

苹果酸-乳酸发酵的相关酶和基因的研究进展

刘延琳¹ 李 华¹ 蒋思欣² 张博润^{2*}

(西北农林科技大学葡萄酒学院 杨凌 712100)¹ (中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要:对苹果酸-乳酸发酵的相关酶及其基因的研究进展作了简要综述。

关键词:乳酸菌, 苹果酸-乳酸发酵, 基因克隆与表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0103-05

苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic Fermentation, MLF) 是在乳酸菌的苹果酸-乳酸酶催化下, 使双羧基的 L-苹果酸直接转变成单羧基的 L-乳酸的过程, 在增加葡萄酒风味和微生物稳定性等方面有重要作用, 是优质干红葡萄酒生产的必经步骤。近年来国外对 MLF 相关酶和基因的研究比较活跃, 本文就相关研究进展作简要综述。

1 MLF 相关酶及其特性

MLF 相关酶主要有苹果酸-乳酸酶 (Malolactic Enzyme, MLE)、苹果酸通透酶 (Mal-

* 联系人 Tel: 010-62637679, E-mail: zhanghr@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2002-08-11, 修回日期: 2002-11-10

ate Permease) 和 MLF 正向调节酶 MleR。

1.1 苹果酸-乳酸酶 (MLE) 已从数种乳酸菌中分离纯化 MLE, 如干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*), 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*), 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*)^[1,2]。该酶的基本特征是依赖 NAD^+ 和 Mn^{2+} , 将 L-苹果酸转化成为 L-乳酸。 NAD^+ 为 MLE 的辅酶, Mn^{2+} 为激活剂。MLE 只能将 L-苹果酸转变成 L-乳酸而不能生成 D-乳酸。MLE 为诱导酶, 只有当苹果酸和可发酵糖存在时, 乳酸菌才能合成 MLE。MLE 的每个亚基的分子量为 60 ~ 70kD。活性形式的 MLE 是具有相同亚基的二聚体或四聚体。

从葡萄酒中分离纯化的 *L. mesenteroides* MLE 的分子量为 235 kD, 是 4 个分子量为 59kD 的完全相同的亚基组成的多聚体。等电点 (pI) 为 4.35, 酶活最适 pH 为 5.75。草酸铵盐、1,6-二磷酸果糖、L-乳酸为该酶的非竞争性抑制剂, 琥珀酸、柠檬酸和酒石酸是其竞争性抑制剂。*L. casei*, *L. mesenteroides*, 及 *O. oeni* 的 MLE 非常相似^[2], 在 pI 和最佳 pH 上只有微小的差别。

1.2 苹果酸通透酶 (MleP) MleP 也叫苹果酸转运蛋白, 其作用是负责 L-苹果酸从胞外向胞内的运输^[3,4]。此类酶属于一些蛋白家族, 如 *L. lactis* 的 MleP 和 *L. mesenteroides* 的柠檬酸盐运载体 (CitP) 是同源蛋白, 分别催化柠檬酸-乳酸及苹果酸-乳酸的转化^[5,6]。但 *O. oeni* 的 MleP 与其他羧酸的转运蛋白并无同源性, 表明它是属于另一特殊的运载蛋白家族^[7]。Labarre 等对 *O. oeni* 的 MleP 研究表明^[7], 该酶是一种膜结合转运蛋白, 由 314 个氨基酸残基组成, 分子量为 34kD。MleP 在膜外有 L-苹果酸的结合位点, 当 L-苹果酸与特异性位点结合后, 酶发生跨膜构象变化, 苹果酸被运入膜内并释放到细胞质中, MleP 恢复原来构象, 接着进行下轮的运输。Grobler 等^[8]对其它微生物, 如粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 苹果酸通透酶 MaeI 的研究表明, MaeI 为含有 438 个氨基酸的蛋白, 推断分子量为 49kD, 其作用是运载 L-苹果酸盐、琥珀酸盐丙二酸。Kawai 等^[10]的研究表明, *S. bovis* ATCC 15352 的 L-苹果酸盐通透酶基因, 与 NAD 依赖型的苹果酸酶 (MacE) 基因共转录, 可编码特异性 L-苹果酸通透酶 MaeP。推测此酶是一个含有 441 个氨基酸的蛋白, 分子量为 47kD, pI 为 9.3。MaeP 在低 pH 值 (5.1 ~ 5.9) 表现高活性和 L-苹果酸盐特异性, 可被离子载体、尼日利亚菌素 (nigericin)、缬氨霉素 (valinomycin) 强烈抑制。

