

酿酒酵母在高渗条件下分泌蛋白的研究

姜宗豹^{1,2}, 苗君¹, 赵睿¹, 栾静¹, 赵长新¹

(1.辽宁省发酵工程重点实验室,大连工业大学生物与食品工程学院,辽宁 大连 116034;

2.华润雪花啤酒(朝阳)有限公司,辽宁 朝阳 122000)

摘要: 以酿酒酵母 2144 为研究对象,利用不同葡萄糖浓度的 YNB(全氨基酸)培养基,通过 Sephadex G-25 和 Sephadex G-75 分离酵母胞外分泌蛋白,最后采用 SDS-PAGE 进行分析。结果表明,高糖浓度下 16 h 分泌蛋白出现了高分子量蛋白,经 SDS-PAGE 测定分子量为 53 KDa 与酵母蛋白酶 A 酶原分子量一致,分泌的低分子量蛋白与正常对照组差异性很大。

关键词: 酿酒酵母; 高渗条件; 分泌蛋白

中图分类号:TS261.1;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)05-0022-04

Study on Protein Secretion from *Saccharomyces Cerevisiae* Under High Osmotic Pressure

JIANG Zong-Bao^{1,2}, MIAO Jun¹, ZHAO Rui¹, LUAN Jing¹ and ZHAO Chang-xin¹

(1. Key Lab of Fermentation Engineering of Liaoning Province, School of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034; 2. Huarun Snow Beer Co. Ltd., Chaoyang, Liaoning 122000, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* 2144 was cultured in YNB culture medium of different glucose concentration. The secreted protein from *Saccharomyces cerevisiae* was separated by Sephadex G-25 and Sephadex G-75, and then analyzed by SDS-PAGE. The results showed that high molecular weight protein was secreted at 16 h under high concentration of glucose, and SDS-PAGE indicated that the protein molecular weight was 53KDa, the same as yeast protein A zymogen. However, low molecular weight proteins were quite different from normal series in contrast groups.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; high osmotic pressure; protein secretion

酿酒酵母广泛应用于发酵和酿造工业。生产中酵母常受工艺操作条件的影响,酵母细胞会经受很多应激反应,其中包括氧化、营养限制、厌氧、渗透、低 pH、过量 CO₂ 和有毒代谢物(如酒精)的积累等^[1]。目前,高浓度啤酒发酵由于其可节省能源,提高啤酒产量,降低能耗及生产成本已成为啤酒发酵研究的一大热点课题^[2]。酵母为适应环境变化胞内出现应激蛋白,与此同时也会分泌胞外蛋白作为一种信号载体或分泌蛋白酶来应对环境的变化^[3~6]。但国内外相关研究文章却很少。因此,为了揭示酵母在高渗条件下的应答机理,对分泌蛋白的研究有助于揭示生命活动的分子机制,并对发酵行业具有重要的意义^[7]。

为了揭示高渗作用机制,本文以葡萄糖作为渗透剂,通过选取不同糖浓度,YNB 培养基(排除培养基中蛋白干扰)培养,研究了高渗胁迫下酿酒酵母的胞外分泌蛋白

变化,并从蛋白水平上阐述了高渗条件对酵母代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

酿酒酵母 2144 为大连工业大学生物与食品学院保藏。

1.1.2 供试培养基

YNB 培养基:葡萄糖 20 g/L, YNB(W/O)6.7 g/L, L-His 10 mg/L, DL-Met 20 mg/L, L-Try 20 mg/L, pH 6.0; 115 °C 灭菌 20 min。

① YNB 2% 葡萄糖,正常对照;

② YNB 10% 葡萄糖组;

③ YNB 20% 葡萄糖组。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划 项目编号 2007BAK36B01。

收稿日期:2009-04-13

作者简介:姜宗豹(1976-),辽宁省建平县人,在读硕士研究生,高级工程师,研究方向:酵母代谢机理。

通讯作者:赵长新(1955-)教授,硕士生导师,酵母代谢研究,电话:13591128134;email:zhaochangxin@126.com。

1.1.3 仪器

全温落地式摇床,Hitachi G21 高速冰冻离心机,2KBTES-55 真空冷冻干燥机,Virtis USA,BSZ-100 自动部分收集器,Unic-7200 可见分光光度计,UV755B 紫外分光光度计,垂直板电泳仪。

