

茅台高温发酵应激反应活性酵母衍生物中的蛋白解析

陆筑凤¹ 郭坤亮² 王昌禄³

(1.贵州大学生命科学学院,贵州 贵阳 550025;2.贵州茅台酒厂有限责任公司,
贵州 仁怀 564501;3.天津科技大学,天津 300457)

摘要: 建立酵母细胞应激高温和酒精共同刺激的茅台酒高温发酵工艺实验模型,采用双向电泳方法分析茅台酒高温发酵工艺对酵母细胞活性衍生物(LYCD)中应激蛋白的影响,采用银染显色扫描胶图后用 Image Master 2D Platinum5.0 凝胶电泳分析软件对胶图分析,检出了 23 个差异蛋白点。质谱鉴定得到 3 个重要蛋白,为探讨茅台酒高温发酵工艺的发酵机理提供了依据。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; LYCD; 蛋白应激反应; 双向凝胶电泳

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)01-0052-03

Protein Analysis of Live Yeast Cells Derivative under Moutai Liquor High-temperature Fermentation Response

LU Zhu-feng¹, GUO Kun-liang² and WANG Chang-lu³

(1.Life Science College of Guizhou University, Guiyang, 550025;2. Guizhou Moutai Co.Ltd.,
Renhuai, 564501;3. Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300457, China)

Abstract: The laboratory model of Maotai liquor high-temperature fermentation by common stimulation of yeast cells response high temperature and alcohol was established. The effects of Maotai liquor high-temperature fermentation on response protein in live yeast cells derivative (LY-CD) were investigated by use of two-dimensional electrophoresis. After the electrophoresis, the protein spots were detected by silver-stain. Silver-stained gels were scanned and digitized to create computer images and 23 protein spots were detected by use of the 2D proteome image analysis system (Image Master 2D Platinum5.0). Three essential proteins were detected by mass spectrograph. The experiment could provide evidences for the research on high-temperature fermentation mechanism of Maotai liquor.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; LYCD; response protein; two-dimensional electrophoresis

酿酒酵母在极端环境下的应激反应,能产生促进细胞呼吸和修复作用的保护性物质,称为活性酵母衍生物(Live Yeast Cell Derivative,简称 LYCD)。这些活性酵母衍生物有重要的医用和保健价值^[1],但其作用机理尚不清楚。高温发酵工艺是茅台酒生产的特点之一,赋予茅台酒中独特的功能组分^[2]。本论文模拟高温发酵的高温 and 酒精工艺条件,建立茅台酒生产高温应激反应实验模型,制备高活性酵母细胞衍生物,探讨应激反应 LYCD 中的应激蛋白和应激机理。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养条件

从茅台酒生产过程筛得的 Y14 酵母菌作为 LYCD 和 YE 的实验菌株;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

MZT.39(中国微生物国家菌种保藏中心提供)作为标准菌株,供生物活性测定;培养基为 12° Brix 麦芽汁培养基,以 6% 的接种量接入培养基于 170 r/min 的恒温摇床中培养。

1.2 高活性 LYCD 和 YE 的制备

按照本文确定的高活性 LYCD 制备最佳条件:高温 46℃、酒精浓度为 4% 时刺激 Y14 酵母细胞 20 min,终止刺激离心收集菌体加入培养基继续培养 2 h 后离心,液氮冷冻破壁,用 4℃ 的无菌水转移破碎物,10000 g 离心,上清液即为 LYCD^[3]。

酵母提取物(Yeast Extract, YE),是指未经高温和酒精处理在常温和无酒精的麦芽汁培养基中培养的酵母细胞,与 LYCD 做对照,依照 LYCD 的制备方法进行。

采用紫外分光光度法测定 LYCD 的活性,量取一定

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2004036364)。

收稿日期:2008-12-01

作者简介:陆筑凤,贵州大学微生物硕士研究生,主要研究方向为应用微生物。

通讯作者:郭坤亮,博士(后),高级工程师,贵州茅台酒厂有限责任公司副总工程师,E-mail:guokunlang@sohu.com。

量的测定菌株 MZT.39 的培养液, 加入一定量的 LY-CD, 30 °C 水浴振荡培养 1 h, 用 UV-2550 紫外分光光度计测定反应前后 OD_{256nm} 值的变化, 以此来反映 LYCD 活性的大小^[4]。