1.3 正向调节酶 MleR Renault 等^[9]在 *L. lactis* 中发现了称为 MleR 的 MLF 正向调节酶, 负责苹果酸-乳酸系统的激活。Labarre 等^[7]在 *O. oeni* 中也发现了与 *L. lactis* 的 MleR 类似的蛋白。关于这类酶在 MLF 过程中的作用仍不够清楚, 其对苹果酸-乳酸活性的调节作用可能与乳酸菌的种类和菌系有关^[4]。特别是在环境条件变化很大的葡萄酒中, 需要进一步研究其作用。

2 MLF 相关基因研究、克隆和测序

MLF 的关键基因是苹果酸-乳酸酶基因 *mle* (*O. oeni* 和 *L. lactis* 的 *mle* 分别以 *mleA* 及 *mleS* 表示)、苹果酸通透酶基因 *mleP* 和 MLF 正向调节酶基因 *mleR*。源于 *L. lactis*, *O. oeni* 的 *mle* 全序列及 *P. acidilactice*, *P. parvulus*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. rhamnosus*, *L. mesenteroides* 的 *mle* 部分编码序列已有发表。这些序列的分析研究不但有助于了解 *mle* 及其所编码酶的特性, 而且可用于乳酸菌不同属的分类

及系统进化分析。

早在1984年, Williams等^[10]曾从德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)中克隆含有 *mle* 的5kb的DNA片段在大肠杆菌中表达,但未有其序列报道。Ansanay等^[2]进行了 *L. lactis* IL1441菌系 *mleS* 的克隆、测序,检测到两个开放读框(ORF), ORF1为 *mleS* 基因,其完整的编码区包含1623个核苷酸,编码MLE。起始密码子ATG上游7个核苷酸处有S-D序列(GGAGG)。启动子区域包括间隔18个核苷酸的-10区(TATAGT)和-35区(TT-GACT),位于ATG起始密码子上游44个核苷酸处。*mleS* 的终止密码子为TAA。在ORF1的3'端未发现终止结构。TAA与ORF2的起始密码子间隔15个核苷酸。起始密码子上游有S-D序列(AAGG),但无典型的启动子结构,表明这两个基因同属一个操纵子。Denayrolles等^[11]则利用MLE的N端20个氨基酸序列设计简并引物,从 *L. lactis* IL1441基因组DNA中得到包含了 *mleS* 完整序列的DNA片段,编码540个氨基酸的蛋白,其pI为4.46,分子量为60kD, pH4.3。Bandell等^[12]对 *L. lactis* IL1441菌系包含 *mleS* 和 *mleP* 基因的3.4kb核苷酸片段的进一步测定及分析表明, ORF2为 *mleP* 基因,其完整的编码区包含1278个核苷酸,编码426个氨基酸的蛋白。*mleS* 和 *mleP* 基因构成操纵子结构。Labarre等^[3]构建了 *O. oeni* 的基因组文库,然后用苹果酸酶基因的两个保守区序列设计寡核苷酸引物,通过PCR扩增,得到324bp的DNA片段,用此片段为特异性探针(DIG标记)进行菌落杂交,经筛选、酶切、测定转化子的核苷酸序列,得到两个开放阅读框(ORF)。ORF1(即 *mleA*)的编码区为1623个核苷酸。ATG起始密码子之前的核糖体结合位点(RBS)(5'-ACGAG-3')与 *L. mesenteroides* 16S rRNA 5'-CACCTCCTTCT-3'的3'端互补。推断 *mleA* 基因编码的多肽含有541个氨基酸残基,分子量为59kD, pI是4.55。ORF2(即 *mleP*)包含945个核苷酸,推断编码含314个氨基酸的蛋白,分子量约为34kD。*mleP* 的RBS(5'-AAGTGGG-3')位于 *mleA* 基因的编码区内,与 *L. mesenteroides* 16S rRNA 5'-CACCTCCTTCT-3'的3'端部分互补。*mleP* 基因起始位点与 *mleA* 基因有一个核苷酸重叠。*mleA* 基因的转录无终止区。在 *mleP* 的终止密码子TAA下游,经检测含有终止子结构。这就进一步表明转录为 *mleA-mleP* 操纵子的多顺反子转录。在此工作的基础上, Labarre等^[7]通过mRNA分析研究 *O. oeni* *mle* 基因座的遗传结构,证实含有 *mleA* 和 *mleP* 的操纵子是双顺反子的转录单元。在 *mleA* 基因的上游,发现一个与 *mle* 操纵子(*mleA* 基因)反向转录的ORF3(894bp),编码含有297个氨基酸的蛋白,分子量约为34kD。在翻译起始位点ATG上游15bp处,是一个可能的核糖结合位点(5'-AAAGAGA-3')。这一基因距离 *mle* 基因操纵子很近,蛋白比较表明其与乳球菌 MleR 调节蛋白具高度同源性。但未能测得该基因 mRNA 5'端的序列,且其所编码酶的功能尚待进一步研究。

