

温度对嗜冷酵母糖代谢途径某些关键酶的活性效应*

辛明秀 周培瑾**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 对嗜冷酵母 Y18 和酿酒酵母细胞中 EMP 途径和 TCA 循环中一些关键酶的温度特性进行了比较研究。Y18 细胞中, α -1,6-二磷酸果糖醛缩酶、琥珀酸脱氢酶和己糖激酶对温度很敏感, 符合 Feller 提出的冷活性的概念属于冷活性酶类。柠檬酸合成酶的温度特性类似于中温酶。 α -酮戊二酸脱氢酶存在不同温度特性的同工酶。通过对嗜冷酵母和中温酵母细胞中琥珀酸脱氢酶的 K_m 值进行比较, 结果显示嗜冷酵母琥珀酸脱氢酶在 20℃ 具有较低的 K_m 值。另外还对嗜冷菌细胞中代谢酶类的一些特点进行了讨论。

关键词 嗜冷酵母, 中温酵母, 最适温度, 酶的热稳定性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)05-0518-22

温度是微生物生命活动中重要的环境因子之一, 它直接或间接影响微生物的生命活动。嗜冷菌能在 0℃ 甚至零度以下生活, 最适生长温度不超过 15℃, 最高生长温度低于 20℃。这类微生物以生理机制适应低温环境。EMP 途径和 TCA 循环维持微生物生命活动的基本碳代谢和能量代谢途径, 研究这些代谢途径中的关键酶类对于揭示嗜冷菌适应低温的机制具有重要意义。许多研究表明嗜冷菌的最高生长温度是由于它们的一些酶类对热的敏感性。Purohit 发现当嗜冷细菌于 46℃ 热处理 1h 其细胞色素 C 氧化酶完全失活, 而中温菌在此条件则不受影响^[1]。有人认为嗜冷菌隐球酵母不能在 30℃ 以上生存可能是由于顺乌头酸酶和延胡索酸酶的热失活^[2]。嗜冷海洋弧菌细胞中的苹果酸脱氢酶在 30℃ 失活, 而这个温度恰好是该菌的最高生长温度^[3]。虽然对嗜冷菌的代谢酶类进行了一些研究, 但对同一株嗜冷菌的多种酶类与中温菌的相应酶类进行比较研究在国内和国外尚未见报道。本研究对于全面了解嗜冷菌细胞内的酶学特性以及理解嗜冷菌的适低温机理具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种

嗜冷酵母 Y18 本室从南极土壤分离, 能在 0℃ 生长繁殖, 其最适和最高生长温度分别为 10℃ 和 18℃。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AS2.1882, ATCC 18824); 中温菌, 由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。

* 国家自然科学基金重点资助课题(39870014)

** 联系人 (微生物资源前期开发国家重点实验室)

作者简介: 辛明秀 (1958-), 男 (汉族), 河北涞源县人, 现北京师范大学生命科学院讲师, 博士

收稿日期: 1999-07-16, 修回日期: 1999-11-22

1.2 YEPD 培养基

酵母粉 1% ,葡萄糖 2% ,蛋白胨 % ,NaCl 0.2% ,自然 pH。

1.3 酶液提取

活化菌种接种于 YEPD 培养基中 ,Y18 于 10℃ 培养 60 h ,酿酒酵母于 28℃ 培养 20 h。离心收集细胞 ,加少量磷酸缓冲液(0.05mol/L ,pH7.6)冰浴研磨破碎细胞 ,离心(10 000 xg ,30min)上清即为待测酶液。

1.4 分析方法

己糖激酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、1,6-二磷酸果糖醛缩酶和柠檬酸合成酶活力测定按文献 [4] ,琥珀酸脱氢酶活力测定按文献 [5] , K_m 测定按文献 [6] ,酶的热稳定性分析按文献 [7]。

2 结果

2.1 己糖激酶

己糖激酶催化葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖。后者在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下使 NADP 还原为 NADPH , H^+ ,利用 340nm 光吸收值的增加测定酶活性。Y18 的己糖激酶在 30℃ 具有最大活性 ,酿酒酵母在 35℃ 具有最大活性(图 1-a)。这与酿酒酵母中此酶的最适温度范围为 35~40℃ 的报道是相符的^[8]。酶的热稳定性见图 1-b。40℃ 处理 20min 后 Y18 细胞中的酶活性迅速降低 ,处理 30min 酶活力损失近 70%。而酿酒酵母中的酶活性则缓慢降低 ,处理 30 分钟后酶活力只损失 45%。说明 Y18 细胞中的己糖激酶对温度敏感。