1.3 双向凝胶电泳

将终止培养离心收集的菌体洗涤干净后, 用蛋白裂解液(40 mmol/L 的 Tris, 2 % NP-40)收集液氮研磨样品, 再于样品中加入蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L DTT); 冰浴超声后离心加入 TCA 丙酮沉淀蛋白, 充分洗脱丙酮后再加入蛋白裂解液 L3 (8 mol 尿素, 2 mol 硫脲, 2 % NP-40, 4 mM Tris, pH8.0~8.5), 超声并离心收集蛋白等待定量^[5]。2-D Quant kit 试剂盒定量使用 Molecular Devices 紫外分光光度计根据 480 nm 处的吸光值绘制蛋白浓度的标准曲线, 空白为水。

定量后的蛋白溶液以相同蛋白上样量进行 2DGE 分离^[6], 第一维在 18 cm 的 pH3~10 非线性 IPG 胶条上进行, 水化溶液的组成是 50 mM DTT, 0.5 % IPG-buffer, 200 μ g 蛋白, 补加剩余体积的 R-buffer 溶液至 350 μ L 总体积。采用 20 °C 无电压的被动水化 8 h 加上 50 V 电压主动水化 4 h 后, 电压快速升至 500 V 维持 1 h, 从 500 V 快速升至 1000 V 维持 1 h 后线性升至 8000 V 电压维持 1 h, 聚焦在 8000 V 电压聚焦 72000 Vh。等电聚焦结束后, 胶条先后在适当体积的 SDS 平衡缓冲液(1.5 mol/L Tris-HCl 50 mmol 6.7 mL, UREA 6 mol/L 72.07 g, Glycerol 87 % 30 % 69 mL, SDS 2 % w/v 4.0 g, Bromophenol blue TO 200 mL)中平衡 2 次, 第一次平衡在平衡液中加入 1 % 的 DTT, 平衡 15 min, 第二次加入 2.5 % IAM 也平衡 15 min。将平衡好的胶条转入二相凝胶模块并放入 GE 公司 Ettan DALT System 电泳仪, 开启电源先在 80 V 电压下缓慢进行 30 min 左右, 待干胶条的蛋白全部转到二向凝胶后, 设置每块胶 15 W 功率电泳。电泳结束采用银染方法显色和检出蛋白。

1.4 图像采集和分析

使用 UMAX MagicScan3.2 v4.5 扫描系统在 300 dpi 的分辨率下转换为 TIFF 格式的图像文件, 利用 ImageMaster 2D Platinum5.0 对扫描后的 TIFF 格式的图像文件进行分析, 检出所有真实的蛋白点和劈开重叠的蛋白点; 配对修正完成查看配对率, 在保证 80 % 左右的配对率基础上, 选择要绘制在虚拟凝胶中的点群, 得到综合三块平行胶的虚拟凝胶。

YE 和 LYCD 中蛋白的差异性分析, 可以选择体积较小浓度较大的点作为 LandMark, 并给其添加 An-notation, 自动匹配凝胶。配对完成后, 给分子量 Marker

点添加分子量信息。差异点信息可以反映 Max 值上, 选择 $Max \geq 3.0$, 则所有点为 3 倍差异点, 得到 3 倍差异点报告; 未配对点中筛选出浓度较大的有无差异点。

1.5 质谱分析鉴定

切下待分析蛋白点, 使用 Trypsin 储液 (0.5 mol/L 40 μ L to 0.1 mol/L 200 μ L) 酶解消化过夜, 点样到 Anchorchip 靶, 与标准品同时除盐并用无尘纸吸干凉干后进质谱仪。质谱仪 BRUKER ultraflex TOF/TOF, 激光源为 337 nm 波长的激光器, 加速电压为 25 kV。采集的数据图谱用 BRUKER 专用 peptide calibration standard II 进行外标校正, 用 Flxanalysis 操作软件对肽质指纹图数据搜索。

2 结果与分析

2.1 LYCD 和 YE 中的蛋白定量

按照试剂盒定量方法取适量制备好的 LYCD 和 YE 蛋白样本, 与标准蛋白一同测吸光值。以标准品的吸光值减去水的吸光值后的相对吸光值(X)为横坐标, 以标准品中的蛋白浓度(Y)为纵坐标作图, 得到计算蛋白相对浓度的标准曲线, 见图 1 所示。

