

# $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的研究

陈 炜 何秉旺

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

杨家兴 郑仰民 郑宝华

(北京啤酒厂, 北京 100022)

**摘要** 从细菌中筛选出 14 株  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶产生菌。从其中的一株  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶产生菌提取

---

北京市自然科学基金项目

1993-04-14 收稿

粗酶,将粗酶样品分别加到主发酵的啤酒和主发酵后的啤酒中,在两种情况下均能明显降低啤酒中的总双乙酰量。

**关键词**  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶,  $\alpha$ -乙酰乳酸, 双乙酰

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 ( $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, ALDC, EC. 4.1.1.5) 催化  $\alpha$ -乙酰乳酸 ( $\alpha$ -acetolactate) 脱羧后形成乙偶姻 (acetoin, 3-羟基-2-丁酮) 和  $\text{CO}_2^{[1]}$ , 已在多种细菌中发现 ALDC<sup>[2]</sup>。

在啤酒和葡萄酒的发酵中,作为缬氨酸合成中间产物的  $\alpha$ -乙酰乳酸能从酵母细胞中渗出,在细胞外非酶氧化脱羧产生双乙酰 (diacetyl), 双乙酰对酒的口味有不良影响。双乙酰可为酵母细胞中的酶还原为乙偶姻和 2,3-丁二醇,这两种物质对啤酒的风味几乎无影响。 $\alpha$ -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧比双乙酰被还原的速度慢得多 (后者约为前者速度的 10 倍),是啤酒熟化过程中的时间限制因素。如果在啤酒的熟化阶段  $\alpha$ -乙酰乳酸不能充分除去,在随后的包装、杀菌过程中就会有较多的双乙酰形成,影响啤酒风味。如添加  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶则可将  $\alpha$ -乙酰乳酸直接脱羧形成乙偶姻,而不经形成双乙酰的步骤,从而缩短啤酒的熟化期<sup>[3-5]</sup>。

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶首先由 Juni<sup>[1]</sup> 在产气杆菌中发现,以后由 Løken 等<sup>[6]</sup>进行了提纯。Godfredsen 等首先报导用 ALDC 可加速啤酒的熟化<sup>[3]</sup>,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。

我们从细菌中筛选到十几株 ALDC 产生菌,从其中的一株地衣芽孢杆菌中提取粗酶,用于啤酒中降低总双乙酰的实验,表明在前酵和后酵的啤酒中对加快降低总双乙酰均有一定的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

为我所细菌分类组、菌种保藏室和其它课题组提供。

### 1.2 培养基和培养条件

普通牛肉汁琼脂斜面培养基,接种后在 30℃ 温箱中培养 1—2 天。

液体培养基(%):牛肉汁 50,蛋白胨 0.5,柠檬酸 0.5,葡萄糖 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005,用 NaOH 调 pH 值到 6.5,0.55kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟,接种后在 30℃ 的旋转式摇床上 (220r/min) 振荡培养。

### 1.3 底物、化学试剂和啤酒样品

检测酶活用的反应底物  $\alpha$ -乙酰乳酸用  $\alpha$ -乙酰乳酸的双酯,2-乙酰氧基-2-甲基-乙酰乙酸乙酯 (Aldrich 产品) 经 NaOH 水解制备,配制在 pH 6.0 的 0.05mol/L 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES, sigma 产品) 中。底物的配制须在使用之前进行。

制标准曲线用的乙偶姻为 Aldrich 产品。配制显色剂用的肌酸 (creatine) 为上海化学试剂分装厂出品 (E. Merck 进口分装)。 $\alpha$ -萘酚为北京化学试剂三厂出品,分析纯。其它化学试剂均为分析纯。