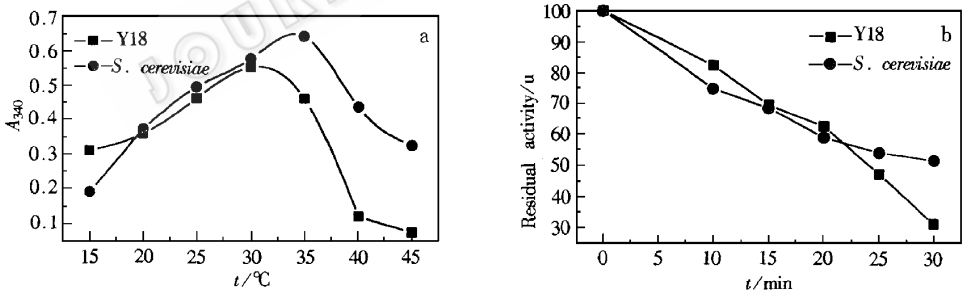


图 1 温度对嗜冷酵母 Y18 和酿酒酵母己糖激酶活性的影响 (a) 和酶的热稳定性 (b)

Fig. 1 The effect of temperature on the activity (a) and the thermostability of hexokinase (b)

2.2 1,6-二磷酸果糖醛缩酶

此酶催化 1,6-二磷酸果糖裂解为 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮。后者转化为 α -甘油-磷酸 ,使 NADH 氧化为 NAD ,利用 340nm 吸光率的减量测定酶活性。Y18 产生的此酶在 25℃ 表现出最大活性 ,超过 25℃ 酶的活性迅速降低 ,酿酒酵母此酶在 30~35℃ 之间表现出较高的活性(图 2-a)。Y18 于 40℃ 热处理 10min 酶活力损失 90%。酿酒酵母于 40℃ 热处理 30min 后尚保持 85% 的酶活力(图 2-b)。这与嗜冷海洋弧菌醛缩酶热稳定性的报道是一致的^[9]。

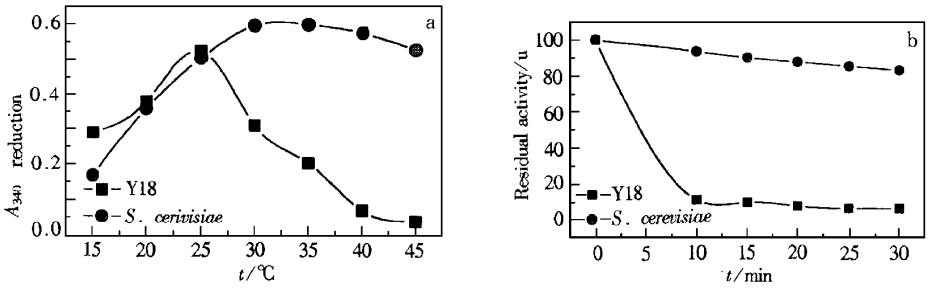


图2 温度对嗜冷酵母 Y18 和酿酒酵母醛缩酶活性的影响 (a) 和酶的热稳定性 (b)

Fig.2 The effect of temperature on the activity (a) and the thermostability of aldolase (b)

2.3 柠檬酸合成酶

柠檬酸合成酶催化三羧酸循环的起始步骤柠檬酸的合成。反应中形成的硫醇盐 (mercaptide) 离子可通过测定 412nm 的光吸收而测定。嗜冷酵母 Y18 细胞中此酶在 30°C 具有最大活性 (图 3-a)。酶液于 40°C 处理 30min 后仍然保持 60% 的酶活力 (图 3-b)。说明 Y18 细胞中的柠檬酸合成酶是一个对热不十分敏感的酶, 类似于中温酶的温度特性。Gerike 等对南极细菌柠檬酸合成酶进行了研究发现此酶对热敏感, 且在 10°C 以下显示出很高活力^[10]。

