

# 双歧杆菌的有关酶系

杨桂苹

(上海大学生命科学学院 上海 201800)

关键词 双歧杆菌, 嗜乳酸杆菌

分类号 Q93-936 文献标识码 C 文章编号 ISSN-0253-2654(1999)-01-56-58

按照悉生生物学理论, 肠内菌群对宿主一人的健康有重大的影响, 双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是典型的能在健康人肠道内定植的有益菌在母乳喂养的婴儿肠道中, 该菌占菌群总数的 92% 以上, 而瓶养婴儿粪便中优势菌则为嗜乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilum*), 现已确认双歧菌数量是衡量婴儿健康状况的重要指标之一<sup>[1]</sup>。在健康成年和长寿老人肠道中双歧菌也是优势菌, 某些动物如猪、狗、老鼠、蜜蜂等, 消化道中也存在大量双歧杆菌。双歧杆菌数量随年龄变化而呈动态变化趋势, 并与机体的许多生理、病理现象关系密切, 因而引起微生物学、医学、免疫学、营养学、遗传学、食品学等领域的专家学者的广泛关注。国内已多次召开全国微生物生态学学术讨论会, 1990 年在日本也举行了国际双歧杆菌专题讨论会, 对双歧杆菌生化特性、分类、对宿生的生理作用、机制、应用等进行研究探索, 并且该菌对机体的生物屏障、提供营养、预防及抗肿瘤、抗衰老、抗感染功效已得到肯定。双歧杆菌的这些保健功能离不开菌体中酶的作用, 本文即对双歧杆菌的重要酶系进行探讨。

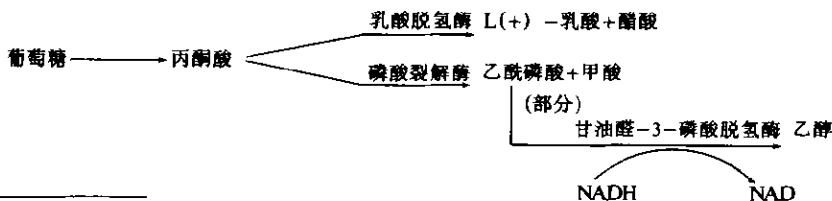
## 1 果糖-6-磷酸磷酸激酶 (F6PPK)

目前, 对双歧杆菌属的区分<sup>[2]</sup>主要依据菌株的表型特征, 如糖发酵类型和细胞形状, 或遗传学特性, 尤其是 DNA-DNA 杂交及 DNA-RNA 杂交的分子机制, 也有人应用低聚核苷酸探针和  $\beta$ -半乳糖苷酶的同功酶图谱。然而有人发现, 双歧杆菌能通过特异性的“果糖-6-磷酸支

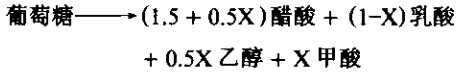
路”, 利用 F6PPK 对葡萄糖进行发酵, 这与其它细菌如乳酸杆菌利用醛缩酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶明显不同。

**1.1 F6PPK 的生化性质** 双歧杆菌通常从人或动物的肠道中分离得到, 然而这两种来源菌种的 F6PPK 却差别很大。Sgorbati<sup>[3]</sup>提取纯化了不同来源的双歧杆菌 F6PPK, 发现 *B.dentium* (人源) 和 *B.globosum* (动物源) 有着明显不同的最适 pH 值、金属离子活性、分子量和底物专一性。Scardovi<sup>[4]</sup>也研究了此酶的电泳图谱, 得出相似的结论。Grill<sup>[2]</sup>纯化四种菌, 人源的 *B.longum* 和 *B.dentum* 及动物源的 *B.animalis* 和 *B.globosum* 的 F6PPK, 并进行了同样的研究。碱性环境中美兰对 F6PPK 的强失活作用和底物对酶的保护作用都提示, 在裂解位点上存在着一个或多个 His 残基<sup>[5]</sup>。钟形 Pka 双曲线说明裂解位点解离基团的存在, Pka 值 (5.16 和 7.17) 与酶反应中的 His 有关。对氯高汞苯甲酸为非竞争性抑制剂, 所以 His 并不直接参与底物结合。与 Sgorbati<sup>[3]</sup>不同, Grill<sup>[2]</sup>的研究中, 人源与动物源的双歧杆菌 F6PPK 有着相似的 Km、酶系数、温度和 pH 值, 酶活性受 ATP / ADP (尤其 ADP) 和焦磷酸共同控制, 调节双歧杆菌的生长。不同来源的双歧杆菌 F6PPK 的生化特性还有待进一步澄清。