1.2 方法

1.2.1 高渗透条件下酵母菌株的生长曲线

酵母菌株 2144 接种于 YNB 液体培养基中,30 °C、160 r/min 下振荡培养 21 h,制备处于对数生长期的细胞悬浊液。按 2%(体积比)的接种量接种于 1.1.2 供试验培养基①、②、③号培养基中,30 °C、230 r/min 下在往复振荡摇床上培养 24 h,每隔 2 h 取样测定吸光值 OD_{600nm}。

1.2.2 酵母分泌蛋白的制备

收集培养 8 h、16 h 的酵母发酵培养液,于 4 °C、2640×g 离心 10 min,取上清液冷冻干燥得发酵液冻干粉,用超纯水使其溶解,经过 0.2 μm 的微孔滤膜过滤,即得到层析用样品液^[8~9]。

1.2.3 蛋白收集洗脱条件

通过 Sephadex G-25 和 Sephadex G-75 柱(16 mm×400 mm)层析,采用 pH 5.8 的 0.1 mol/L 乙酸铵溶液进行洗脱。自动部分收集器收集,用蠕动泵控制层析柱的流速为 3 mL/7 min 开始层析,流出液分管收集,每管收集 3 mL。并在紫外监测器 280 nm 处检测,测定出洗脱液吸收峰。

1.2.4 SDS-PAGE 分析

Sephadex G-75 峰值管收集后冷冻干燥,使用流动相乙酸铵复溶蛋白,采用 Bradford 法^[10~11]测量样品蛋白质含量。

按照 Laemmli 的 SDS-PAGE 方法^[12],用浓缩胶 5%,分离胶 12%,考马斯亮蓝 R-250 染色,醋酸-甲醇体系脱色。

2 结果与分析

2.1 高渗透条件下酵母菌株的生长曲线

不同葡萄糖浓度下对细胞生长的影响结果见图 1。

由图 1 可知,随着葡萄糖浓度的增加,细胞的对数期时间延长。对照组在 0~8 h 时处于对数生长期,12 h 后进入稳定期。与对照组相比,10%葡萄糖组、细胞的对数期延长的同时,0~12 h 处于对数期,16 h 后生长量超过对照组;而当葡萄糖浓度达到 20%时,细胞在 0~20 h 时都处于对数期,12~20 h 还有二次生长现象,20 h 后生物量超过对照组,但低于 10%组。

因为酵母对高渗条件的适应发生在对数生长期,依据生长曲线,采用分泌蛋白取样时间为 8 h 和 16 h。

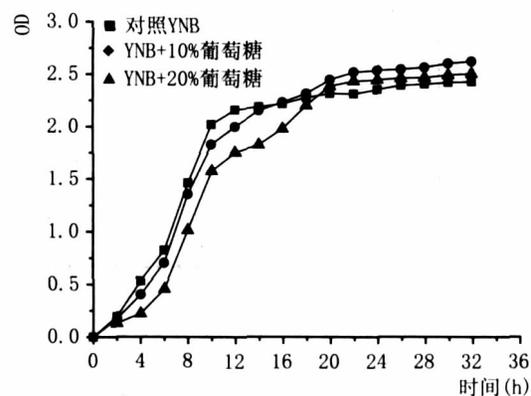


图 1 不同葡萄糖浓度下对细胞生长的影响

2.2 Sephadex G-25 分离酵母在不同葡萄糖浓度下的分泌蛋白

Sephadex G-25 分离 2%葡萄糖浓度 YNB 对照组培养 8 h 时分泌蛋白图谱结果见图 2, Sephadex G-25 分离 2%葡萄糖浓度 YNB 对照组培养 16 h 时分泌蛋白图谱的结果见图 3, Sephadex G-25 分离 10%葡萄糖浓度 YNB 培养 8 h 时分泌蛋白图谱结果见图 4, Sephadex G-25 分离 10%葡萄糖浓度 YNB 培养 16 h 时分泌蛋白图谱结果见图 5, Sephadex G-25 分离 20%葡萄糖浓度 YNB 培养 8 h 时分泌蛋白图谱结果见图 6, Sephadex G-25 分离 20%葡萄糖浓度 YNB 培养 16 h 时分泌蛋白图谱结果见图 7。

