

混菌发酵中不同分子量代谢产物对非酿酒酵母胞内蛋白及酒体有机酸的影响

翟明昌¹ 朴永哲² 王祥余³ 夏先锋¹ 沈海萍¹ 赵爽² 赵长新^{1*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 大连民族学院 生命科学学院 辽宁 大连 116600)

(3. 中粮华夏长城葡萄酒有限公司 河北 昌黎 066600)

摘要: 本研究采用透析袋发酵法研究了酿酒酵母产生的不同分子量代谢产物对非酿酒酵母胞内蛋白和酒体有机酸的影响。当截留分子量为 3.5 kD 和 10.0 kD 时非酿酒酵母的存活时间分别延长至 18 d 和 22 d, 表明通过改变菌种之间物质的交换可以调节非酿酒酵母的存活时间。蛋白质解析发现共有 65 个蛋白质斑点表达出现差异, 占蛋白质总数的 13%, 经质谱鉴定表明与这些蛋白同类固醇、赖氨酸、有机酸和 ATP 的生物合成有关。与截留分子量为 10 kD 的透析袋发酵相比, 在截留分子量为 3.5 kD 的混菌发酵中, 酒石酸含量升高 5.1%、醋酸含量下降 44.3%, 说明通过限定菌体间代谢产物的沟通可以调整酒的滴定酸度和挥发酸度。

关键词: 双向电泳, 透析袋发酵, 挥发酸度, 混菌发酵

Metabolites with different molecular weight influencing on intracellular protein of non-*Saccharomyces Cerevisiae* and wine organic acid

ZHAI Ming-Chang¹ PIAO Yong-Zhe² WANG Xiang-Yu³ XIA Xian-Feng¹
SHEN Hai-Ping¹ ZHAO Shuang² ZHAO Chang-Xin^{1*}

(1. College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

(3. Cofco Wine & Huaxia Winery Co., LTD, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: In this study, the effect of extracellular metabolites produced by *Saccharomyces cerevisiae* on intracellular protein expression of Non-*Saccharomyces cerevisiae* and on the quality of wine was investigated by dialysis tube fermentation method. By using dialysis tubes with molecular weight cut-off value of 10.0 kD and 3.5 kD respectively in the mixed fermentation, the survival time of non-

* 通讯作者: Tel: 86-411-84653977; ✉: zhaochangxin@126.com

收稿日期: 2011-05-19; 接受日期: 2011-07-01

S. cerevisiae was extended to 18 days and 22 days correspondingly. Consequently the survival time of non-*S. cerevisiae* can be changed by limiting the exchange of metabolites between strains. 65 proteins, namely 13% of the total protein, were found differently expressed, with mass spectrometry results indicating their close relation to the biosynthesis of steroids, lysine, organic acids and ATP. Compared with 10.0 kD dialysis tube fermentation, in 3.5 kD dialysis tube, the concentration of tartaric acid increased by 5.1% while acetic acid decreased by 44.3%, which indicates that by allowing communication of metabolism between cells with limited molecular weight, we can adjust the yield of wine's titratable acidity and volatile acidity.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis, Dialysis tube fermentation, Volatile acidity, Mixed fermentation

葡萄酒的自然发酵过程是一个多种菌交替作用的过程,一般发酵的初期由酒精耐受能力较弱但具有较高产香能力的非酿酒酵母来完成,但随着酒精浓度的不断升高非酿酒酵母的这种优势逐渐被酒精耐受能力较强的酿酒酵母代替^[1]。

混菌发酵过程中酿酒酵母不断地向外界环境分泌一些代谢产物,例如中长链的脂肪酸、酯类、一些起信号作用的多肽以及糖蛋白^[2-7]。近几年来关于这些代谢产物对非酿酒酵母生长代谢方面影响的研究逐渐增多,并得到一些初步结论,部分研究表明这些代谢产物一方面能够调节葡萄酒的风味,另一方面这些有机酸或蛋白在发酵液达到一定浓度后会抑制非酿酒酵母的生长^[4-5],而且一些蛋白质或多肽会诱导非酿酒酵母的提前衰亡^[8]。

透析袋发酵^[9]是指在混菌发酵过程中采用不同截留分子量的透析袋将酿酒酵母和非酿酒酵母隔开,通过不同截留分子量的透析袋来限制不同代谢产物的交换,从而实现对单独菌体的研究。

非酿酒酵母在外界不良环境的刺激下其外分泌物和细胞内部蛋白的表达会发生相应的变化,这些分泌物中有机酸对酒最终的滴定酸度和挥发酸度具有非常重要的作用,而蛋白表达的差异可以从细胞内部蛋白的变化找到非酵母细胞对外界刺激的适应机制。

本实验采用蛋白质组学和液相色谱法对不同代谢产物作用下耐热克鲁维酵母(即非酿酒酵母)胞内蛋白的变化及酒中有机酸成分的变化进行了研究,确定不同分子量的代谢产物对非酿酒酵母及酒风味的影响,为生产实践提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌种及培养基