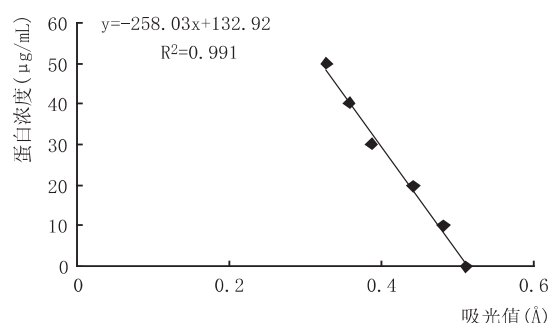


图 1 蛋白定量标准曲线

对样品的吸光值求平均减去空白样水的吸光值后得到相对吸光值($\text{\AA}$), 利用标准曲线的公式计算蛋白的含量, 最终除以取样体积后得到样品的相对浓度。

经计算, YE 中的蛋白相对浓度为 10.8382 μ g/mL; LYCD 中的蛋白浓度为 8.2785 μ g/mL。

2.2 LYCD 和 YE 中蛋白的 2DGE 胶图分析

图 2 是 LYCD 和 YE 中蛋白的虚拟凝胶, 综合了 3 块平行胶的蛋白图谱, 蛋白点更加可靠, 为后续蛋白差异分析和质谱鉴定提供基础。

虚拟凝胶进行自动匹配后, 给标准蛋白 Marker 标记添加分子量信息。比较 LYCD 和 YE 两个样本的虚拟凝胶时, 选择体积百分比%(v/v), 差异点的信息反应在 Max 值上, 实验一般要求 Max 值 ≥ 3.0 , 即蛋白点的含量差异为 3 倍以上, 因为通常认为这样的点具有生物学比较意义, 因为如果含量差异较小的话, 可能这种差

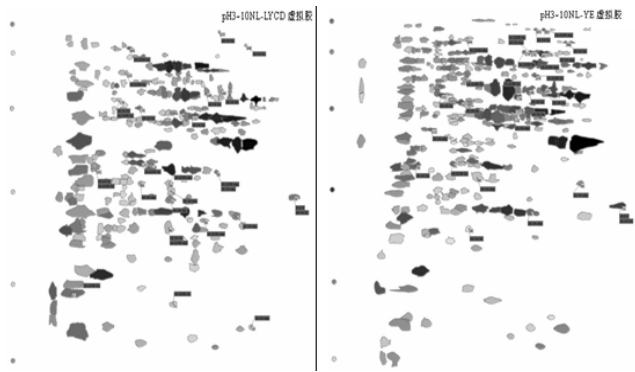


图2 LYCD 和 YE 中蛋白的虚拟胶图谱及相应差异点

异不是菌体本身表达的,而是由于电泳过程中不可避免的误差所导致的,因此,含量高于 3 倍的差异点比较分析更具意义,得出的 3 倍差异点报告绘制于表 1,共 10 个蛋白点。

在得出 3 倍差异点后选择哪些未配对的蛋白点,得出未配对点报告,以 Intensity 值排序选择蛋白浓度较大的蛋白点,这样不会因为浓度太低而造成质谱结果无效,最终在胶图上进行肉眼筛选,得出有用的有无差异点,汇总于表 2 中,差异点相应标注在虚拟胶图上。

2.3 质谱分析

选取 20 个蛋白质点进行酶解-质谱指纹图分析,质

谱获得的图谱搜索时选择 NCBI 数据库,搜寻参数:enzyme 中选择 trypsin,global modification 中选择 carbamidomethyl (C),variable modification 中选择 oxidation (M),missed cleavages 选择 1,mass tol 选择 100 mg/L, mass 选 MH⁺。根据数据库内 score 判断阳性结果,查询数据库初步鉴定了 15 个蛋白质,其中部分是与细胞周期和代谢有关的蛋白,如磷酸甘油酸变位酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶等;部分是与信号传导有关的蛋白,如 RACK1;有 3 个是和酵母高温酒精应激反应相关的蛋白,分别是 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAM),它是谷胱甘肽的前体;细胞色素 C 过氧化物酶;乙醇脱氢酶(ADH)。酵母应激反应制备的 LYCD 中这 3 种蛋白的含量明显高于 YE 中的,说明这 3 类蛋白参与了复杂的应激反应,并且是酵母对高温和酒精刺激应激机制的关键蛋白。

