

α -乙酰乳酸脱羧酶研究进展

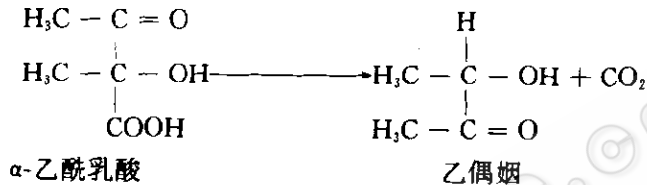
陈 炜 何秉旺

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

(一) 前言

α -乙酰乳酸脱羧酶 (α -acetolactate decarboxylase; EC. 4. 1. 1. 5) 催化 α -乙酰乳酸

(α -acetolactate) 脱羧生成乙偶姻 (acetoin; 3-羟基-2-丁酮):



α -乙酰乳酸是缬氨酸生物合成的中间产物。1952年 Juni^[1]报道了产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) α -乙酰乳酸脱羧酶。1972年 Løken 等^[2]报道分离纯化了产气气杆菌的 α -乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC), 较详细研究了其酶学性质。1982年 Godtfredsen 等^[3]报道用 ALDC 加速啤酒的熟化过程, 可缩短啤酒发酵周期。在啤酒工业上的应用前景促进了 ALDC 的研究和向生产的转化。

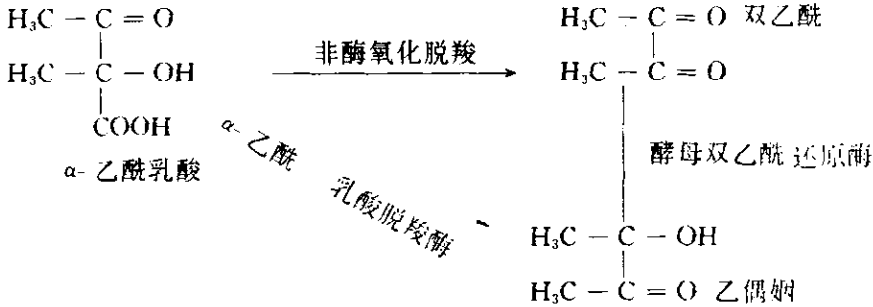
在酒精饮料, 如啤酒和葡萄酒的发酵中, 产生的双乙酰 (diacetyl) 对口味有不良的影响, 如超过 0.15ppm 就会产生类似馊饭的味道, 啤酒中双乙酰的来源很复杂^[4], 主要是酵母代谢的产物, 由 α -乙酰乳酸经非酶氧化脱羧产生。作为缬氨酸生物合成中间产物的 α -乙酰乳酸可经酵母的细胞壁渗出, 在酵母体外非酶氧化脱羧产生双乙酰, 再进入酵母细胞内, 由酵母的双乙酰还原酶还原为乙偶姻, 再由乙偶姻还原酶还原为 2, 3-丁二醇, 这两种物质的味阈值较

高, 对啤酒的风味几乎没有什么影响。 α -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧比双乙酰被还原的速度慢得多 (后者约为前者的 10 倍)。

啤酒的发酵分为主发酵和熟化 (风味成熟) 两个阶段。在主发酵阶段, 麦芽汁中的糖类转化为乙醇和二氧化碳, 风味物质 (酯类, 醇类, 羰基化合物, 硫化物等) 形成。熟化阶段是指从酵母停止生长到啤酒过滤这一阶段, 传统的方法是在低温下储存啤酒 3-6 周, 有的长达三个月, 新式的一罐发酵法也需要 7-8 天, 在此期间, 啤酒的风味成熟和完善, 胶体稳定性改善, 二氧化碳饱和。啤酒的风味物质中双乙酰起主要作用, 其含量直接影响风味成熟, 把双乙酰的量降到标准值以下是风味成熟阶段的主要目的, 也是熟化阶段的时间限制因素, 如果啤酒中的 α -乙酰乳酸在此阶段不能充分除去, 在随后的包装、杀菌过程中就会有较多的双乙酰形成。双乙酰的控制标准随啤酒类型的不同而有所不同, 一般在 0.13ppm 以下。

