

研究报告

酿酒酵母与地衣芽孢杆菌相互作用及基于蛋白组学的作用机制分析

孟醒 吴群 徐岩*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 酿造微生物与应用酶学研究中心
江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】为解析酱香型白酒发酵过程中群体微生物的酿造特征, 研究酱香型白酒酿造中贡献特征风味的地衣芽孢杆菌和贡献酒精的酿酒酵母之间的相互作用。【方法】通过构建酿酒酵母纯培养及与地衣芽孢杆菌共培养发酵体系, 比较不同培养体系中的生物量、乙醇产量及有机酸产量差异, 并从蛋白组学角度加以分析和认识二者之间的相互作用。【结果】在共培养体系中, 酿酒酵母抑制地衣芽孢杆菌生长, 其自身生长不受地衣芽孢杆菌的影响, 然而代谢产物却发生变化, 其中乙醇及有机酸中的丙酮酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸及酒石酸的最高产量分别高出其纯培养的 11.8%、56.8%、36.3%、24.3%、48.2%及 27.7%, 而柠檬酸的最高产量低于其纯培养的 35.1%; 蛋白组分析显示, 地衣芽孢杆菌诱导酿酒酵母胞内 69 个蛋白差异表达(>2 倍), 质谱鉴定出 24 个, 主要功能为参与糖酵解过程、乙醇代谢过程、细胞壁稳定性调控及应激反应等。糖酵解和乙醇代谢途径相关蛋白对酿酒酵母混合培养条件下的代谢变化起重要作用, 其余蛋白可能与微生物相互作用时的防御和适应性相关。【结论】在混合培养发酵体系中地衣芽孢杆菌能够影响酿酒酵母的乙醇及有机酸代谢, 这对于白酒品质调控及微生物间相互作用都具有重要意义。蛋白组学结果为从分子层面深入认识酿酒酵母与地衣芽孢杆菌之间的相互作用提供理论基础, 有利于促进酱香型白酒发酵过程中群体微生物酿造特征的解析。

关键词: 酱香型白酒, 酿酒酵母, 地衣芽孢杆菌, 乙醇, 有机酸, 蛋白组

Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus licheniformis* and interaction mechanisms based on proteomic analysis

MENG Xing WU Qun XU Yan*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102108, 2012AA021301); 国家自然科学基金项目(No. 31371822, 31271921); 中国博士后科学基金项目(No. 2014M550265); 江苏省优势学科建设 111 项目(No. 111-2-06); 江苏省现代工业发酵协同创新中心行业发展项目

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918201; Fax: 86-510-85864112; 邮箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-01-12; **接受日期:** 2015-03-16; **优先数字出版日期(www.cnki.net):** 2015-04-10

Abstract: [Objective] To better understand the behavior of microbial community during Chinese Maotai-flavor liquor fermentation, we studied the interaction between two functional strains, *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus licheniformis*. [Methods] *S. cerevisiae* and *B. licheniformis* were tested in single and mixed culture. Biomass, ethanol and organic acid production were determined during the fermentation. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) coupled with matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to analyze and identify differentially expressed protein of *S. cerevisiae* in single and mixed culture. [Results] *S. cerevisiae* showed a negative effect on *B. licheniformis* growth and the growth of itself was barely influenced. However, ethanol, pyruvic acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid and succinic acid produced by *S. cerevisiae* in mixed culture have increased by 11.8%, 56.8%, 24.3%, 36.3%, 27.7% and 48.2% compared with its single culture, respectively. Citric acid yield was reduced by 35.1%. Proteomic profile of *S. cerevisiae* indicated that 69 spots (differential ratio>2) were differentially expressed in mixed culture. Among them, 24 protein spots were identified, including protein related to glycolysis, ethanol fermentation, cell wall integrity, and stress response. [Conclusion] *B. licheniformis* affected ethanol and organic acid metabolism of *S. cerevisiae*. That was significant for liquor quality and microbial interactions. Proteomic analysis of the responses of *S. cerevisiae* to mixed culture allows a deeper understanding of interaction mechanisms between both strains and will promote the understanding of the microbial community during Chinese Maotai-flavor liquor fermentation.

Keywords: Maotai-flavor liquor, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus licheniformis*, Ethanol, Organic acid, Proteomic

酱香型白酒发酵为典型的开放式发酵,其中包含多种多样的微生物。微生物是发酵的动力,其稳定性对白酒的品质及安全具有重要意义。发酵过程中群体微生物的研究主要包含4个部分:微生物群体组成、微生物个体功能、微生物间相互作用以及从群体微生物水平对发酵过程进行预测和控制^[1]。其中,微生物间相互作用的研究是群体微生物功能研究的支柱,微生物间通过彼此影响,改变个体的生长及发酵特征,继而改变微生物群体的整体结构与功能,最终影响发酵食品的安全与品质^[2]。因此,微生物间相互作用的研究对于白酒酿造机制的认识以及酿造技术发展具有重要作用,是今后酿造微生物学的研究重点。

酵母与细菌相互作用是食品发酵生产过程中最重要的相互作用,对产品风味及品质起决定性作用^[3]。目前,葡萄酒、乳酪、腌菜等发酵食品中酵母与乳酸菌及醋酸菌之间的相互作用已得到广泛而深入的研究^[4]。尽管这些研究结果为发酵食品稳定性及风味调控提供了一定指导,然而多数研究都是描述性的,对于相互作用背后的机理及分子作用