啤酒样品取自北京啤酒厂生产中的主发酵前期和主发酵终了时 (主发酵 9 天) 的啤酒。

### 1.4 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶酶活测定方法

用 Voges-proskauer (VP) 反应测定酶反应中生成的乙偶姻的量<sup>[8]</sup>。ALDC 脱羧  $\alpha$ -乙酰乳酸产生的乙偶姻在碱性条件下与肌酸和  $\alpha$ -萘酚的混合物反应生成红色,在一定的范围内生成的红色物质的光吸收同乙偶姻的量成正比。按 Løken<sup>[6]</sup>和 Olsen<sup>[7]</sup>的方法测定酶活。

反应总体积 400 $\mu$ l:200 $\mu$ l 新配制的底物 (含  $\alpha$ -乙酰乳酸 1.92 $\mu$ mol),200 $\mu$ l 用缓冲液适当稀释的酶样 (稀释酶样的缓冲液为:0.05mol/L MES, pH6.0, 0.6mol/L NaCl。

0.05% 布里剂 35), 混匀后于 30℃ 水浴中保温 20 分钟, 加入 4.6ml 显色剂 (显色剂为 0.1% 肌酸, 1%  $\alpha$ -萘酚, 溶于 1mol/L NaOH 中, 在使用前配制), 以中止反应和显色, 混匀后在室温 (约 15—20℃) 放置 50 分钟, 在 72 型分光光度计上 522nm 处测 OD 值, 根据 OD 值计算酶活。一个酶活单位为在上述条件下由  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶脱羧  $\alpha$ -乙酰乳酸每分钟产生 1 $\mu$ mol 乙偶姻的酶量。

### 1.5 啤酒中总双乙酰量的测定

按啤酒工业手册<sup>[9]</sup>的方法测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 产 ALDC 菌种的筛选

菌种接种于牛肉汁琼脂斜面上, 30℃ 温箱中培养 24—48 小时后转接于含 5ml 液体培养基的大试管中, 摇床上振荡培养 21—24 小时, 离心收集菌体, 用 0.85% 的 NaCl 洗涤菌体, 悬于 2ml 0.85% 的 NaCl 中, 在冰水浴中用超声波间断破碎菌体约 5 分钟 (约破碎 6 次, 每次 15—20 秒) 用测定缓冲液适当稀释后测定酶活。

共筛选 34 株菌, 其中 17 株地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 16 株短芽孢杆菌 (*B. brevis*), 1 株乙酰短杆菌 (*Brevibacterium acetylicum*), 有 14 株菌有明显的 ALDC 活性, 其中 12 株为地衣芽孢杆菌, 1 株短芽孢杆菌, 1 株乙酰短杆菌, 表明地衣芽孢杆菌中产 ALDC 的菌的比例较高, 这与 Godfredsen 等<sup>[2]</sup>报导的基本一致。表 1 为部分菌的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的酶活。其中地衣芽孢杆菌 16 号酶活较高 (0.25u/ml)。Olsen<sup>[7]</sup>等报道的地衣芽孢杆菌 A446 在最适发酵时间的酶活为 0.44u/ml。

### 2.2 粗酶样品的提取

地衣芽孢杆菌 16 号菌接种于牛肉汁斜面后 30℃ 培养 24 小时, 转接于含 50ml 液体培养基的 250ml 三角瓶中, 摇床上振荡培养 24 小时作为种子, 按 4% 接种量接种液体培养基, 摇床上振荡培养 21 小时, 用冷冻离心机

表 1 产  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的菌株和酶活

菌名称和菌号	酶活力 (u/ml)
地衣芽孢杆菌 6 号	0.026
地衣芽孢杆菌 7 号	0.135
地衣芽孢杆菌 8 号	0.106
地衣芽孢杆菌 10 号	0.17
地衣芽孢杆菌 11 号	0.072
地衣芽孢杆菌 13 号	0.068
地衣芽孢杆菌 14 号	0.026
地衣芽孢杆菌 15 号	0.115
地衣芽孢杆菌 16 号	0.25
地衣芽孢杆菌 17 号	0.11
乙酰短杆菌 132 号	0.046
短芽孢杆菌 134 号	0.089