ALDC 可将 α-乙酰乳酸直接脱羧转化成

乙偶姻, 而不形成双乙酰的步骤:



如将 ALDC 酶制剂在啤酒主发酵阶段或熟化阶段加入, 则可大大缩短啤酒熟化期^[5-8], 从而提高设备的利用率和节省能源。另一个缩短啤酒熟化期, 降低 α-乙酰乳酸的途径是将 ALDC 基因引入啤酒酵母中表达^[9-12], 可使渗出酵母的 α-乙酰乳酸的量大大减少。

(二) ALDC 产生菌和酶学性质

Godtfredsen 等研究了 ALDC 的微生物来源, 表明某些细菌有 ALDC 活性, 而真菌、海藻和原生动物都没有 ALDC 活性^[5]。

Løfken 等^[2]从产气杆菌中分离 ALDC, 超声波破碎菌体, 用离心提取物作为酶源, 经多步提纯, 纯化了 145 倍。最适 pH 值为 6.2-6.4。两价金属离子 Sn²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ 对酶活有一定的抑制作用, Mg²⁺, Mn²⁺ 对酶活抑制较小。该酶除能脱羧 α-乙酰乳酸外还能脱羧 α-乙酰-α-羟基丁酸, 他们认为大概是由于两者结构的相似性。

Godtfredsen 等^[3]从产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 中纯化 ALDC 用于啤酒熟化的研究。将酶加入到新鲜酿制的(主发酵之后)啤酒中, 10℃ 保温 24 小时测定, 双乙酰值达到味阈值以下, 其主要指标及感官性质与用常规方法三周熟化的啤酒相同。Godtfredsen 等^[6]还从乳酸细菌的 3 个属、9 个种、263 株菌中筛选 ALDC, 以用作啤酒熟化添加剂, 其中两株菌有较高的活性和较好的稳定性, 双乙酰乳酸链球菌 (*Streptococcus diacetylactis*) FD-64-D 和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) DSM254。研

究表明锌对干酪乳杆菌 ALDC 的活性是必需的。

Olsen 等^[13]从 300 多株芽孢杆菌中筛选 ALDC。其中一株短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) ATCC11031 和几株地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 酶活较高。对其进行了提纯和酶学性质的研究。从其中一株地衣芽孢杆菌中提纯 ALDC 制成抗血清, 与其它几株地衣芽孢杆菌产生的酶免疫学上相同, 而与短芽孢杆菌产生的酶免疫学上不同, 说明这两种菌产生的 ALDC 是不同的酶。地衣芽孢杆菌 ALDC 的反应最适 pH 值为 5-6, 用薄层聚焦凝胶电泳测得 pI 值为 4.7。短芽孢杆菌 ALDC 反应最适 pH 值为 5-7, 用层析聚焦测得 pI 值为 7.6 和 7.0, 可能含有两个不同 pI 值的蛋白。他们认为从实际应用出发用短芽孢杆菌生产 ALDC 较地衣芽孢杆菌好, 短芽孢杆菌 ALDC 在提纯中收率高, 此外地衣芽孢杆菌会产生一种副产物的酶, 使啤酒产生异味, 须在纯化中除去。两者的 ALDC 的稳定性都明显高于肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) ALDC。在主发酵后的啤酒中 10℃ 测定酶的半衰期, 短芽孢杆菌和 3 株地衣芽孢杆菌 ALDC 的半衰期都在 11 天以上, 在肺炎克氏杆菌 ALDC 的半衰期只有 2-3 小时。

Ohshiro 等^[14]从保藏细菌中筛选 ALDC, 所筛选的菌株中乙酰短杆菌 (*Brevibacterium acetyllicum*) 酶活最高。发酵后离心的菌体用超声波破碎, 经多步纯化将酶比活提高了 700 倍,