知之甚少^[7]。组学技术为研究发酵微生物群体间相互作用机制开辟了新的路径^[8-9]。基因组学、转录组学和蛋白质组学分别从DNA、mRNA和蛋白质3个水平对生命活动进行研究。蛋白质是生命活动的真正执行者,因而采用大规模、高通量、高灵敏度的基于质谱分析技术的蛋白质组学技术手段,全局性的研究某一生物或细胞在特定时间与空间条件下所有蛋白质的表达谱和功能谱,有助于在整体水平上阐明生命现象的本质和活动规律^[10],从而全面和深入地认识群体微生物间复杂的相互作用。Herve-Jimenez等^[9]首次将蛋白质组学技术应用于酸奶发酵过程中微生物间相互作用的研究,并成功解析了德氏乳杆菌影响嗜热链球菌氨基酸及嘌呤代谢差异的部分机理。然而,由于蛋白质组学技术的复杂性,利用该方法研究酵母细菌间相互作用的相关文献尚未见报道。

酱香型白酒酿造微生物中以酵母与细菌占据绝对优势^[11],其主要微生物类群和数量演变规律及其与酒体中特征成分关系的研究已取得较大进展^[12],而由于酱香型白酒发酵工艺的复杂性以及微生物

多样性,主要功能性微生物之间相互作用的研究国内至今鲜有报道。酿酒酵母是整个白酒发酵过程的优势菌株,负责酿造过程中的酒精发酵,并能够产生酯类、醇类以及乙酯类物质,对于白酒发酵速率、风味以及品质具有重要的贡献。细菌以芽孢杆菌属为主导,其中地衣芽孢杆菌能够产生 C4 类化合物,如吡嗪类化合物、挥发性酸、芳香族以及酚类化合物等,是影响酱香型白酒口感品质的重要菌株^[13]。本文以酿酒酵母和地衣芽孢杆菌为出发菌株,构建纯培养及混合培养发酵体系并结合蛋白组学及质谱技术,研究二者之间的相互作用,有利于深入理解酵母细菌间互作的分子机理,同时对加快实现对白酒酿造过程中微生物的定向调节与控制具有重要的理论价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 酿酒酵母(*S. cerevisiae*, CCTCC M2014463)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*, CGMCC 3962),均筛选自茅台酱香型白酒酿造酒醅中。

1.1.2 培养基: 种子培养基(g/L): YPD 液体培养基为酵母浸提物 10,蛋白胨 20,葡萄糖 20; LB 液体培养基为酵母浸提物 5,蛋白胨 10,氯化钠 10。菌落计数平板: YPD 与 LB 平板培养基(添加 0.2%琼脂粉);发酵培养基: 高粱汁^[14]。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养: 将于-80℃冻藏的酿酒酵母与地衣芽孢杆菌分别于 YPD 及 LB 液体培养基中活化 16 h 后接入发酵培养基,接种浓度均为 1×10^6 CFU/mL。培养方式为酵母纯培养,细菌纯培养以及酿酒酵母与地衣芽孢杆菌混合培养,混菌接种比例参考酱香型白酒发酵堆积酒醅入池发酵前酿酒酵母与地衣芽孢杆菌生物量之比^[15],按 1:10 接种,于 30℃、200 r/min 培养 48 h。定时取样,测定生物量、乙醇及有机酸产量,并取 24 h 酿酒酵母发酵样品做蛋白组学分析。

1.2.2 生物量测定: 平板计数法用于活菌生物量测定,YPD 平板用于酵母计数, LB 平板用于细菌计数。

1.2.3 乙醇含量测定: 乙醇采用液相色谱法测定,色谱条件为:分离柱 Bio-Rad 87H 色谱柱,示差折光检测器,流动相 0.05 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.6 mL/min,进样量为 10 μL,柱温为 60℃,波长为 215 nm,保留时间为 25 min。

1.2.4 有机酸含量测定: 有机酸采用液相色谱法测定,色谱条件为:分离柱为 Atlantis T3 C18 色谱柱,流动相为 0.5% (NH₄)₂HPO₄ (pH 2.7),流速为 0.8 mL/min,进样量为 10 μL,紫外检测器波长 215 nm,柱温为 30℃,保留时间为 20 min,有机酸标准品为丙酮酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸及乳酸。发酵液测定前离心(12 000 r/min, 20 min)取上清,用 0.22 μm 孔径的水系微膜过滤。

1.2.5 蛋白提取: 300 mL 酿酒酵母纯培养及混合培养发酵培养液离心(5 000 r/min, 15 min),收集菌体,用超纯水多次洗涤至不含发酵培养基杂质。以 4 mL 细胞裂解液(8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、质量分数 4% CHAPS、1%蛋白酶抑制剂)悬浮细胞,冰浴超声破碎(3 s/2 s) 30 min,完毕后离心(14 000 r/min, 30 min)。

使用 Clean-up 试剂盒(GE)进行蛋白质沉淀。上样前将蛋白质复溶于 1 mL 水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、质量分数 4% CHAPS、65 mmol/L DTT、质量分数 1% pH 3.0-10.0 的 Bio-Lyte、体积分数 0.002%溴酚蓝)中,4℃放置 1 h 后离心(12 000 r/min, 5 min),取上清,使用非干扰性蛋白质浓度测定试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]做蛋白浓度测定。