3 结论

在国内,茅台酒中富含多种对人体有益的微量成分引起了人们的广泛关注,并成为茅台酒的核心竞争力之一,但其机制仍不清楚。本文实验条件与茅台酒高温发酵工艺中的发酵条件基本一致,表明茅台酒高温发酵温度能促进茅台酒生产过程酒醅中酿酒酵母产生具有生

表 1 以 LYCD 为参照的 3 倍差异点详细报告

SpotID	X	Y	pI	MW	Intensity	Area	Vol	%Intensity	%Vol
170	933	574	5.51902	42946	19747.1	6.86026	45973.9	0.512583	0.143374
78	2027	1128	10	30194	19802.7	15.5485	54841.2	0.514026	0.171028
199	1509	465	7.87829	49055	13152.7	13.7062	43696.4	0.341409	0.136271
248	1689	181	8.61556	72589	7014.63	2.40862	5097.61	0.182081	0.015897
155	1306	624	7.04681	41618	22075.5	9.82801	104470	0.573022	0.325799
101	626	959	4.26156	33722	13327.2	7.45524	38291.1	0.345939	0.119414
188	1408	479	7.4646	48216	17300.3	10.2796	67963.7	0.44907	0.211951
253	1501	95	7.84552	87806	7136.52	2.01435	3803.99	0.185245	0.011863
176	790	523	4.93329	45674	7102.17	4.87458	16560.1	0.184354	0.051644
46	1142	1325	6.37507	26031	10939.5	25.9571	91344	0.283961	0.284865

表 2 以 LYCD 蛋白胶图参照的有无差异点报告

SpotID	X	Y	pI	MW	Intensity	Area	Vol	%Intensity	%Vol
8	1398	1222	7.37448	27869	22531.2	11.9786	139900	0.44017	0.394629
132	1284	648	6.89863	41358	16746.2	12.7886	120784	0.327154	0.340708
66	1032	1014	5.84675	32487	9179.42	25.0898	96643.2	0.179329	0.272611
271	1511	246	7.84615	65675	25484.2	5.40505	52357.1	0.49786	0.147689
64	1742	1049	8.81038	31745	16389.3	8.15775	50236.1	0.320182	0.141706
112	713	717	4.51521	39518	21616.6	6.63086	44915.1	0.422302	0.126696
270	1400	246	7.38283	65675	22168.3	5.24017	43138.3	0.433081	0.121685
76	1149	1147	6.40374	29765	18008.5	17.6632	104375	0.467453	0.325503
9	1620	1249	8.33294	27564	18339.5	15.1542	70430.5	0.476045	0.219644
12	1157	1091	6.43651	31039	9800.83	15.1972	65291.7	0.254404	0.203618
89	941	1044	5.55178	31969	11197.2	8.14342	43838.3	0.29065	0.136714
98	1479	975	7.75541	33385	17364.4	4.07888	42071.3	0.450734	0.131203
19	1727	1944	8.77121	16383	8938.57	6.05738	40103.8	0.232022	0.125068

注:斜体数据为 YE 胶图上特有的蛋白信息,常规字体为 LYCD 胶图上特有的蛋白点。

(下转第 57 页)

表5 链霉素对细菌的抑制效应

链霉素添加量 ($\mu\text{g/mL}$)	对细菌的抑制作用			
	淀粉培养基		YPD	
	细菌菌落 个数	霉菌类 群数量	细菌菌 落个数	酵母类 群数量
30	3	3	5	4
40	1	3	3	4
50	0	3	1	4
60	0	3	0	4

兼性厌氧以及厌氧的细菌则不适宜,有报道可以采用燃烧法来培养兼性厌氧细菌^[5],或者通过厌氧罐培养,但 these 方法只适合于少数样品的分离,对于大规模的酒醅样品分析来说,这些方法对设备的要求比较高。相比较而言,分离细菌采用混合倒平板方法,不仅平板表面可以分离得到好氧细菌,在平板的中部以及底层则可以分离到兼性厌氧菌,而且对仪器设备的要求不高,在数量和种类上具有较好的重现性。因此,可通过混合倒平板的方式来快速分离兼性厌氧菌。