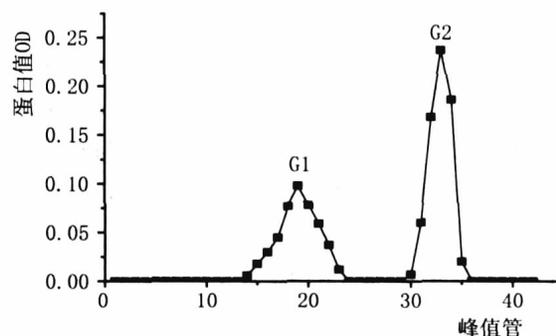


图 2 Sephadex G-25 分离 2%葡萄糖浓度 YNB 对照组培养 8 h 时分泌蛋白图谱

由图 2 可知,酵母在 2%葡萄糖浓度下生长 8 h 时,洗脱曲线中出现 2 个峰,G1 号峰值管为 19,OD 值为 0.098;G2 号峰值管为 33,OD 值为 0.237。

由图 3 可知,酵母在 2%葡萄糖浓度下生长 16 h 时,洗脱曲线出现 3 个峰,G3 号峰值管为 14,OD 值为 0.061;G4 号峰值管为 20,OD 值为 0.034;G5 号峰值管为 22,OD 值为 0.025。

因此,由图 2 和图 3 比较可知,酵母在 2%葡萄糖浓度下生长 8 h 和 16 h 时,16 h 出现 3 种峰,多于 8 h 时 2 种峰,其中出现了 G1 和 G4 峰值管相近,说明 2 种很可能为相同的蛋白。但是 8 h 时出现的相对分子量小的

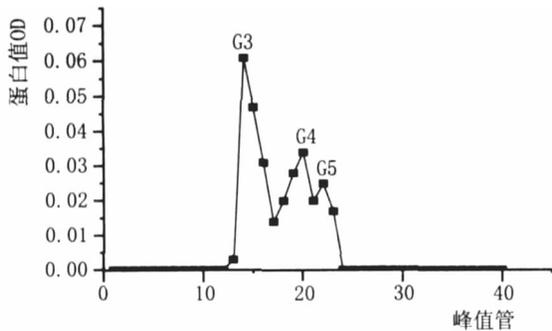


图3 Sephadex G-25分离2%葡萄糖浓度YNB对照组培养16h时分泌蛋白图谱

G2,在16h时,没有出现,但是又出现了2种峰相对高分子量的G3和G4。说明在正常生长情况下,菌体有分泌蛋白,并且伴随生长蛋白质种类的变化而变化。

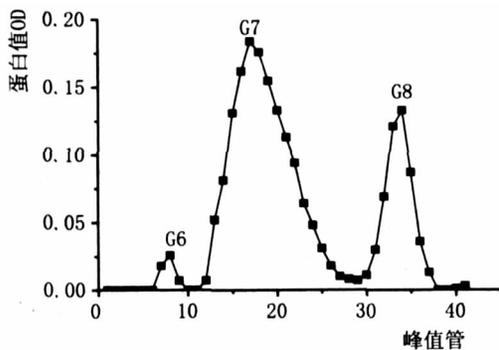


图4 Sephadex G-25分离10%葡萄糖浓度YNB培养8h时分泌蛋白图谱

由图4可知,酵母在10%葡萄糖浓度下于对数生长期生长8h时,洗脱曲线中出现3个峰,G6峰值管为8,OD值为0.026,为穿透峰(通过铬酸钾与蓝葡聚糖检验),超过Sephadex G-25的分离范围(100~5000 Da),蛋白相对分子量大于5000 Da;G7峰值管为17,OD值为0.184;G8峰值管为34,OD值为0.133。

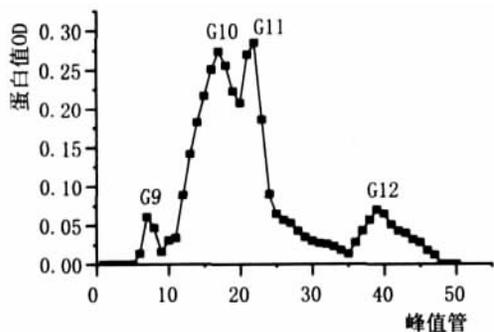


图5 Sephadex G-25分离10%葡萄糖浓度YNB培养16h时分泌蛋白图谱

由图5可知,酵母在10%葡萄糖浓度下生长16h进入稳定期时,洗脱曲线出现4个峰,G9号峰值管为7,OD值为0.061,也为穿透峰,为高分子量蛋白;G10号峰值管为17,OD值为0.274;G11号峰值管为22,OD值为