1.2.6 双向电泳: 按照 GE 公司的《双向电泳操作手册》分别于 IPG 等电聚焦系统(GE)和 ETTAN DALTsix 电泳系统(GE)中进行一向等电聚焦电泳以及二向 SDS-PAGE 电泳,IPG 胶条长度 18 cm, pH 3.0-10.0。

1.2.7 图像扫描与分析: 采用激光扫描仪 Typhoon

9400 (GE) 获得双向电泳蛋白表达图像, ImageMaster™ 2D platinum 7.0 软件分析图像, 找出差异倍数大于 2 的点。

1.2.8 差异蛋白点鉴定及分析: 选取的蛋白质点经切点、酶解、肽段回收、点靶等步骤, 采用 Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪(Bruker Dalton)进行质谱分析, UV 波长 355 nm, 重复速率 200 Hz, 加速电压 20 000 V, 最优质量分辨率 1 500 D。扫描质量范围为 700–3 200 D, 收集信号。胰酶自切峰为质谱仪校正内标。实验样品质谱图以默认模式获得。数据库检索: 利用 Biotoools (Bruker Dalton) 软件搜索 Mascot 数据库, 寻找相匹配的蛋白质; 利用 UniProt 数据库进行蛋白功能查询。

2 结果与分析

2.1 纯培养及混合培养体系中微生物的生长特征

分别以酿酒酵母及地衣芽孢杆菌的纯培养为对照, 研究二者在混合培养体系下的生长特征, 定性二者之间的相互作用关系。如图 1 所示, 酿酒酵母在纯培养与混合培养体系下生长表现一致, 没有差异, 表明地衣芽孢杆菌对酿酒酵母的生长没有影响; 地衣芽孢杆菌在纯培养体系中生长良好, 最高生物量达 2×10^8 CFU/mL, 而在混合培养体系中, 地衣芽孢杆菌的活菌数持续下降, 最终生物量约为

1×10^2 CFU/mL, 说明其生长受到了酿酒酵母的抑制作用。该研究结果与前期报道一致, 且认为该抑制作用可能源于酿酒酵母所产的酸类以及蛋白质类物质^[16]。

2.2 酿酒酵母纯培养与混合培养条件下乙醇代谢差异

以酿酒酵母纯培养为对照, 研究其在混合培养条件下的乙醇产量差异。如图 2 所示, 在整个发酵过程中, 酿酒酵母在两种培养体系下的最高产醇量分别约为 13.1 g/L 和 11.7 g/L, 混合培养体系下的最高产醇量高于其纯培养 11.8%。两种培养体系在 24 h 之前的差距较大, 之后差距缩小, 可能是由于在后期地衣芽孢杆菌死亡较多, 其数量可能不足以对酿酒酵母的乙醇代谢产生影响。从白酒风味上看, 乙醇是白酒的主体, 同时也是酯类等物质的形成前体, 在白酒酿造中发挥极其重要的作用; 从微生物间相互作用上看, 乙醇是酿酒酵母抑制其他微生物生长, 维持自身发酵主导地位的重要因素之一, 同时也可作为信号分子参与到种间相互作用之中^[8,17]。在混合培养体系中, 酿酒酵母自身生长未受地衣芽孢杆菌影响, 但是自身的乙醇代谢却提高了, 这一方面可能是由于混合培养初期细菌与酵母之间的营养及氧气竞争, 也有可能是酿酒酵母对外界入侵者的一种应答反应。

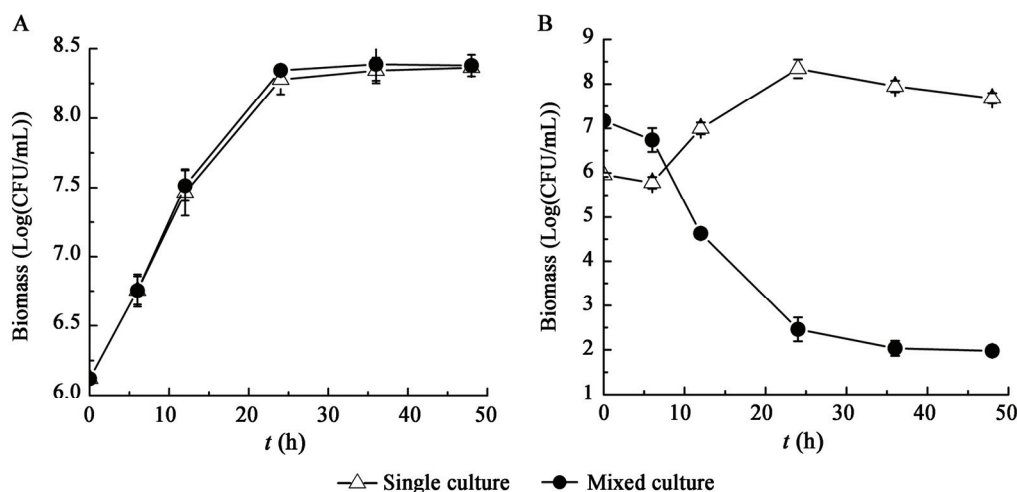


图 1 纯培养及混合培养体系中酿酒酵母(A)与地衣芽孢杆菌(B)生长曲线

Figure 1 The growth curve of *S. cerevisiae* (A) and *B. licheniformis* (B) in single and mixed culture