4℃ 离心收集菌体, 菌体用 0.85% 的 NaCl 洗涤, 将洗后的菌体悬于 0.85% NaCl 中, 在冰浴中超声波间断破碎细胞 3 小时, 离心除去细胞碎片, 上清液加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4℃ 冰箱中放置过夜, 离心 (9000r/min) 20 分钟收集沉淀, 溶解后测定酶活。从 1000ml 发酵液的菌体中回收 85.8 单位的 ALDC。

### 2.3 ALDC 加入啤酒中降低总双乙酰的试验

2.3.1 酶加入主发酵啤酒试验: 取北京啤酒厂大罐发酵的加酵母后第 2 天的麦芽汁, 加入上述粗提的 ALDC, 加酶量为 80u/L, 同时用不加酶的样品作对照, 两者均于 10℃ 温箱中放置, 从第 2 天连续 5 天取样测定啤酒中总双乙酰量 (每次取样 100ml), 表 2 为前酵啤酒加酶和不加酶的样品的总双乙酰量测定结果。

表 2 ALDC 对前酵啤酒总双乙酰量的影响

检测天数		1	2	3	4	5
总双乙酰量 (ppm)	加酶	0.17	0.20	0.20	0.21	0.18
	不加酶	0.24	0.27	0.24	0.31	0.28

2.3.2 酶加入后酵啤酒的试验: 取主发酵接近终了时发酵池中的啤酒, 加入上述粗提的 ALDC, 加酶量为 80u/L, 同时用不加酶的样品作对照, 两者均于 10℃ 温箱中放置, 从第 2 天连续 3 天取样测定啤酒中总双乙酰量 (每次取样 100ml), 表 3 为后酵啤酒加酶和不加酶样品的总双乙酰量测定结果。

表3 ALDC对后酵啤酒总双乙酰量的影响

检测天数		1	2	3
总双乙酰量 (ppm)	加酶	0.18	0.15	0.14
	不加酶	0.26	0.42	0.38

上述结果看出,从地衣芽孢杆菌16号菌提取的ALDC对降低前酵和后酵啤酒的总双乙酰量均有一定的效果,对后酵啤酒效果尤为明显。啤酒中的总双乙酰主要为 $\alpha$ -乙酰乳酸和双乙酰,此外也有少量的 $\alpha$ -乙酰- $\alpha$ -羟基丁酸和2,3-戊二酮。由于在有酵母存在的情况下 $\alpha$ -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧生成双乙酰的速度比双乙酰被还原的速度慢得多,因此在有酵母存在时测得的总双乙酰中大部分应为 $\alpha$ -乙酰乳酸。当然啤酒中双乙酰的来源很复杂<sup>[10]</sup>,除 $\alpha$ -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧外还有少量的其它来源。

ALDC除用于啤酒生产外,还可用于葡萄汁生产葡萄酒时降低双乙酰量,也可用于酒精

生产中。国内尚未见有关ALDC研究的报道。

## 参 考 文 献

- [1] Juni E J. *Biol Chem*, 1952, **195**: 715—726.
- [2] Godtfredsen S E *et al.* *Carlsberg Res Commun*, 1983, **48**: 239—247.
- [3] Godtfredsen S E *et al.* *Carlsberg Res Commun*, 1982, **47** (2): 93—102.
- [4] Godtfredsen S E *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, **20**: 23—28.
- [5] Godtfredsen S E *et al.* *Carlsberg Res Commun*, 1984, **49** (1): 69—74.
- [6] LØken J P *et al.* *Eur J Biochem*, 1970, **14** (1): 133—137.
- [7] Olsen F *et al.* *Pat Appl.* 1988, EP0128714.
- [8] Westerfeld W W J *Biol Chem*, 1945, **161**: 495—502.
- [9] 管敦仪主编. *啤酒工业手册* (中册). 北京轻工出版社, 1985, 234.
- [10] Wainwright T *et al.* *J Inst Brew.* 1973, **79**: 451—470.