

高温发酵工艺酵母应激机制的初步研究

陆筑凤¹ 郭坤亮² 王昌禄³

(1.嘉兴学院生物与化学工程学院,浙江 嘉兴 314001;2.中国贵州茅台酒厂有限责任公司,贵州 仁怀 564501;
3.天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津 300222)

摘要: 为研究酱香型白酒中的有益微量成分及其产生机理,优化高温发酵工艺,采用双向电泳和质谱技术,对酵母高温发酵过程中应激反应产生的活性酵母细胞衍生物(LYCD)进行了蛋白质组水平的分析。结果表明,高温和酒精应激导致蛋白表达差异明显,对其中 8 个差异点进行质谱鉴定,肽质指纹分析发现 S-腺苷甲硫氨酸合成酶在应激反应中特有大量表达,细胞色素 c 过氧化物酶、肌动蛋白、乙醇脱氢酶、烯醇酶等表达量明显增加。说明高温发酵酵母可通过酶系防御体系和氨基酸生物合成等发挥应激保护作用。

关键词: 微生物; 高温发酵; 活性酵母细胞衍生物; 双向电泳; 质谱; 蛋白质组

中图分类号:TS261.1;Q93-3;TQ920

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)11-0025-03

Study on the Stress Response Mechanism of *S.cerevisiae* in Condition of High-temperature Fermentation

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

(1.College of Chemical and Biological Engineering, Jiaxing College, Jiaxing, Zhejiang 314001; 2.China Moutai Distillery Co.Ltd, Renhuai, Guizhou 564501; 3.Department of Food Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: In order to study the beneficial trace components in Maotai-flavor liquor and their formation mechanism, high-temperature fermentation technology was optimized and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) and mass spectrum was applied to analyze the live yeast cell derivative (LYCD), a kind of protective substance which produced by the complicated stress response of *S.cerevisiae* in condition of liquor high-temperature fermentation. The results indicated that high temperature and ethanol stress response resulted in evident difference in protein expression. 8 difference points among them were identified by MS and peptide mass fingerprinting analysis showed that S-adenosylmethionine synthetase (SAMS) was peculiarly expressed after stress response. In addition, the content of cytochrome c peroxidase (CcP) and ADH and enolase were evidently enhanced in LYCD, which suggested that *S.cerevisiae* in condition of high-temperature fermentation could produce protective substances such as defensive enzymes by complicated stress response.

Key words: microbe; high-temperature fermentation; live yeast cell derivative; 2-D PAGE; mass spectrum; proteomic

酱香型白酒中富含 200 多种对人体有益的微量成分,但产生机制尚不清楚。近年来,高温发酵工艺过程中应激反应与活性酵母细胞衍生物引起了人们的广泛关注。酿酒酵母在应激反应条件下能产生促进细胞呼吸和修复作用的保护性物质,称为活性酵母细胞衍生物(LY-CD)^[1]。本文利用蛋白质组技术对酿酒酵母高温发酵过程中的 LYCD 进行了初步研究,以期从蛋白质组水平研究主要活性成分及其产生机制,为优化工艺提供线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

耐高温酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)SU10-4-60, 由茅台微生物菌种资源库提供,最适生长温度为 35~38℃,作为发酵菌株。

培养基为 12 Bix 麦芽汁培养基。

1.2 主要试剂

Urea, Tris, CHAPS, PMSF, SDS, Glycine, Acrylamide 均购自赛泰克生物科技有限公司;IAM, DTT, NP-40, Glycerol (87%, v/v), Bromophenol blue, Glutaraldehyde, Silver nitrate, β -mercaptoethanol 购自 sigma 公司;Immobiline Drystrip pH3-10 NL, IPG-buffer, Agarose NA, molecular weight markers (MW range 14.4~97.4 KDa), 2-

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2004036364)。

收稿日期:2010-08-24

作者简介:陆筑凤(1984-),女,浙江嘉兴人,助教,硕士研究生,研究方向为应用微生物。

通讯作者:郭坤亮(1966-),男,博士后,高级工程师,中国贵州茅台酒厂有限责任公司副总工程师,Email:guokunlang@sohu.com。

D Quant kit 试剂盒均购自 GE 公司。

1.3 主要仪器

德国布鲁克 maldi-tof-tof-ms; 一向电泳仪 BIO-RAD PROTEAN IEF CELL; 一向电泳仪 GE HEALTHCARE Ettan IPGphor3; 二向电泳仪 Ettan DALT System; 扫描仪 UMAX POWERLOOK 2100 XL; 离心机 Backman J2-MC; 离心机 Eppendorf Centrifuge 5417R; 紫外分光光度计 Molecular Devices; 图象分析系统 ImageMaster 2D Platinum 5.0。