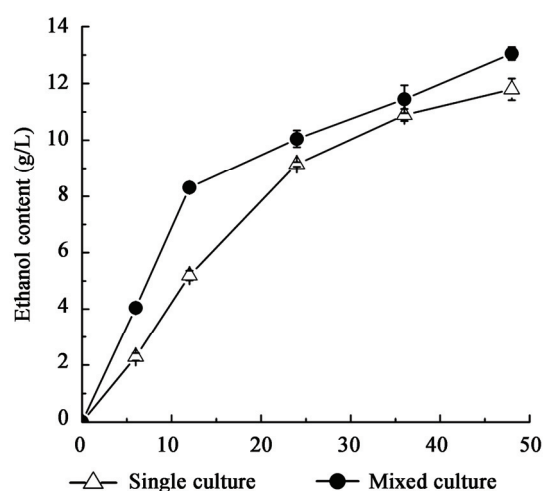


图2 纯培养及混合培养体系中酿酒酵母产醇曲线
Figure 2 The ethanol production of *S. cerevisiae* in single and mixed culture

2.3 酿酒酵母纯培养与混合培养体系中有机酸代谢差异

有机酸在各类香型白酒中举足轻重,具有除苦减涩压暴、稳定香气、柔和酒体等作用,丰富白酒香味和提高白酒质量^[18]。白酒中的常见不挥发性有机酸有乳酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。因此,研究了混合培养条件下有机酸类物质的产量变化,在整个发酵过程中对这5种有机酸以及丙酮酸质量浓度变化进行定性定量跟踪监测,结果见图3。

总体看来,6种有机酸的最终产量以苹果酸最高,乳酸次之,其次为琥珀酸和酒石酸,柠檬酸和丙酮酸的产量最低,混合培养体系中柠檬酸的产量低于纯培养体系,其余5种有机酸的产量则高于纯培养体系。丙酮酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸及酒石酸的最高产量分别高出其纯培养56.8%、36.3%、24.3%、48.2%及27.7%,柠檬酸的最高产量低于其纯培养35.1%。丙酮酸是参与整个生物体基本代谢的中间产物之一,在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用^[19],混合培养体系中丙酮酸含量偏高,有利于酿酒酵母将丙酮酸用于合成其他的酸类、醇类等代谢物,这可能是乳酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸和乙醇的含量在混合培养体系中相对较

高的原因之一。而柠檬酸在混合培养体系中的积累较少,含量较低,可能是由于其在混合培养过程中作为碳源被酿酒酵母重新回归胞内利用或下游酶活较高所致^[20]。另外,柠檬酸含量若较高,将会抑制其上游柠檬酸合成酶的活性,从而减弱丙酮酸进入TCA循环的代谢流,不利于其余有机酸的生成^[21]。在微生物发酵过程中,有机酸的分泌还与离子代谢、代谢途径的相关酶系和代谢网络有关,有机酸跨膜运输及生存环境等有关^[20]。

2.4 酿酒酵母纯培养与混合培养体系中蛋白表达差异

为研究酿酒酵母在纯培养与混合培养发酵体系中蛋白表达差异,解析混合培养中酿酒酵母代谢表达差异原因及二者之间的相互作用,提取酿酒酵母在纯培养及混合培养24 h的胞内蛋白做双向电泳。软件分析共检测到402个蛋白点,其中69个蛋白点差异表达(图4),其中表达丰度升高的点有39个,表达丰度下降的点有30个。

2.4.1 差异表达蛋白MALDI-TOF-MS鉴定:选取44个差异表达明显的蛋白质点MALDI-TOF-MS质谱分析,成功鉴定出24个蛋白质点。其中,上调蛋白质点20个,下调蛋白质点4个。表1概括了鉴定的蛋白点的相关信息,包括蛋白质的名称、理论等电点、理论分子量、登录号、蛋白得分和差异蛋白比率。根据Uniprot数据库可将蛋白分为糖酵解途径相关蛋白,乙醇代谢途径相关蛋白,细胞壁稳定性相关蛋白,应激反应类蛋白以及与生长调控、转录、离子运输等相关的蛋白。

2.4.2 基于蛋白组数据的酿酒酵母代谢差异分析:纯培养与混合培养体系下酿酒酵母的蛋白组差异对于深入分析酿酒酵母与其他微生物之间的相互作用机理具有重要的价值。在混合培养条件下,酿酒酵母与糖酵解相关的代谢途径中7个蛋白的表达丰度全部上调,包括果糖二磷酸醛缩酶、二氢硫辛酸脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶以及烯醇化酶等,推测混合培