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表明提纯的酶是均一的。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测得分子量31000,但用HPLC测得分子量为62000,表明乙酰短杆菌ALDC是由两个相同的亚基组成。等电聚焦测得其等电点为4.4。研究了底物的专一性,在所试验的各种氨基酸,酮酸和羧酸中, α -乙酰乳酸是仅有的底物,这与其它作者报道的ALDC除能催化 α -乙酰乳酸脱羧外还能催化 α -乙酰- α -羟基丁酸脱羧^[1-3]有所不同,亦有可能是其它作者对酶没有提纯或提纯不够,含有脱羧 α -乙酰- α -羟基丁酸的酶。该酶在pH5-8之间稳定,最适pH为6。最适反应温度约40℃,在45℃以下稳定,60℃以上迅速失活。在发酵培养基中加入0.005%ZnSO₄·7H₂O,在同样的发酵条件下,ALDC的活力可提高5倍。研究了多种金属离子和化合物对酶活的影响,Ca²⁺,Fe²⁺,Fe³⁺对酶活有一定的抑制作用,Zn²⁺对酶活几乎没有抑制,金属络合物,如8-羟基喹啉,邻苯二氮杂菲,二乙基二硫代氨基甲酸钠,抑制酶的活性,表明有金属可能包括在该酶的反应中。将提纯的酶用原子吸收光谱检测了在酶中可能存在的4种金属,铜、铁、锰和锌的含量,锌的值为38.2nmol/mg,相当于每个分子含1.22个锌原子,表明锌可能参与酶反应,这与Goldtfredsen等报道^[7]的一致。

(三) ALDC 氨基酸序列的测定

Sone等^[15]克隆了产气肠杆菌IPO13534ALDC基因,在*E. coli*中表达。活性测定表明ALDC基因位于1.4kb的BamHI-EcoRI片段上,测定了该片段的核苷酸序列,含有一个780个核苷酸的完整的蛋白编码区,从DNA序列推导了ALDC的260个氨基酸序列^[9]。产气肠杆菌ALDC在*E. coli*中的表达是在自身启动子的控制之下。

Svendensen等^[16]直接测定了短芽孢杆菌ATCC11031ALDC的全部氨基酸序列,并与产气肠杆菌的ALDC的氨基酸序列^[9]进行了比较。将提纯的短芽孢杆菌ALDC分别在一定的条件下用溴化氰,金黄色葡萄球菌V8蛋白酶和胰蛋白酶降解,分离肽片段,用氨基酸序列

分析仪测定完整的酶蛋白和水解的肽片段的氨基酸序列,用酸水解测定氨基酸的组成,从上述结果分析得出短芽孢杆菌ALDC的完整的260个氨基酸序列^[16]。从一级结构推测了二级结构,有54%的 α -螺旋和34%的 β -片层,表明是高度有序的。根据其氨基酸序列计算的分子量是29093,用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测得的分子量是35000,用凝胶过滤测得的分子量是70000,表明在自然状态下是以二聚体的形式存在,这与Ohshiro等报道的乙酰短杆菌ALDC的情况^[14]相同。短芽孢杆菌ALDC同产气肠杆菌ALDC有31%的同源性,有四个同源区,在N端的23个氨基酸残基和C端的15个氨基酸残基没有同源性。哪些氨基酸包括在催化功能中尚不清楚。

(四) ALDC 基因在细菌和酵母中的克隆和表达

Diderichsen等^[17]克隆了编码短芽孢杆菌ATCC11031ALDC的基因(aldB),分别在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中表达,在大肠杆菌中表达的ALDC是在细胞内,而在枯草芽孢杆菌中表达的ALDC,74%的活性在细胞外。测定了ALDC编码区及其边界区域的核苷酸序列,从DNA序列分析推导的氨基酸序列与直接测定的氨基酸序列^[16]是一致的。DNA和氨基酸序列表明aldB的初始翻译产物是从一个典型的24个氨基酸或27个氨基酸的信号肽开始的,短芽孢杆菌ALDC是胞外酶,但产气肠杆菌ALDC并无前导的信号肽序列,也没有报道产气肠杆菌ALDC能分泌到细胞外^[9,15]。短芽孢杆菌ALDC在枯草芽孢杆菌中表达产生的ALDC已用于制备该酶的衍生物和固定化的研究^[18]。