1.4 方法

1.4.1 LYCD 和 YE 制备及活性测定

参阅课题组前期文献[2]。

1.4.2 蛋白样本制备与定量

用蛋白裂解液(40 mmol/L 的 Tris, 2 %NP-40)收集 LYCD 和 YE 样品, 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); 冰浴超声离心取上清液。上清液加入 10 %TCA-丙酮混合液, -20 °C 静置沉淀蛋白, 离心去上清液。待 TCA 充分洗脱后加入蛋白裂解液(8 mol 尿素, 2 mol 硫脲, 2 %NP-40, 4 mM Tris, pH8.0~8.5), 超声, 并用不含蛋白酶的 DNase/RNase 除核酸, 于 35000 g 高速离心收上清液, 即为处理好的蛋白样本。使用 2-D Quant kit 试剂盒定量, 用 Bradford 法测其蛋白浓度。

1.4.3 双向凝胶电泳

第一向电泳在 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 g 蛋白, 补加剩余体积的 R-buffer 溶液至 350 μ L 总体积。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 至 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^[3]。将平衡好的胶条转入二相垂直电泳。电泳结束采用银染方法显色和检出蛋白。

1.4.4 肽指纹图谱分析

挑选蛋白点亮度较大, 鉴定率相对较高的 8 个差异斑点, 酶解消化后, 进行 MALDI-TOF-TOF-MS 检测, 得到肽指纹图谱。搜索数据库 NCBI nr, 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 ppm, mass 选 MH⁺, 获得序列检索信息。

2 结果与讨论

2.1 LYCD 和 YE 中蛋白的 2-DE 图谱比较分析

图 1 为用 ImageMaster2D Platinum5.0 图像分析软件对 3 块平行胶匹配后获得的虚拟胶。LYCD 中的蛋白斑点有 253 个, YE 中的蛋白斑点有 312。

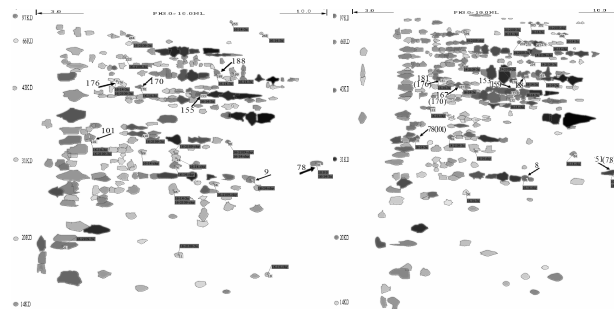


图 1 应激组 LYCD 和常规 YE 中蛋白的双向电泳图谱

从图 1 中可以确定 LYCD 和 YE 中有 20 多个明显差异的斑点, 对其中 8 个差异点进行质谱鉴定, 肽质指纹分析。

2.2 质谱分析及蛋白质数据库同源性分析

质谱分析检测得到肽指纹图谱, 如图 2。根据数据库内 score 值判断阳性结果, 图 3 中编号相同的 mixture 为同源蛋白。结合双向电泳图上对应的 Mr(相对分子量)、PI(等电点)鉴定其相应蛋白, 这些蛋白的相应信息见表 1。

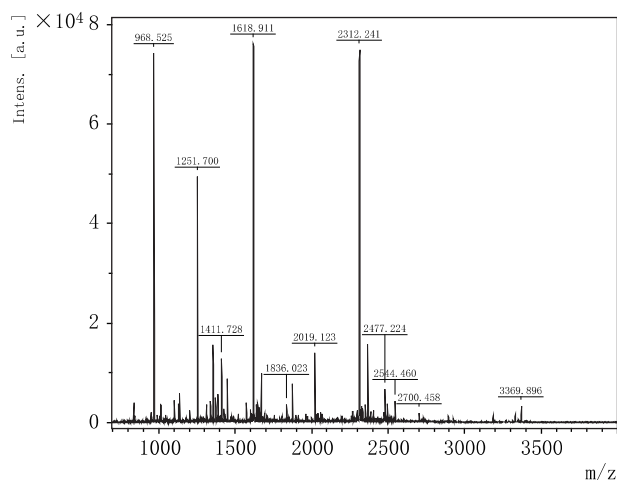
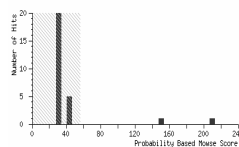


图 2 155 号蛋白斑点的肽质量指纹图谱(PMF)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: Concise Protein Summary | Hide

Significance threshold $p < 0.05$ | Max. number of hits: 20

Re-Search All | Search Unmatched

1. g1151245549 | Mass: 37272 | Score: 210 | Expect: 2.1e-17 | Queries matched: 24 | alcohol dehydrogenase [Saccharomyces cerevisiae YJM789]

图 3 蛋白分值图

表1 差异蛋白质谱检索结果及相关信息

斑点 编号	Genbank 号	蛋白名称	实验 Mr/PI	Score	Queries matched
9	gi 6320710	S-腺苷甲硫氨酸合成酶	42515/5.18	110	13
78	gi 157884466	磷酸甘油酸变位酶	26687/8.27	180	14
101	gi 6323077	核糖体亚基组成蛋白	28002/4.69	173	14
155	gi 151945549	乙醇脱氢酶 I	37272/5.94	210	24
170	gi 14318479	肌动蛋白	41891/5.44	119	16
176	gi 157837019	细胞色素 C 过氧化物酶	33743/5.03	60	7
188	gi 6321968	烯醇酶 II	46942/5.67	73	8