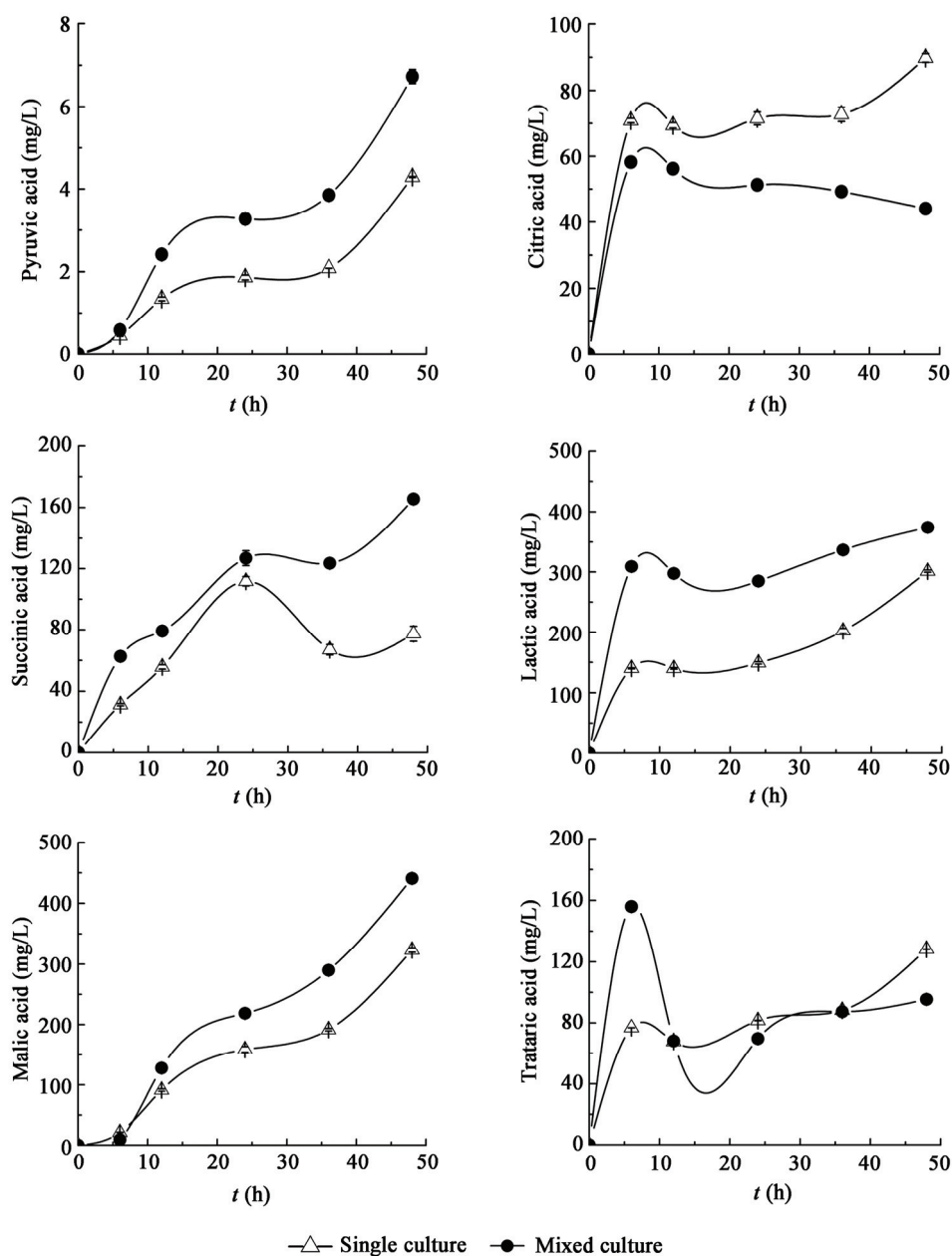


图3 纯培养及混合培养体系中6种有机酸动态变化

Figure 3 The organic acid production of *S. cerevisiae* in single and mixed culture

养体系有可能促进了酿酒酵母的糖酵解。糖酵解的最终产物是丙酮酸，因此糖酵解途径的上调可能使得丙酮酸的产量增加。混合发酵体系下，酿酒酵母丙酮酸最高产量高于其纯培养 56.8%，这可能证实了地衣芽孢杆菌促进酿酒酵母糖酵解途径的推测，但由于差异蛋白中并没有鉴定出糖酵解途径中关

键性限速酶己糖激酶、6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等的差异表达^[19]，因此具体结论仍需进一步研究确定。丙酮酸可以在丙酮酸羧化酶及乙醇脱氢酶的催化作用下，增加乙醇代谢通量。混合培养体系下，酿酒酵母乙醇代谢方向的丙酮酸脱羧酶(gi|4109)和乙醇脱氢酶(gi|6324486)分别上调了 2.66 和 2.01 倍，