**1.2 F6PPK 对葡萄糖的催化反应** 双歧杆菌对葡萄糖的发酵可通过 F6PPK 途径和丙酮酸还原成乳酸进行解释<sup>[6]</sup>, 降解途径如下:



乳酸脱氢酶的作用离不开果糖-1,6-二磷酸,所以在无细胞萃取液中存在少量磷酸果糖激酶。可以看出,双歧杆菌对葡萄糖的发酵产物为醋酸、L(+)-乳酸、乙醇和甲酸。如假定1mol葡萄糖生成Xmol甲酸,则发酵理论平衡应为:



此式与Vries<sup>[6]</sup>提出的假设一致。

## 2 与糖代谢相关的酶

**2.1  $\alpha$ 、 $\beta$ -半乳糖苷酶** 所有双歧杆菌都含有 $\alpha$ 、 $\beta$ -半乳糖苷酶,且糖苷酶活力明显高于其它肠道菌。这两种酶的活力在双歧杆菌种间差别很大, *B. angulatum*显著高于其它双歧杆菌菌种<sup>[7]</sup>。

$\alpha$ -半乳糖苷酶降解特殊的糖类 $\alpha$ -D-半乳糖苷寡糖,这些都是不被人利用而可被双歧杆菌消化的多糖,作为小肠中双歧杆菌的主要碳源,选择性地使双歧杆菌增殖<sup>[8]</sup>。低温时 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力下降,并与菌体细胞的存活率呈正相关,对其它不利因素的抵抗能力也弱于 $\beta$ -半乳糖苷酶。

$\beta$ -半乳糖苷酶,又称乳糖酶,当乳糖经乳糖转移系统-质子同向转移偶联作用转移到细胞内后,此酶分解乳糖,提高“乳糖不耐症”患者对乳制品的利用率,常被用于乳制品加工中。此酶不但活力高,而且对不良环境的抗性较强<sup>[7]</sup>。低温时保藏没有明显的活力下降,4℃下可保存4~6月。受某些试剂,如巯基试剂、Triton X-100等作用时酶活稳定,对低pH、O<sub>2</sub>也有相当的耐受力。有人发现<sup>[9]</sup> $\beta$ -半乳糖苷酶与细胞膜连接,这种相连接关系解释了尽管存活细胞数量减少但全酶活力仍很稳定的现象。 $\alpha$ -半乳糖苷酶则未发现与细胞膜的连接。 $\beta$ -半乳糖苷酶稳定的高活力使得双歧杆菌及其培养基更利于添加到食品中,发挥此菌的保健功效。

**2.2  $\alpha$ 、 $\beta$ -葡萄糖苷酶** 所有双歧杆菌中均存在着 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力,而 $\beta$ -葡萄糖苷酶存在于除*B. bifidum*或*B. longum*的其它双歧杆菌种中<sup>[8]</sup>。

最近研究表明,淀粉抵制小肠中的胰淀粉酶,从而成为进入结肠的主要糖源,其水解物可能就是双歧杆菌生长的重要基质。Beverly<sup>[10]</sup>便以淀粉作为唯一碳源和能源研究 $\alpha$ -葡萄糖苷酶。用等电聚焦分析提纯的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶,出现两个峰,等电点分别是3.9(酶I)和4.2(酶II),在葡聚糖凝胶上作凝胶过滤色谱,又发现酶

I无 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力,而含有酶II的样品中酶活得以恢复,蛋白分子量126ku。说明双歧杆菌利用淀粉作碳源,是由于合成一个或两个 $\alpha$ -葡萄糖苷酶。此酶与异淀粉酶/葡萄糖淀粉酶( $r$ -淀粉酶)有着相似的活力,去除非还原性末端的 $\alpha$ -1,4葡萄糖单位,直到分支点,使得此酶对低聚糖比高聚糖有更强的水解性,因而双歧因子中寡糖类居多。目前,对 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究不如 $\alpha$ -葡萄糖苷酶多,但也出现一些资料。

**2.3 与甘露糖降解有关的酶** 在葡萄糖、甘露糖培养基中双歧杆菌生长良好,无细胞萃取液中发现有NAD-多元醇脱氢酶、葡萄糖激酶、果糖激酶、NADH-乙醇脱氢酶和NADH氧化酶。在还原型甘露糖脱氢酶和果糖激酶作用下,甘露糖经脱氢或磷酸化生成果糖-6-磷酸。