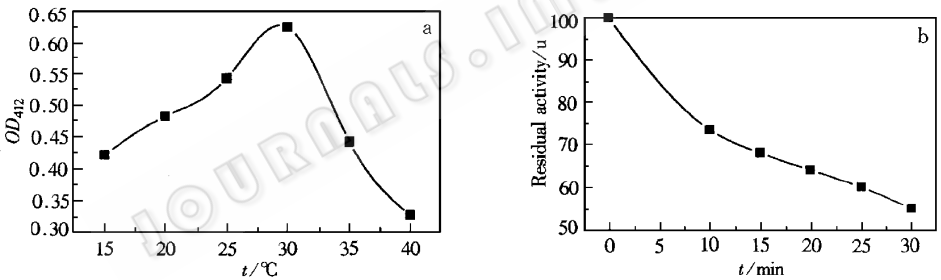


图3 温度对嗜冷酵母 Y18 柠檬酸合成酶活性的影响 (a) 和酶的热稳定性 (b)

Fig.3 The effect of temperature on the activity (a) and the thermostability of citrate-synthase (b)

2.4 α -酮戊二酸脱氢酶

α -酮戊二酸脱氢酶复合体由三个酶组成, 即 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酰转移酶和二氢硫辛酸脱氢酶。通过检测 NADH 的形成来测定酶复合体的活性。Y18 细胞中此酶在 20°C 和 40°C 显示出两个活力峰, 且 20°C 处的活力峰略高, 而酿酒酵母细胞中此酶只在 35°C 表现最高活力 (图 4-a)。当酶液于 35°C 处理 30min 后再于 20°C 测定酶活力, 发现 Y18 细胞中的酶液在 20°C 处的活力峰消失 (图 4-b), 说明嗜冷酵母 Y18 的细胞内可能存在具有不同温度特性的 α -酮戊二酸脱氢酶同功酶。酿酒酵母酶液经此处理后酶的活性无明显改变。具有不同温度特性的同功酶首先是在嗜冷弧菌中发现的 NADP⁺ 异柠檬酸脱氢酶同功酶^[11]。即同功酶 I 的特异活性范围在 35°C ~ 40°C, 同功酶 II 的特异活性在 20°C。

2.5 琥珀酸脱氢酶

琥珀酸脱氢酶存在于原核生物的细胞膜上和真核生物的线粒体内膜上, 在传递氢和

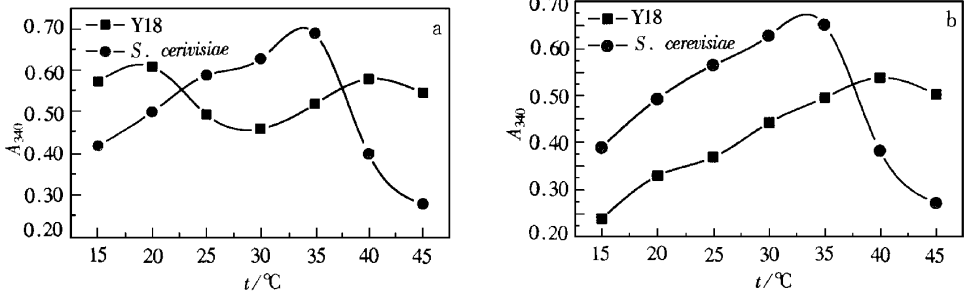
图 4 温度对 α -酮戊二酸脱氢酶活性的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase
a, Native; b, 35°C 30min.

电子过程中起重要作用。Y18 细胞中琥珀酸脱氢酶在低温范围内具有很高的酶活性,以琥珀酸为底物时,酶的最适反应温度为 20°C,而酿酒酵母此酶的最适反应温度为 40°C(图 5-a)。Y18 酶液于 40°C 处理 10min 酶活力损失 80%,而酿酒酵母在同样条件下只损失 20% 酶活力(图 5-b)。于 20°C 测定酶的 K_m 值, Y18 细胞中的酶为 0.07mmol/L,而酿酒酵母细胞中的酶则为 0.16mmol/L。这说明 Y18 细胞中的琥珀酸脱氢酶在低温时结合底物的能力要高于来自中温菌中的同种酶。这和 Kristjansson 研究冷活性枯草杆菌素类蛋白酶的结果是一致的^[12]。

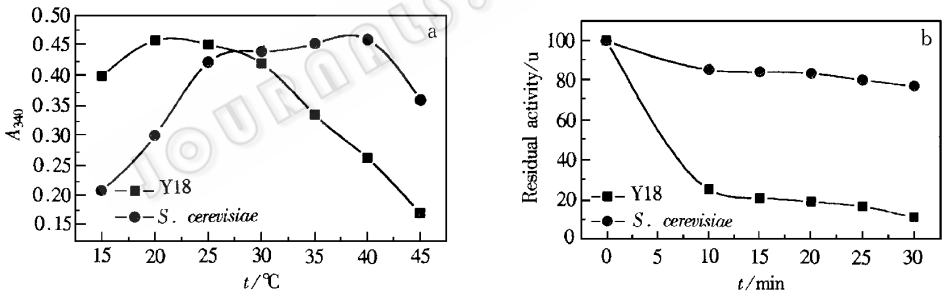


图 5 温度对嗜冷酵母 Y18 和酿酒酵母琥珀酸脱氢酶活性的影响(a)和酶的热稳定性(b)