2.3 菌株细胞观察

通过镜检所分离到的细菌多为杆菌,霉菌多为具有隔膜的菌丝体以及形态不同的孢子梗,而酵母多为椭圆形,并伴有出芽繁殖。将菌种按照一定的形态归类,并结合菌株细胞的镜检观察,有利于分析酒醅中微生物类群的生长,结合一定的生理生化指标,掌握微生物类群的发展体系,有助于更深刻的了解白酒固态发酵过程中微生物的作用,以及采用有效的控制措施来科学的指导生产实践。

3 讨论与结论

采用平板分离法是研究白酒酒醅微生物的一种快速有效的试验手段。不仅对试验设备的要求不高,而且通过最佳稀释度的选择、抗生素的添加以及微生物类群

(上接第54页)

物活性的LYCD,表明茅台酒具有特殊的健康和保健成分与茅台酒独特的生产工艺密切相关^[7~9]。酵母应激反应前后蛋白质的表达发生了很大的改变,诱导产生了一些新的应激蛋白产生,同时也抑制了一些蛋白的表达,说明茅台酒高温工艺对酵母细胞蛋白的表达产生明显影响。对蛋白质组成的分析和特殊蛋白的鉴定将有益于应激蛋白分析及功能的研究,为应激机理研究提供依据。

参考文献:

- [1] L Leds, D.Ssholz, C.Dres et al. Peroxide-inducible Protective Factors Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. [J].Cosmetics&Toiletries, 2000, 115(12): 71-74.

的分类等系列的分析,基本上就可以掌握细菌、霉菌、酵母在各个阶段的不同变化。对于进行大规模的白酒固态发酵的动态分析,更深入了解糟醅中微生物组成的复杂性而言,是一种有效的实验方法。

由实验结果可知,分离细菌、霉菌和酵母分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、淀粉培养基和YPD培养基。在淀粉和YPD培养基中添加60 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素就能很好地抑制细菌的生长,且对霉菌和酵母的数量和种类并没有影响。分离细菌主要采用混合倒平板的方法。而霉菌和酵母的分离均可采用涂布的方法。采用上述分离条件对入窖和出窖样品进行分析,得出不同生产工序时段的细菌、霉菌和酵母所采用的稀释度是不同的,而且相对应的微生物种类的多样性也是有所不同的。入窖酒醅中的微生物种类和数量要比出窖酒醅中的微生物丰富,这是由于酒醅中微生物的消长受氧气、温度、pH值等因素的影响所致,入窖与出窖酒醅中微生物生长环境的巨大变化导致了细菌、霉菌和酵母在数量和种类上的巨大差异。符合酒醅中微生物消长的基本规律。同时,酒醅中分离出来的细菌的种类和数量都较霉菌、酵母多,这也与熊昌绪^[1]报道的结果相同。

参考文献:

- [1] 熊昌绪.浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物消长、物质变化的研究[J].酿酒科技,1994,(2):25-26.
- [2] 乔宗伟,张文学,张丽莺,等.浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J].酿酒,2005,32(1):18-20.
- [3] 蔡定域.实用白酒分析[M].成都:成都科技大学出版社,1994. 286-293.
- [4] 赵斌,何绍江.微生物学试验[M].北京:科学出版社,2002. 70-71.
- [5] 岳元媛,张文学,刘霞,等.浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J].微生物学通报,2007,34(2):251-255.
- [2] 季克良,郭坤亮.茅台酒高温酒工艺应激条件对活性酵母细胞衍生物的影响[J].酿酒科技,2005,(3):46-48.
- [3] GT Brooks,HA Schueffer. Live yeast cell devivative, [J].Cosmetics & Todatsies, 1995, 7(110): 65-68.
- [4] 白爱琴,郭坤亮,秦广利,等.酒精应激产生活性酵母细胞衍生物的研究[J].酿酒科技,2008,(1):52-53.
- [5] GE公司双向电泳中文手册[M].2006,7-14.
- [6] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].1992.54-81.
- [7] 马超颖,成薇,路福平,等.活性酵母细胞衍生物的初步研究[J].微生物学通报,2003,30(3):26-28.
- [8] GT Brooks,HA Schueffer. Live yeast cell devivative[J]. Cosmetics & Todatsies 1995, 7(110):65-68.
- [9] Bentley JP, Hunt TK, W wiss JB. Peptides from live yeast cell derivative stimulate wound healing[J].Arch Stag, 1990, 125(5):641-646.