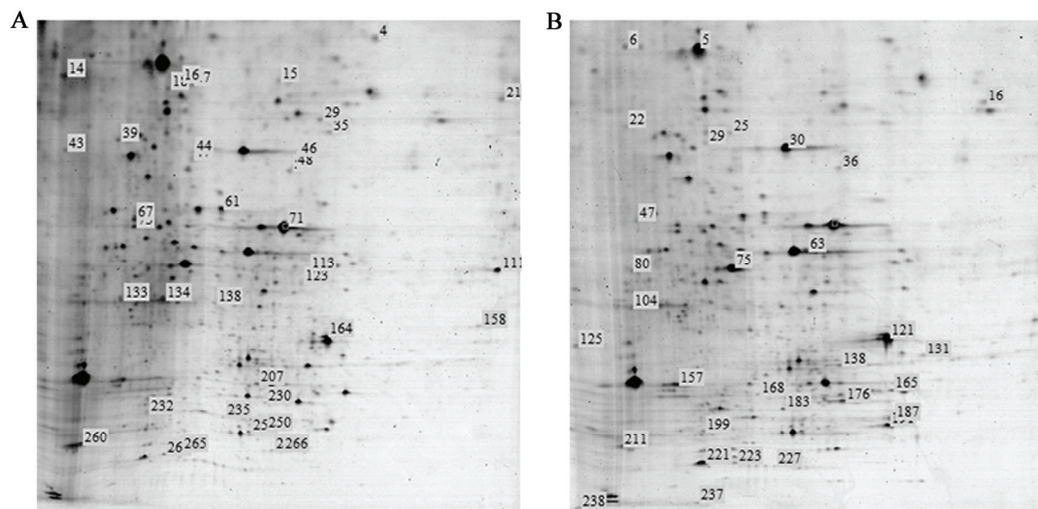


图 4 酿酒酵母纯培养(A)与混合培养(B)发酵体系中胞内差异表达蛋白位点

Figure 4 Protein spots differentially expressed of *S. cerevisiae* in single (A) and mixed (B) culture

表明酿酒酵母在混合培养条件下将可能会提高乙醇产量,这可能是混合培养体系中酵母乙醇代谢提高的重要原因。此外,因糖酵解途径而高产的丙酮酸除可以增加乙醇代谢流以外,也可在丙酮酸羧化酶条件下提高 TCA 循环的代谢流,或在乳酸脱氢酶催化下生成乳酸^[19],这可能也是实验测定中混合培养体系下乳酸、苹果酸、琥珀酸相对较高的原因之一,柠檬酸含量相对较低可能是由于其下游酶活较高或当作碳源被酵母重新利用消耗^[20]。

2.4.3 基于蛋白组数据的酵母细菌相互作用分析:除与代谢相关的差异蛋白外,部分差异蛋白可能与微生物间的相互作用直接相关。细胞壁是保护细胞的屏障,同时也具有物质运输与信息传递的作用,因此在微生物相互作用中发挥重要作用。在差异蛋白中,与酿酒酵母细胞壁完整性相关的蛋白 Bgl2p 下调 6.66 倍, Lsp1p 上调 12.31 倍。其中, Bgl2p 是 β -1,3-葡聚糖转移酶^[22],功能与酵母细胞壁中葡聚糖间的 β -1,6-糖苷键的形成相关,其下调可能不利于酵母细胞壁的稳定,而 Lsp1p 与细胞壁 β -1,3-葡聚糖的合成相关,参与细胞完整性信号通路,其上调则利于维持细胞壁的合成及完整性^[23]。这意味着酿酒酵母在混合培养的过程中可能存在着一套

精巧的细胞壁开合的调节途径,这种途径一方面有利于酵母胞内物质的释放,缓解酵母细胞内部压力,另一方面可能有利于在混合培养过程中保护自身免受其他微生物的伤害。Hsp12p 能够保护高渗条件下细胞膜的完整性^[24],其下调可能表示混合培养条件下的酿酒酵母并不存在于高渗的环境,或者除此之外有其他的调节途径。

抗氧化蛋白及与应激相关的蛋白的表达通常是微生物细胞在胁迫条件下的自我保护机制,能够提高细胞对环境的适应性。在差异蛋白中,共有 9 个与抗氧化及抗压能力相关的蛋白表达丰度发生抗氧化蛋白及与应激相关的蛋白的表达通常是微生物细胞在胁迫条件下的自我保护机制,能够提高细胞对环境的适应性。在差异蛋白中,共有 9 个与抗氧化及抗压能力相关的蛋白表达丰度发生变化,其中有 7 个上调,2 个下调(表 1)。抗氧化相关的蛋白主要是超氧化物歧化酶(gil6322564, gil6321796, gil86559466)。通常情况下,超氧化物歧化酶的表达量在发酵细胞中比较低,然而在当细胞处于饥饿、呼吸的状态或者乙醇存在的条件下,其表达量就会上调^[25-27]。混合培养体系下乙醇的相对较高含量可能是促使其上调的原因之一。抗外界压力相关的蛋