如前所述,用ALDC降低 α -乙酰乳酸的另一途径是将ALDC基因引入到啤酒酵母中表达。Sone等^[19]将产气肠杆菌IPO13534ALDC基因引入到啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)K1084中,在乙醇脱氢酶启动子控制下表达,从酵母和大肠杆菌的穿梭质粒YEp13建造含ALDC基因的表达载体,转化啤酒酵母,转化株

每毫克蛋白含 2—3 单位 ALDC。用转化株和亲株在实验室进行了对比发酵实验,用转化株发酵的啤酒的总双乙酰量(主要为 α -乙酰乳酸和双乙酰)比亲株的低得多,发酵能力、风味成份的含量无明显差别。

一般地说 YEp 质粒在非选择的条件下不能稳定保持在酵母细胞中,为了得到有稳定 ALDC 活力的酵母菌株, Fujii 等^[10]用含有核糖体 DNA (rDNA) 的 YIp 质粒(酵母整合质粒)将 ALDC 基因整合到啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*) IP00751 中。他们建造了新型的 YIp 质粒,含有产气肠杆菌 ALDC 基因,酵母乙醇脱氢酶启动子,组氨酸透性酶中止子,选择标记, rDNA 同源重组序列。酵母基因组中含有约 140 个串联重组的核糖体 DNA 基因,质粒可多拷贝整合到酵母染色体中。将转化菌株在非选择的条件下生长,分离出只保有 ALDC 表达盒而不含有不需要的载体序列的转化菌株,得到删除标记的转化子含有 20 个以上的 ALDC 基因拷贝,在非选择的条件下能稳定保持。进行了实验室规模的发酵实验,试验的两个转化株在主发酵后的啤酒中总双乙酰量分别比亲株减少 2/3 和 1/2。对比发酵实验还表明, ALDC 的多拷贝整合对酵母的生长速度和乙醇的生成能力没有影响。

Suihko 和 Blomqvist 等建造了含克氏杆菌(*Klebsiella terrigena*)或产气肠杆菌 ALDC 基因的啤酒酵母菌株^[11,12]。他们先将 ALDC 基因引入能在酵母中自动复制的质粒中,转化酵母菌株,50 升规模的发酵实验表明,用重组株发酵的总双乙酰含量比对照株的明显降低,以至可以省去熟化步骤。在发酵速度,酵母生长情况和絮凝沉降等方面,转化株和对照株基本相同。对试验的瓶装啤酒进行检测表明,用转化株生产的啤酒和对照株一样好,总发酵时间可从通常的五周缩短到二周。考虑到含有外源 DNA 的质粒在长期使用中不稳定,他们用基因置换的方法将上述两个细菌的 ALDC 基因转到酵母染色体中,分别在磷酸甘油激酶和乙醇脱氢酶启动子控制下表达。50 升规模的发酵试验

中,用磷酸甘油激酶整合的菌株,发酵终了双乙酰的量在标准值以下,不需熟化过程,用乙醇脱氢酶整合的菌株只需 4—5 天的熟化,比对照株减少 10 天。重组酵母菌株和对照酵母菌株生产的啤酒质量无明显差别。

细菌 ALDC 的基因在酵母中的表达并不影响酵母的生长和氨基酸的代谢,也不影响酵母风味的主要成份酯和杂醇的形成,这可能是因为表达的 ALDC 位于酵母的细胞质内,而缬氨酸的生物合成是在线粒体内,只有当不用于氨基酸生物合成的 α -乙酰乳酸从线粒体中参出到细胞质中才能被 ALDC 转变成乙偶姻,因此氨基酸的生物合成不会反向受影响。

