时出现,分别比对照提高了约 12%、15%和 12%。酯化醋杆菌 1.38 的 ALDC 酶活受亮氨酸和异亮氨酸的轻微激活,分别在 40mmol/L 和 60mmol/L 时达最高,提高了 4.8%和 3.4%,而缬氨酸则使 ALDC 酶活性降低。3 种氨基酸对枯草芽孢杆菌 BS1 的 ALDC 酶活性的影响基本与 1.38 菌株近似,缬氨酸使酶活性显著降低,亮氨酸和异亮氨酸则激活酶,并在 60mmol/L 亮氨酸和 20mmol/L 异亮氨酸时达最高,酶活性分别提高了 11%和 12%。而产气气杆菌 1.876 的 ALDC 酶活性受亮氨酸的影响不大,呈稍微降低趋势。40mmol/L 的异亮氨酸和 20mmol/L 的缬氨酸则分别使酶活性提高了 8.1%。

2.5 不同氨基酸之间组合对 ALDC 酶活性的影响

在上述实验结果基础上测定了 3 种氨基酸各 10mmol/L 和 20mmol/L 浓度下对不同菌株的 ALDC 酶活性的影响(表 2)。结果表明不同的氨基酸组合对酯化醋杆菌 1.38 的 ALDC 酶活性均有激活作用,其中 20mmol/L 异亮氨酸和缬氨酸的活性达最高,比对照提高了 41%。除了 10mmol/L 亮氨酸和异亮氨酸使枯草芽孢杆菌 BS1 的 ALDC 酶活性略有提高外,其他组合均使酶活性降低。几种氨基酸组合均使乳酸乳球菌 1.91 的 ALDC 酶活性降低。而产气气杆菌 1.876 ALDC 酶在各种氨基酸为 10 mmol/L 时活性均降低,氨基酸浓度为 20 mmol/L 时各种组合均表现出对酶的激活作用,20mmol/L 异亮氨酸和缬氨酸的激活作用最强,酶活力比对照提高了 37%。多种氨基酸组合对 ALDC 酶活性的影响不同于单一氨基酸的影响,可见支链氨基酸对不同菌株的 ALDC 酶活性的影响机制是比较复杂的,其机理有待进一步探明。

表 2 不同氨基酸组合对 ALDC 酶活性的影响

菌株	对照	每种氨基酸的浓度为 10mmol/L				每种氨基酸的浓度为 20mmol/L			
		Leu+Ile	Leu+Val	Ile+Val	Leu+Ile+Val	Leu+Ile	Leu+Val	Ile+Val	Leu+Ile+Val
1.38	0.17	0.23	0.21	0.22	0.21	0.23	0.19	0.24	0.20
BS1	0.19	0.21	0.15	0.15	0.13	0.18	0.16	0.16	0.15
1.91	0.47	0.41	0.40	0.39	0.35	0.31	0.25	0.40	0.36
1.876	0.43	0.19	0.23	0.21	0.15	0.44	0.46	0.59	0.46

2.6 氨基酸对硫酸铵部分纯化的 ALDC 酶活性的影响

用 30%~50% 饱和度的硫酸铵对枯草芽孢杆菌 BS1 的粗酶液进行分级沉淀, 获得部分纯化的 ALDC 酶。在反应体系中加入不同浓度的亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸, 检测它们对部分纯化 ALDC 活性的影响。结果表明三种氨基酸对 ALDC 酶活性均有激活作用(图 3)。当亮氨酸为 60mmol/L、异亮氨酸为 10mmol/L 和缬氨酸为 80mmol/L 时酶活性最高, 分别比对照提高了 37%、40% 和 65%。表现出硫酸铵部分纯化的 ALDC 与 ALDC 粗酶液不同的酶学性质。

本研究结果表明不同来源的 ALDC 的反应速度曲线、生理生化特性有一定的差异, 支链氨基酸对 ALDC 酶活性有明显影响, 但对粗酶液和部分纯化酶的影响有所不同。

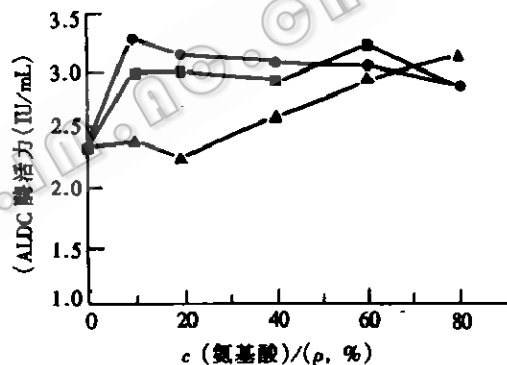


图 3 不同氨基酸浓度对部分纯化 ALDC 酶活性的影响

● 异亮氨酸, ▲ 缬氨酸, ■ 亮氨酸

参 考 文 献

- [1] Godtfredsen S E. Carlsberg Res Commun, 1983, 48: 239~247.
- [2] Phalip V, Monnet C, Schmitt P, et al. FEBS Lett, 1994, 351: 95~99.
- [3] Monnet C, Phalip V, Schmitt P, et al. Biotechnol Lett, 1994, 16(3): 257~262.
- [4] Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P. J Bacteriol, 1993, 175(5): 1392~1404.
- [5] 高 键, 铁翠娟, 王忠彦, 等. 微生物学通报, 1998, 25(6): 336~338.