表 1 经质谱鉴定的差异表达蛋白
Table 1 Differentially expressed proteins identified by MS

编号 Spot number	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession number	得分 Score	分子量 Mr (Da)	等电点 pI	比值 Ratio
Glycolysis						
75	Fructose-bisphosphate aldolase FBA1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6322790	239	39 620.77	5.51	2.01
187	Dihydrolipoyl dehydrogenase [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 14318501	119	54 010.05	8.07	3.08
158	Phosphoglycerate mutase	gi 223471	115	26 916.72	9.05	4.37
121	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase TDH3 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 398366083	194	35 746.67	6.46	2.11
164	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase TDH2 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6322468	87	35 846.85	6.46	2.21
63	Triosephosphate isomerase Tpi1p [<i>S. cerevisiae</i> FostersO]	gi 323309847	99	26 775.85	5.53	2.07
176	Enolase [<i>S. cerevisiae</i>]	gi 171455	269	46 802.11	6.16	3.80
Ethanol fermentation						
207	Alcohol dehydrogenase ADH1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6324486	222	36 849.17	6.21	2.01
253	Pyruvate decarboxylase [<i>S. cerevisiae</i>]	gi 4109	103	60 073.85	5.83	2.66
Antioxidant						
30	Superoxide dismutase SOD1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6322564	82	15 854.60	5.62	4.90
71	Superoxide dismutase SOD2 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6321796	284	25 774.22	8.49	2.66
266	Catalase T [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 86559466	221	64 583.35	6.09	2.42
Cell wall and membrane						
134	Bgl2p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6321721	332	34 118.60	4.32	-6.66
157	Lsp1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6325253	249	38 071.16	4.62	12.31
5	Hsp12p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 14318506	180	11 692.71	5.22	-3.22
Stress response						
235	Stress protein DDR 48 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6323826	127	46 233.15	4.22	2.12
223	Hsp70 family ATPase SSC1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6322505	184	70 627.84	5.48	2.48
265	Hsp70 family ATPase SSB1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6319972	174	66 601.60	5.32	2.51
221	Hsp70 family ATPase SSA1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 144228166	357	69 657.25	4.99	2.06
61	Pst2p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6320235	135	20 965.66	5.46	-2.08
Growth regulation						
133	Bmh1p [<i>S. cerevisiae</i>]	gi 671634	179	30 176.50	4.87	2.03
Transcription						
268	Wtm1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 398365853	162	48 382.74	5.17	2.53
Ion transport						
191	Chain A, crystal structure of yeast mitochondrial F1-ATPase	gi 119389904	481	54 944.66	6.73	2.13
Proteolysis						
211	Carboxypeptidase C PRC1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	gi 6323955	159	59 802.12	4.56	-2.50

白主要是 Hsp70-Ssa 家族的热休克蛋白(gi|6322505, gi|6319972, gi|144228166),其通常在细胞受到热激、氧化压力时表达上调。此外, Hsp70-Ssa 家族的蛋白在细胞壁完整性信号通路中也可能发挥一定的作用,其上调可能是对与地衣芽孢杆菌间接触接触的应激反应^[28]。

在混合培养体系中,还存在与酿酒酵母生长调控、转录、离子转运以及水解作用等相关的蛋白表达发生变化,这些蛋白在酿酒酵母的代谢调控上发挥着重要作用,如 Bmh1p 蛋白可在葡萄糖阻遏作用、细胞周期调节、DNA 损伤应答、囊泡运输、生长控制等多条信号转导路径中发挥作用^[29-31], Wtm1p 为酿酒酵母的转录调节子^[32]。

蛋白组学的应用在一定程度上解析了酿酒酵母在混合培养发酵体系中的代谢变化机理,也首次从分子层面认识了酿酒酵母与地衣芽孢杆菌之间的相互作用,该结果能够为解析酱香型白酒发酵过程中群体微生物的酿造特征提供理论指导,同时也可为酱香型白酒酿造过程中其他微生物之间相互作用的研究提供参考。

3 结论

在酱香型白酒酿造过程中,酿酒酵母与地衣芽孢杆菌的相互作用对白酒品质具有重要的控制作用。本文研究了两者相互作用机制,建立纯菌与混菌模拟发酵体系,比较不同发酵模式下生物量、乙醇及有机酸代谢差异,并首次将 2D-PAGE 结合质谱技术应用于研究白酒酿造体系中微生物间相互作用。研究发现,混菌发酵体系中,酿酒酵母抑制了地衣芽孢杆菌的生长,其自身生长不受影响,而代谢却受地衣芽孢杆菌的影响,乙醇及有机酸中的丙酮酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸的代谢产量均提高,柠檬酸产量下降。这些变化对于白酒品质及微生物间相互作用都具有重要意义。(1) 乙醇是白酒的主体,也是白酒形成其他酯类物质的前体物质,有机酸具有斧正白酒香气和口味,延长、丰富白酒味感的作用,能够使酒体表现出应有的层次感,它

们的产量变化有利于丰富白酒的香味,提升白酒品质;(2) 乙醇及酸类物质是酿酒酵母在发酵过程中抑制其他微生物生长的重要物质,能够维持自身在发酵过程中的主导地位。

蛋白组技术应用于分析酿酒酵母纯培养及混合培养体系下的蛋白表达差异,共发现地衣芽孢杆菌诱导了酿酒酵母 69 个差异表达蛋白,由于一些凝胶点较淡,蛋白量过少或实际蛋白分子量和等电点与理论值差异过大等因素导致一些蛋白点未鉴定出来,成功鉴定的蛋白质共有 24 个,对差异蛋白的功能分析发现,酿酒酵母代谢变化的机制可能是源于混合培养发酵条件下地衣芽孢杆菌促进了酿酒酵母的糖酵解。该途径的上调能够提高丙酮酸产量,之后酿酒酵母利用丙酮酸将其转化为乙醇及有机酸等物质,最终提高了乙醇及部分有机酸的代谢。然而,由于没有鉴定出酿酒酵母糖酵解途径中己糖激酶、6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等关键酶的差异表达,该推测仍有待进一步证实。微生物间相互作用是一个复杂的网络,该结果可以为今后酿酒酵母与地衣芽孢杆菌互作机理的研究提供一个重要的研究方向;此外,差异蛋白中的一部分蛋白可能直接参与了微生物之间的相互作用,包括抗氧化蛋白、热休克蛋白以及细胞壁完整性相关的蛋白等,这些蛋白的研究对于认识微生物间相互作用的防御机制,提高微生物适应性,增强群体微生物发酵稳定性具有重要意义。