0.285;G12峰值管为39,OD值为0.07。

比较图4和图5可知,提高葡萄糖浓度后,酵母在对数生长期培养8h和16h,随着菌体生长,出现新分泌蛋白种类,原有蛋白相对含量也发生变化。

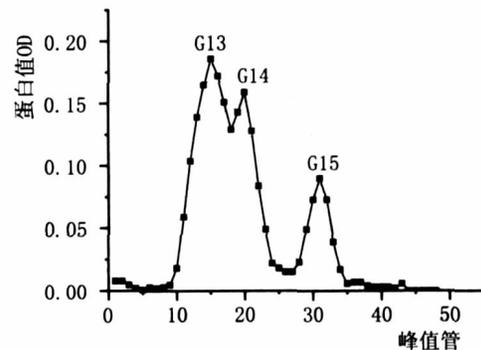


图6 Sephadex G-25分离20%葡萄糖浓度YNB培养8h时分泌蛋白图谱

由图6可知,酵母在20%葡萄糖浓度下于对数期生长8h时,洗脱曲线中出现3个峰,G13峰值管为15,OD值为0.186;G14峰值管为20,OD值为0.159;G15峰值管为31,OD值为0.09。

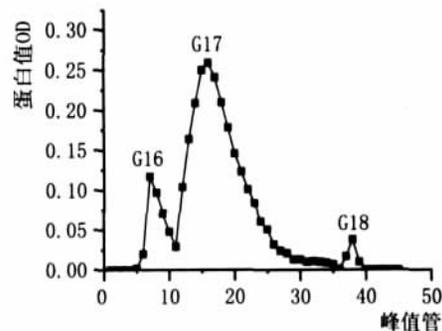


图7 Sephadex G-25分离20%葡萄糖浓度YNB培养16h时分泌蛋白图谱

由图7可知,酵母在20%葡萄糖浓度下生长16h进入稳定期时,洗脱曲线出现3个峰,G16号峰值管为7,OD值为0.117,也为穿透峰,为高分子量蛋白;G17号峰值管为16,OD值为0.259;G18号峰值管为38,OD值为0.038。

2.3 Sephadex G-75分离酵母在不同葡萄糖浓度下的分泌蛋白

为了对穿透峰进行研究,主要针对16h的分泌蛋白对G9和G16峰值管进行冻干浓缩后,采用Sephadex G-75对分泌蛋白进行分离研究。Sephadex G-75分离10%葡萄糖浓度YNB培养16h时分泌蛋白图谱结果见图8,Sephadex G-75分离20%葡萄糖浓度YNB培养16h时分泌蛋白图谱结果见图9。

由图8可知,酵母在10%葡萄糖浓度下生长16h时,G9穿透峰经浓缩后分离,洗脱曲线中出现1个峰,

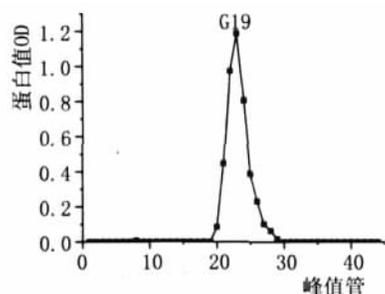


图8 Sephadex G-75 分离 10%葡萄糖浓度 YNB 培养 16 h 时分泌蛋白图谱

G19号峰值管为23, OD值为1.187, 根据洗脱曲线可知, 是一种分泌蛋白。

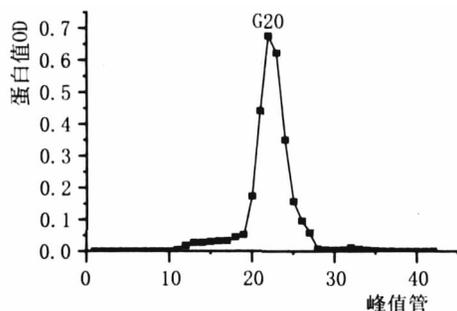
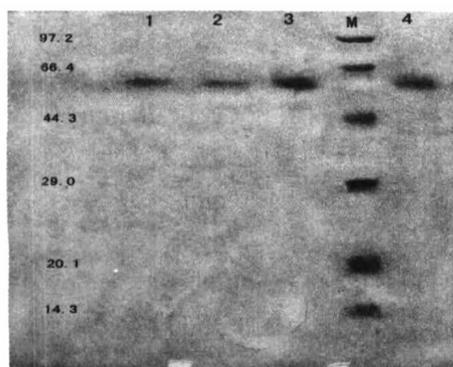


图9 Sephadex G-75 分离 20%葡萄糖浓度 YNB 培养 16 h 时分泌蛋白图谱

由图9可知, 酵母在20%葡萄糖浓度下生长16h时, G16穿透峰经浓缩后分离, 洗脱曲线中出现1个峰, G20号峰值管为22, OD值为0.676, 根据洗脱曲线可知, 也是一种分泌蛋白, 与图8中G19分子量相近。