Fig. 5 The effect of temperature on the activity(a) and the thermostability of succinate dehydrogenase(b)

3 讨论

从上述结果可知,嗜冷菌细胞中的代谢酶类在低温范围内(0°C~30°C)表现出最大活性,且对温度敏感,这与 Feller 对冷活性酶的解释是一致的^[13]。但这些冷活性酶在低温范围内的最大活性表现出一定的差异,如琥珀酸脱氢酶、醛缩酶、柠檬酸合成酶和己糖激酶的最大活性分别在 20、25 和 30°C。另外这些酶对热的敏感性也存在一定差异,如柠檬酸合成酶于 40°C 热处理 30min 酶活力仍然保持 60%,说明它是一个对热不十分敏感的酶。这些冷活性代谢酶类在低温范围内的较高的酶活性对于维持其低温环境时的生命活动是必需的。

与中温菌的相对酶类比较,嗜冷菌细胞中的代谢酶类的温度活性范围向低温移动。如己糖激酶、醛缩酶和琥珀酸脱氢酶,酿酒酵母细胞中的同类酶相比其最大活性温度分

别降低了 5、5~10 和 20℃。

嗜冷菌细胞中的有些代谢酶类较中温菌在低温条件下具有较低的 K_m , 这反应了嗜冷菌细胞中的酶类在低温下具有较强的底物亲和力, 这可能是嗜冷菌细胞中代谢酶类在低温条件下发近挥有效催化作用的前提。

嗜冷菌细胞中有些代谢酶类可能以不同温度特性的同功酶方式存在, 这可能是嗜冷菌适应低温环境的独特方式。

参 考 文 献

- [1] Purohit K, Stokes J L. *J Bacteriol*, 1967 **93** (1):199~206.
- [2] Hagen P O, Rose A H. *J Gen Microbiol*, 1962 **27** :89~99.
- [3] Burton S D, Morita R Y. *J Bacteriol*, 1963 **86** :1019~1024.
- [4] Norris J R, Ribbons D W. *Methods in Microbiology* (Volume 6A). London and New York :Academic Press, 1971. 411~439.
- [5] Dickie P, Weiner J H. *Can J Biochem*, 1979 **57** :813~821.
- [6] 李建武, 肖能斌, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 327~333.
- [7] 朱 俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等. 生物化学实验. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 217~220.
- [8] Abrahao-Neto J, Infanti P, Vitolo M. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996 **57**~**58** :407~412.
- [9] Jones L P, Morita R Y, Becker R R. *Z Allg Mikrobiol*, 1979 **19** (2):97~106.
- [10] Gerike U, Danson M J, Russell N J, et al. *Eur J Biochem*, 1997 **248** (1):49~57.
- [11] Ochiai T, Fukunaga N, Sasaki S. *J Biochem*, 1979 **86** :377~384.
- [12] Kristjansson M M, Magnusson O T, Gudmundsson H M, et al. *Eur J Biochem*, 1999 **260** (3):752~760.
- [13] Feller G, Narinx E, Arpigny J L, et al. *FEMS Microbiol Rev*, 1996 **18** :189~202.

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES REPRESENTATIVE OF EMP PATHWAY AND TCA CYCLE IN PSYCHROPHILIC YEAST*

Xin Mingxiu Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract : Some key enzymes of EMP pathway and TCA cycle in a psychrophilic yeast Y18 were studied in this paper compared with those of *Saccharomyces cerevisiae*. The results indicated that fructose 1,6-bisphosphate aldolase, succinate dehydrogenase, and hexokinase in Y18 were very thermostable and have high activity at low temperature. These enzymes belong to cold-active enzymes. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase existed possibly in isoenzyme which had different temperature characteristics. Citrate synthetase was very similar in temperature characteristics to that of mesophiles. The K_m value of succinate dehydrogenase both from Y18 and *S. cerevisiae* were studied and Some features of enzyme in psychrophiles were also discussed in this paper.

Key words : Psychrophilic yeast, Mesophilic yeast, Optimal temperature, Thermostability