2.3 讨论

2.3.1 应激反应中氨基酸生物合成的影响

环境压力常常导致细胞内蛋白质的变性、失活,细胞可以通过合成新的蛋白来代替失活的蛋白,并将失活的蛋白降解,以恢复细胞的稳态^[4]。S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMS,EC2.5.1.6)以 ATP 和 L-甲硫氨酸为底物,能催化合成重要的甲基供体和生物烷化剂 S-腺苷甲硫氨酸,其也是甲硫氨酸生物降解和含氮氨基酸的生物合成的关键酶。S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMS)在酵母对高温发酵应激反应时的大量表达,推测 GSH 合成的前体物质 SAM 的需求量因 GSH 合成而增大。SAM 通过转巯基化作用合成 GSH 在活性氧脱毒过程中起重要作用^[5]。

2.3.2 应激反应中酶系防御体系的影响

细胞色素 C 过氧化物酶能特异地催化还原型细胞色素 C 对过氧化氢的还原反应,同时细胞色素 C 亦是应激胁迫时细胞凋亡的重要机制之一,推测细胞色素 C 过氧化物酶同过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶等酶系防御体系一样可以起到清除自由基或者修复氧化应激引起的细胞损伤的作用。

高温和酒精应激引起酵母体内参与无氧呼吸的酶活性如乙醇脱氢酶(ADH)等增强,促进了乙醇发酵,维持细胞能荷,从而增强酵母对高温和酒精刺激的适应性,ADH 活性升高,酵母对高温发酵的耐受能力增强。此外,烯醇酶是一种多功能蛋白,它能与细胞骨架蛋白和多聚

核苷酸结合,还具有热激蛋白的功能。在极限环境中,细胞通常分泌或者表达特殊蛋白来适应环境,有研究表明,烯醇酶的表达量会上调,增加缺氧代谢来对细胞提供保护^[6]。在啤酒酵母菌温度升高时,烯醇酶基因也会被诱导表达,被认为在酵母中具有耐热和生长调控作用^[7]。

3 结论

本研究建立了高温和酒精共同作用的酵母高温发酵工艺应激反应模拟机制,应用蛋白质组学技术研究应激反应活性酵母细胞衍生物 LYCD 中的重要成分,研究发现了 LYCD 中多个蛋白的差异表达,说明高温发酵酵母可通过酶系防御体系和氨基酸生物合成等发挥应激保护作用,为进一步探讨 LYCD 主要活性成分和应激机理奠定基础。

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.
- [2] 陆筑凤, 郭坤亮, 王昌禄. 茅台高温发酵应激反应活性酵母衍生物中的蛋白解析[J]. 酿酒科技, 2009, (1): 52-57.
- [3] 赵亮, 刘莉, 王爽, 等. 采用蛋白质组学技术筛选大肠癌转移相关蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(5): 485-491.
- [4] Chen D R, Mark W T, Mata J, et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress[J]. Molecular Biology of the Cell, 2003, 14: 214-229.
- [5] 廖国建, 陈洪斌, 何颖, 等. 应用蛋白质组学技术研究铬()对粟酒裂殖酵母的分子毒性影响[J]. 环境科学学报, 2005, 25(12): 1693-1697.
- [6] Graaven KK, Zimmerman LH, Dickson EW, et al. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific [J]. Cell Physiol. 1993, 153(3): 544-554.
- [7] Lida H, Yahara I. Yeast heat-shock protein of Mr 48000 is an improtein of enolase[J]. Nature, 1985, 315(602): 688-690.

(上接第 24 页)

高和稳定低度浓香型白酒质量的生产实践,取得了令人满意的结果。

参考文献:

- [1] 钱松. 薛惠茹. 白酒风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [2] 李大和, 刘沛龙, 陈功, 等. 低度曲酒贮存过程中质量变化的研究(上)[J]. 酿酒科技, 1996, (5): 28-33.
- [3] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

- [4] 李家民. 浓香型白酒贮存过程中总酯、总酸的变化规律[J]. 酿酒科技, 2008, (1): 59-61.
- [5] 全建波, 刘淑玲, 王东新, 等. 清香型白酒香味成分贮存变化规律的研究[J]. 酿酒科技, 2004, (2): 35-36.
- [6] 全建波, 李美萍, 寇建仁, 等. 低聚果糖与脂肪酸酯缔合行为的研究及在低度白酒中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2006, (5): 86-88.
- [7] 全建波. 低度白酒稳定性研究及其应用[D]. 太原: 山西大学, 2004.
- [8] 王东新. 白酒中酯类化合物稳定性的研究及应用[D]. 太原: 山西大学, 2005.