双歧杆菌中已分离纯化的与糖代谢有关的酶除上述之外,还有 $\beta$ -呋喃果糖苷酶、甘露糖苷酶、D-木糖苷酶、D-木糖异构酶等,都是人体所不具有的,能水解人体不能消化的寡糖的酶。

另外,有人<sup>[8]</sup>在*B. breve* 15699中测出一种 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶,这是一种有害的粪酶,被认为是转换致癌前体物成类致癌物的酶。Nanno<sup>[11]</sup>证明 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶阳性菌激活肿瘤基因活性,而阴性菌则没有这种现象。

## 3 肽酶

生长迅速的双歧杆菌中发现有高的L-亮氨酸氨肽酶活力<sup>[8]</sup>,并进行纯化和分析,作用于蛋白质或多肽的N端氨基酸残基,尤其是含亮氨酸的肽类,也能水解某些脂肪酸胺类。牛乳蛋白水解物对双歧杆菌的促生长作用即部分来自肽酶的活力<sup>[12]</sup>。

Nishizawa认为<sup>[1]</sup>双歧杆菌等乳酸菌具有磷蛋白磷酸酶,分解乳中 $\alpha$ -酪蛋白,形成微细的凝固奶酪脂肪肽和氨基酸等,提高蛋白消化率。Soda<sup>[12]</sup>指出,双歧杆菌中的肽水解酶系除上述酶外,还有二肽酶、三肽酶、羧肽酶等,共同参与水解过程。

## 4 与胆酸有关的酶

双歧杆菌及其它一些细菌能产生结合胆酸水解酶,尤其是甘氨酸胆酸水解酶,使结合胆酸游离,更有效地抑制致病菌生长<sup>[12]</sup>。但缺乏胆酸7 $\alpha$ -脱氢基酶<sup>[13]</sup>,因而避免二级胆汁酸生成,后者是病原体所不可缺少的。

## 5 其它

有人<sup>[8]</sup>发现生长缓慢的 *B. bifidum* var *pennsylvanicus*(ATCC 11863) 含有高的 N-乙酰-D-葡萄糖胺酶活力, 以含 N-乙酰-D-葡萄糖胺的多糖为底物, 参与合成细胞壁。含此酶的双歧杆菌多来源于婴儿, 成人则未发现。

Rowland 和 Crasso 发现<sup>[1]</sup>双歧杆菌还能分泌一种降解 N-亚硝胺的酶, 预防亚硝胺引起的肿瘤产生。

Hatanaka 对双歧杆菌中的谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶进行纯化分析, 指出这两种酶在氮代谢中起着重要作用, 加强氮的存留<sup>[4]</sup>。

在某些天然的或经过耐氧驯化的双歧杆菌体内, 则存在微量的 NAD-氧化还原酶和 SOD 酶<sup>[5]</sup>, 而且 *B. infantis*, *B. breve* 和 *B. longum* 的除氧酶含量要高于 *B. adolescentis*。

## 6 小结

在双歧杆菌的生化机制中参与的酶类远不止这些, 尚有许多重要的酶未能发现或详细研究, 应加紧这方面的工作, 为双歧杆菌生化研究提供更多依据。

## 参 考 文 献

[1] YuLi Nakazavva. Elsecier Applied Sciences, London

and New York: 1992.

- [2] Grill J P. *Current Microbiology*, 1995,31:49~54.
- [3] Sgorbati G. *Antonie vom Leeuwenhoek*, 1976,45:557~564.
- [4] Scardoni V J. *Bacteriol*, 1971,106:1036~1039.
- [5] Weil L, Seibles T S. *Arch Biochem Biophys*, 1955,54:368~377.
- [6] Vries W de, S J Gerbrandy, Stouthamer A H. *Biochem Biophys Acta*,1967,136:415~425.
- [7] David E Hughes, Dallas G Hoover. *J Dairy Sci*, 1995,78(2):268~276
- [8] Desjardins M L, Denis R J. *Dairy Sci*,1990,73(2):299~307.
- [9] Kilara A, Shahani K M. *J Dairy Sci*, 1976,39:2031.
- [10] Beverley A D, George T M. *Current Microbiology*, 1994,29:43~47.
- [11] Nanno M J. *Med Microbiol*, 1986,22:351.
- [12] Grill J P. *Current Microbiology*,1995,31:23~27.
- [13] Takuya Takahashi, Masami Morotomi. *J Dairy Sci*, 1994,77(11):3275~3286.
- [14] Grill J P. *Letters in Applied Microbiology*,1995,20:328~330.
- [15] Shimamura J *Dairy Sci*,1992,75:3296~3306.