本研究结果对于深入认识白酒酿造过程中酿酒酵母与地衣芽孢杆菌的相互作用及其机理具有一定的理论价值,同时组学技术的应用及组学数据的深入挖掘将会帮助我们更准确、快速地认识微生物之间的相互作用,从而加快实现对白酒酿造过程中微生物的定向调节与控制。

参考文献

- [1] Little AE, Robinson CJ, Peterson SB, et al. Rule of engagement: Interspecies interaction that regulate microbial communities[J]. Annual Review of Microbiology, 2008, 62: 375-401
- [2] Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking[J]. FEMS Yeast

- Research, 2010, 10(2): 123-133
- [3] Viljoen BC. Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents[A]/Querol A, Fleet G. Yeasts in Food and Beverages[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 83-110
- [4] Franco W, Pérez-Díaz IM. Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(1): 161-172
- [5] Sudun, Wulijideligen, Arakawa K, et al. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk[J]. Animal Science Journal, 2013, 84(1): 66-74
- [6] Wang Z, Yan M, Chen X, et al. Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 79: 41-45
- [7] Sieuwerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J, et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 4997-5007
- [8] Maligoy M, Mercade M, Coccagn-Bousquet M, et al. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 485-494
- [9] Herve-Jimenez L, Guillouard I, Guedon E, et al. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 2062-2073
- [10] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207
- [11] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese *Maotai-flavor* liquor[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2183-2190
- [12] Wang XL, Wang DL, Han XL, et al. A review of current research and application about Chinese liquor microorganisms[J]. Liquor Making Science and Technology, 2009(6): 88-91 (in Chinese)
王旭亮, 王德良, 韩兴林, 等. 白酒微生物研究与应用现状[J]. 酿酒科技, 2009(6): 88-91
- [13] Zhang R, Wu Q, Xu Y. Aroma characteristics of Moutai-flavour liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid-state fermentation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(1): 11-18
- [14] Wu Q, Ling J, Xu Y. Starter culture selection for making Chinese sesame-flavored liquor based on microbial metabolic activity in mixed-culture fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(14): 4450-4459
- [15] Wu XJ. Diversity and dynamics of yeasts and bacteria during the solid state fermentative process contributing to Chinese *Maotai-flavor* liquor making[D]. Jiangsu: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
吴徐建. 酱香型白酒固态发酵过程中酵母与细菌群落结构变化规律的研究[D]. 江苏: 江南大学硕士学位论文, 2013
- [16] Ling J, Wu Q, Xu Y, et al. Interactions between *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of soy-sauce flavor liquor[J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2014-2021 (in Chinese)
凌杰, 吴群, 徐岩, 等. 酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的相互作用[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2014-2021
- [17] Kacmar J, Gilbert A, Cockrell J, et al. The cytostat: a new way to study cell physiology in a precisely defined environment[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(2): 163-172
- [18] He YM. Discussion on the involatile acids in liquor[J]. Liquor Making, 2007(6): 56-58 (in Chinese)
何育明. 论白酒中的不挥发酸[J]. 酿酒科技, 2007(6): 56-58
- [19] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002 (in Chinese)
王镜岩, 朱胜庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002
- [20] Sun FB, Ren HY, Zhao CX. Physiological and metabolic mechanism of organic acid production by brewer's yeast[J]. Science and Technology of Food Industry, 2005(5): 70-72 (in Chinese)
孙付保, 任洪艳, 赵长新. 啤酒酵母发酵产有机酸的生理代谢机制[J]. 食品工业科技, 2005(5): 70-72
- [21] Yang WZ, Xue YC, Nong XF, et al. Effect of citric acid on organic acids production in the process of beer brewing[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2008, 26(4): 313-315 (in Chinese)
杨文洲, 薛永常, 农晓帆, 等. 柠檬酸对啤酒酵母 TCA 循环中有机酸的影响[J]. 大连轻工业学院学报, 2008, 26(4): 313-315
- [22] Kalebina TS, Laurinavichute DK, Packeiser AN, et al. Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanotransferase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 210(1): 81-85
- [23] Delom F, Szponarski W, Sommerer N, et al. The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor[J]. Proteomics, 2006, 6(10): 3029-3039
- [24] Karreman RJ, Dague E, Gaboriaud F, et al. The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1774(1): 131-137
- [25] Costa V, Amorim MA, Reis E, et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt5): 1649-1656
- [26] Park JI, Grant CM, Davies MJ, et al. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress generation of free radicals during freezing and thawing[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(36): 22921-22928
- [27] Pereira MD, Herdeiro RS, Fernandes PN, et al. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1620(1/3): 245-251
- [28] Hasin N, Cusack SA, Ali SS, et al. Global transcript and phenotypic analysis of yeast cells expressing Ssa1, Ssa2, Ssa3 or Ssa4 as sole source of cytosolic Hsp70-Ssa chaperone activity[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 194
- [29] Panni S, Landgraf C, Volkmer-Engert R, et al. Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(1): 53-63
- [30] van Heusden GP. 14-3-3 proteins: insights from genome-wide studies in yeast[J]. Genomics, 2009, 94(5): 287-293
- [31] van Heusden GP, Steensma HY. Yeast 14-3-3 proteins[J]. Yeast, 2006, 23(3): 159-171
- [32] Pemberton LF, Blobel G. Characterization of the Wtm proteins, a novel family of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional modulators with roles in meiotic regulation and silencing[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(8): 4830-4841