2.4 SDS-PAGE 分析

酵母分泌蛋白 SDS-PAGE 电泳图见图10。



M代表低分子量标准marke, 分子量为97.4 kDa、66.2 kDa、43.0 kDa、29.0 kDa、20.1 kDa、14.3 kDa。1号泳道为G19, 2号泳道为G20, 3、4号为标准 yeast protein A 酶原。

图10 酵母分泌蛋白 SDS-PAGE 电泳图

由图10可知, Sephadex G-75 分离出来的蛋白 G19 和 G20 经 SDS-PAGE 分析, 分子量为 54 kDa 与酵母蛋白酶 A 酶原的条带分子量一致。为了进一步验证, 采用福林酚法测定酸性蛋白酶, 相关研究显示, 蛋白酶 A

(EC3.4.23.6) 是纯生啤酒在发酵过程中酵母分泌的一种酸性蛋白酶^[3,13~14]。酶原很容易转化为酶, 因此, 对 G19 和 G20 的峰值管蛋白进行冻干浓缩后测酸性蛋白酶活力。

2.5 福林酚法测酸性蛋白酶活力(表1)

表1 酸性蛋白酶活力

项目	样品号	
	G19	G20
酸性酶活力($\mu\text{g/mL}$)	56.21	70.07

由表1可知, 由 Sephadex G-75 分离出来的蛋白 G19、G20 是一种酸性蛋白酶, 活力分别为 56.21 $\mu\text{g/mL}$ 和 70.07 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

3.1 通过 Sephadex G-25 分离不同糖浓度下酵母分泌蛋白研究。研究发现, 相对于对照组生长时分泌蛋白种类和含量是不断变化的, 并且差异性很大。特别是提高糖浓度(葡萄糖)时, 在 16 h 时都出现穿透峰, 说明高糖浓度产生了高分子量的分泌蛋白, 经 SDS-PAGE 分析和酶活检测为蛋白酶 A 酶原。蛋白酶 A 正是纯生啤酒泡沫不稳定的主要原因之一。

3.2 酵母在极端的高渗条件下, 受到环境的刺激, 代谢途径发生了改变。生长的对数生长期出现延迟。出现分泌小分子量的新蛋白可能作为一种应激条件下的信号类物质, 个别分泌蛋白的表达量相对含量发生了变化。对这些小分子量分泌蛋白的功能研究, 还需要进一步确定分泌蛋白的途径, 这样有助于发挥酵母分泌表达系统的作用。

参考文献:

- [1] 张礼星, 章银军, 丁育云. 啤酒酿造过程中酿酒酵母应激反应及应答[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 68-72.
- [2] 刘向勇, 张小华, 鲍晓明. 酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析[J]. 中国酿造, 2006, (1): 8-11.
- [3] Rena Leisegang, Ulf Stahl, Degradation of a foam-promoting barley protein by a proteinase from brewing yeast[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2005, (2): 112-117.
- [4] 杨静, 李成云, 王云月, 等. 酿酒酵母分泌蛋白组的计算机分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 516-522.
- [5] 张慧敏, 姚善泾, 清水和幸, 等. 不同碳源培养条件下的蛋白质组解析[J]. 生物工程学报, 2005, 20(3): 398-401.
- [6] 郝欣, 陈叶福, 郭学武, 等. 发酵条件对纯生啤酒中酸性蛋白酶分泌的影响[J]. 酿酒科技, 2007, (10): 46-48.
- [7] 于典科, 张小华, 刘向勇, 等. 酿酒酵母转座标签插入突变体 263-H9 中高盐胁迫基因的确定[J]. 遗传, 2006, 28(10): 1294-1298.
- [8] Bonhivers M, Carbery J M, Gould S J, et al. Aquaporins in *Sac-*

(下转第 28 页)

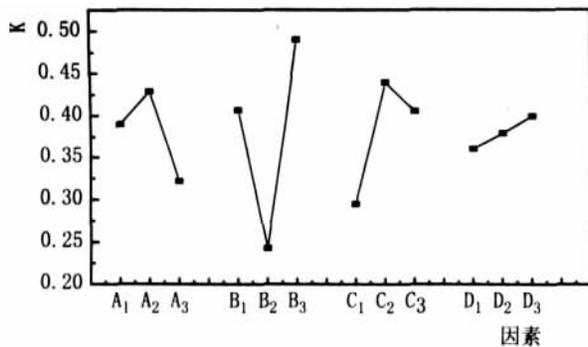


图1 影响ALDH活性的因子水平与k值的关系图

ALDH的最优发酵培养条件是温度为30℃、pH值为6、通气量为200 mL、接种量为7%。液体发酵培养中pH值对ALDH活性的影响最大。正交实验与单因素实验相比较有一定的出入,原因可能是各种因素相互作用影响的结果。