3 不同来源 *mle* 和 *mleP* 的同源性分析

我们将已发表的不同种或菌系的 *mle* 和 *mleP* 的同源性进行了比较(表1)。*L. lactis* 两个不同菌系的 *mle* 的编码区及其所编码氨基酸的序列完全相同,它们的 *mle* 的编码区只有一个碱基的差异,氨基酸序列则完全相同;*L. lactis* 与 *O. oeni* 的 *mle* 编码区的碱基序列同源性为69%,氨基酸序列的同源性为66%;而不同种、属 *mleP* 的序列差异很大, *L. lactis* 与 *O. oeni* 及 *S. pombe* 的 *mleP* 的编码区及氨基酸序列相似程度很低,并无同源性。

4 MLF 相关基因的克隆与表达研究

Williams 等^[2,10,11,13]曾进行过不同种乳酸菌 *mle* 基因的克隆及转化大肠杆菌和酿酒酵母的研究,实现了 *mle* 基因在酿酒酵母中的功能表达,但酵母转化子降解外源 L-苹果酸的效率较低。

Labarre 等^[3]克隆了 *O. oeni* 的 *mleA* 基因,在大肠杆菌中得到表达,其蛋白的分子量为 60kD。含有 *mleA* 基因的酵母转化子在培养 48h 后,生成 1g/L 的 L-乳酸,残留的 L-苹果酸为 7.9g/L;而对照菌系生成 0.15g/L 的 L-乳酸,残留的 L-苹果酸为 9.2g/L。Ansanay 等^[13]使多拷贝的 *mleS* 基因在乙醇脱氢酶 (ADH1) 启动子控制下,在 *S. cerevisiae* 中得到较高水平表达,其 MLE 活性是 *L. lactis* 的 3

表 1 不同种或菌系相似功能基因同源性比较

菌种	基因	碱基 (%)	氨基酸 (%)	引文
<i>L. lactis</i> ssp.				[16]
<i>Lactis</i> IL1403	<i>mleS</i>	100	100	
<i>L. lactis</i> IL1441				[2, 11]
<i>L. lactis</i> IL1403	<i>mleP</i>	99	100	[16]
<i>L. lactis</i> IL1441				[12]
<i>L. lactis</i> IL1441	<i>mleS</i>	69	66	[2, 11]
<i>O. oeni</i>	<i>mleA</i>			[3]
<i>L. lactis</i> IL1441	<i>mleP</i>	51	27	[12]
<i>O. oeni</i>				[3]
<i>L. lactis</i> IL1441	<i>mleP</i>	53	28	[12]
<i>S. pombe</i>	<i>mael</i>			[8]
<i>S. pombe</i>	<i>mael</i>	50	27	[8]
<i>O. oeni</i>	<i>mleP</i>			[3]

倍。他们的研究使得 *mle* 在酵母菌中的表达较前有较大幅度的提高,但含有 *mle* 基因的酵母转化子降解外源 L-苹果酸的效率仍局限在 20% 以下。酵母转化子降解外源 L-苹果酸效率不高的主要原因,是由于酿酒酵母体内缺乏 L-苹果酸的转运蛋白,苹果酸盐的转运效率受到限制^[14,15]。

Bony 等^[14]将 *L. lactis* 的 *mleS* 基因和 *S. pombe* 的 *mael* 基因在酿酒酵母中共表达,可在 4d 内降解 3g/L 的 L-苹果酸盐,使 L-苹果酸的降解能力大幅度提高。Volschenk 等^[15]也进行了类似的研究。构建共表达 *mle* 和 *mleP* 基因的酵母转化子,是提高其苹果酸降解能力的一个有效途径。

5 展望

良好地控制酒精发酵和苹果酸乳酸发酵、经济有效地生产高品质的葡萄酒一直是葡萄酒酿造学家追求的目标。近十几年来,随着微生物分子遗传学的飞速发展,已使葡萄酒酵母的育种研究进入到一个新的水平。构建可进行 MLF 的葡萄酒酵母工程菌,可免去依赖乳酸菌的 MLF 过程,使两步发酵由酵母菌单独完成,缩短葡萄酒的酿造周期,避免细菌在 MLF 过程中产生不必要的代谢副产物,并可减少细菌引发葡萄酒微生物破败的危害。这不但可深化对葡萄酒微生物降酸机制的了解,而且可以丰富和发展葡萄酒酿造的工业微生物学理论,简化葡萄酒、果酒的酿造工艺,经济、有效地控制生物降酸过程。因此,对 MLF 相关酶及基因的深入研究,具有重要的理论意义和实际应用价值。

参考文献

- [1] Ansanay V, Dequin S, Blondin B, et al. FEBS Lett, 1993, 11; 332 (1-2): 74-80.
- [2] Labarre C, Cavin J F, Divies C, et al. Lett Appl Microbiol, 1998, 26 (4): 293-296.