(五) ALDC 衍生物的制备和固定化

ALDC 的主要应用是在碳水化合物发酵,特别是啤酒的制造中防止双乙酰的形成。麦芽汁发酵生产啤酒的 pH 值在 3.8—4.7,大多数自然界中存在的 ALDC 的最适 pH 值在 6 左右,而在啤酒生产的 pH 值下的酶活对实际应用来说是太低了,从而限制了 ALDC 的工业应用。Pedersen^[18]将 ALDC 进行化学改性,可将最适 pH 值降低,并在低 pH 值较自然酶有更高的稳定性。方法是在水基质中用戊二醛处理 ALDC,得到可溶的 ALDC 的戊二醛衍生物,在 pH4 测定,ALDC 衍生物的活性和稳定性都比未处理的酶增加。ALDC 衍生物可以制成水溶性和固定化两种形式使用。例如啤酒批式发酵试验中,分别将水溶的 ALDC 戊二醛衍生物和未处理的 ALDC 同酵母一起加入,12 C 发酵 7 天,每天测定 ALDC 的残留量和总双乙酰量,结果表明 ALDC 衍生物比未处理的 ALDC 稳定,加入化学改性的 ALDC 衍生物的发酵液的总双乙酰量较加入未处理的 ALDC 的总双乙酰量低得多,ALDC 衍生物可制成固定化酶,在批式发酵中同酵母一起使用,或将固定化酶和固定化酵母一起包埋,在连续发酵中使用。

除用于啤酒生产外,ALDC 亦可用于葡萄汁发酵生产葡萄酒时降低双乙酰量,此外还可用于酒精生产,双乙酰在工业酒精生产中是很

(下转第 316 页)

有害的,特别是在制造无水乙醇时,用苯共沸法使乙醇脱水,双乙酰会在苯中积累,使苯的回收困难^[8]。

丹麦诺沃公司已有 ALDC 出售,北京啤酒厂用于啤酒生产效果良好,可缩短啤酒熟化期。国内的研究如能形成规模生产,将为我国酶制剂工业增添新酶种和满足啤酒等工业的需要。

参 考 文 献

1. Juni E; *J. Biol. Chem.*, **195**:715-726, 1952.
2. Løken J P et al.; *Eur. J. Biochem.*, **14**(1): 133-137, 1970.
3. Godtfredsen S E et al.; *Carlsberg Res. Commun.*, **47**(2): 93-102, 1982.
4. Wainwright T et al.; *J. Inst. Brew.*, **79**:451-470, 1973.
5. Godtfredsen S E et al.; *Carlsberg Res. Commun.*, **48**: 329-347, 1983.
6. Godtfredsen S E et al.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**:23

- 28, 1984.
7. Godtfredsen S E et al.; *Carlsberg Res. Commun.*, **49**(1): 69-74, 1984.
8. Godtfredsen S E et al.; *Pat. Appl.* EP0046066, 1982.
9. Sone H et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(1): 38-42, 1988.
10. Fujii T et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(4): 997-1003, 1990.
11. Suihko M I et al.; *J. Biotechnol.*, **14**:285-300, 1990.
12. Blomqvist K et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(10): 2796-2803, 1991.
13. Olsen F et al.; *Pat. Appl.* EP0128714, 1988.
14. Ohshiro T et al.; *Agric. Biol. Chem.*, **53**(7): 1913-1918, 1989.
15. Sone H et al.; *J. Biotechnol.*, **5**(1):87-91, 1987.
16. Svendsen I et al.; *Carlsberg Res. Commun.*, **54**(4):157-163, 1989.
17. Diderichsen B et al.; *J. Bacteriol.*, **172**(8):4315-4321, 1990.
18. Pedersen S; *Pat. Appl* WO 92/03543, 1992.

(1992-12-03 收稿)