参考文献:

- [1] 梅启明,朱英国.ADH在光敏感核不育水稻中反应特征研究[J].遗传学报,1991,18(3):277-281.
- [2] 陈维莉.酒与化学[J].化学教学,1999,(12):38-39.
- [3] Thurner C, VeLa C, Linda T.M, MeiLe L, Teuber M.. Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase compLex from *Acetobacter europaeus*[J].

- Archives of Microbiology, 1997, 168(2):81-91.
- [4] Russo J, Barnes A, Berger K, et al. 4-(N, N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH4A1, but not the differentiation of HL-60 promyeLocytic leukemia cells exposed to all-trans retinal[J]. BMC Pharmacology, 2002,(2):4.
- [5] Dela Lande I.S,Stepien J.M, PhiLpott A.C. et al. Aldehyde dehydrogenase, nitric oxide synthase and superoxide in ex vivo nitrate tolerance in rat aorta[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 496:141-149.
- [6] Lin Y. P, Cheng T. J. Why can't Chinese Han drink alcohol Hepatitis B virus infection and the evoLution of acetaldehyde dehydrogenase deficiency[J]. Medical Hypotheses,2002, 59(2): 204-207.
- [7] Tian F, Zhu Y.X, Long H et al. liquid chromatography coupled with multi-channel electrochemical detection for the determination of daidzin in rat blood sampled by an automated blood sampling system[J]. Journal of Chromatography B,2002, 772: 173-177.
- [8] Sanchez L.B. Aldehyde dehydrogenas(CoA-AcetyLating) the mechanism of ethanol formation in the Amitochondriate Protist, *Giardia lamblia*[J]. Archivers of Biochemistry and Biophysics, 1998, 354(1):57-64.

(上接第25页)

- charomyces* genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains[J]. Biol. Chem, 1998, 273 (42): 27565-27572.
- [9] Salusjarvi L, Poutanen M, Pitkane J P, et al. Proteins analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2003, 20:295-314.
- [10] Bradford M. Arelplkd. and senditive methoed for quantities [J].Anal Bilchem.1976,(72):248-254.
- [11] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M].北京:1999.78-79.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the asse-

- mby of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [13] Stephan E.Brey.Samodh de Costa,Peter J.Rogers.et al.The effect of proteinase A on foam-active polypeptides during high and gravity fermentation [J].Journal of the Institute of Brewing,2003,(3):194-202.
- [14] Guo-Qing He, Zhao-Yue Wang.Relationship of proteinase activity,foam proteins,and head retention in unpasteurized beer [J].American Society of Brewing Chemists 2006,(1):33-38.

“武陵酒”冠名湖南省经济人物十杰评选

本刊讯 湖南省经济界最高荣誉奖项的年度盛事——“中国名酒武陵酒·第八届湖南十大杰出经济人物评选”于2009年4月9日全面启动。当日,该活动的新闻发布会在长沙蓉园宾馆隆重举行。湖南武陵商贸有限公司成为该评选活动举办以来的首家全程独家冠名的股份制企业。

本届评选活动确立的主题为“社会责任与管理创新”。经过反复酝酿和层层筛选,最后甄选出15位候选人,并在此次新闻发布上予以了隆重推出。他们都是所在行业或所在地区的领军人物,为全省乃至全国经济的发展起到了积极和深远的作用,做出了杰出贡献。评选结果将在5月底揭晓。

无论是从酿酒成就,还是从品牌文化,武陵酒此次赞助第八届湖南十大杰出经济人物评选活动,可谓是珠联璧合。作为本次活动的战略合作伙伴之一,湖南武陵商贸有限公司董事长黄星耀代表公司出席,并就武陵酒赞助此次活动的意义进行了精辟阐述。被喻为“湖南奥斯”的“湖南经济十杰评选”与贵为“中国名酒、酱香新贵”的酱香武陵酒,两个行业巅峰品牌的无缝嫁接,必定能产生巨大的社会能量,从而更好地张扬“十杰”评选的人气和武陵酒的香气。(小小)