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* FFC2144 大连工业大学菌种保藏中心),耐热克鲁维酵母(*Kluyveromyces. Thermotolerans* CBS2083 大连工业大学菌种保藏中心)。

培养基采用全合成培养基(g/L)^[10]:葡萄糖 200,柠檬酸 6, D,L-苹果酸 6, KH₂PO₄ 0.750, K₂SO₄ 0.500, MgSO₄·7H₂O 0.250, CaCl₂·2H₂O 0.155, NaCl 0.200, MnSO₄·H₂O 0.004, ZnSO₄ 0.004, CuSO₄·5H₂O 0.001, KI 0.001, CoCl₂·6H₂O 4×10⁻⁴, H₃BO₃ 0.001, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·2H₂O 0.001, NH₄Cl 0.300, YNB (Yeast nitrogen base without amino acids) 3.3。pH 3.3,该培养基经 1.0×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 混菌发酵生长曲线的测定方法:酵母菌生长变化情况通过平板计数法确定,在酿酒酵母和非酿酒酵母的纯培养中,直接将菌液经适当稀释后涂布于 YPDA (5 g 酵母提取物、10 g 蛋白胨、10 g 葡萄糖、20 g 琼脂粉、pH 5.6), 25 °C 培养 3 d。完全式混合培养中非酿酒酵母的生长速度测定方法参考文献[9]。

1.2.2 发酵方法透析:袋发酵法:将酿酒酵母接种于透析袋的内部,非酿酒酵母接种于透析袋的外部,接种浓度均为 1×10⁴ CFU/mL。完全混合式培养:培养液中分别接入浓度为 1×10⁴ CFU/mL 的酿酒酵母和非酿酒酵母。

1.2.3 残糖的测定方法:发酵液中残糖的测定采用

3,5-二硝基水杨酸法, 当发酵残糖小于 2 g/L 时认为发酵结束。

1.2.4 有机酸的测定^[11]: 发酵液中有机酸的测定采用高效液相色谱法: 本实验采用 SHIMADZU 液相色谱(LC-20AB pump、CTO-20A column oven、SPD-20A UV/vis detector), 色谱条件: 采用 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液作为流动相, pH 2.6, 流速 0.8 mL/min, 215 nm 处检测。

1.2.5 菌体细胞总蛋白的制备: 500 mL 发酵液(第 4 天)→10 000 r/min 离心 10 min, 得菌体→pH 7.0 的磷酸缓冲液清洗 3 次→加入 20 mL 的裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT)→超声波破碎(200 W, 工作 5 s、间歇 5 s, 60 次)→离心取上清→加入 0.2% 的 DTT, 10% 三氯乙酸 4 °C 沉淀 2 h→含有 DTT 的丙酮清洗 3 次→抽真空得到蛋白质粉末。

1.2.6 蛋白质双向电泳解析^[12-13]: 样品制作: 向上述得到的蛋白质粉末中加入适当体积含有 8 mol/L 尿素、2% (W/V) CHAPS、40 mmol/L DTT、2% 载体两性电解质(pH 3-10)的样品溶解液, 室温裂解 1 h。经离心后得到蛋白质样品, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。

胶条制作: 将 0.6 g 尿素、540 μ L 双蒸水、200 μ L 30% 丙烯酰胺溶液、24 μ L pH 4-6 载体两性电解质和 4.8 μ L pH 3-10 载体两性电解质溶液轻缓混匀后依次加入 5 μ L 10% 过硫酸铵和 4 μ L TEMED, 轻轻混匀, 快速吸取 90 μ L 上述混合液, 从玻璃管(直径 1 mm, 长 8 cm)的一端缓慢均匀灌入, 避免产生气泡, 室温聚合。

等电聚焦: 组装好圆盘电泳槽, 用微量进样器取准备好的样品液, 缓慢从玻璃管的上端注入, 使样品沉于胶面上, 确定上槽与玻璃管之间无渗漏, 倒入电泳缓冲液, 其中阴极电泳缓冲液: 20 mmol/L NaOH 150 mL, 阳极电泳缓冲液: 10 mmol/L 磷酸 200 mL。接通电源, 室温下 1 000 V 恒压电泳 4 h 进行等电聚焦。再将胶条从玻璃管中均匀挤出, 在组成为 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、30% (W/V) 甘油、2.3% (W/V) SDS、6 mmol/L 尿素的平衡缓冲液中平衡 30 min, 转移至 12% 分离凝胶上端, 30 mA 恒流进

行 SDS-PAGE 电泳。电泳所得到的凝胶进行高灵敏度的硝酸银染色。

1.2.7 凝胶图像的分析: 凝胶通过 BINTA 2020D 型凝胶成像系统进行拍照, 利用 Pduet 8.0 软件完成对凝胶图像的消减、斑点检测、匹配、量化、获取斑点位置坐标等分析。

1.2.8 蛋白质斑点的质谱解析方法: 蛋白质斑点的胶内消化基本步骤: 铁氰化钾、硫代硫酸钠清洗→3 遍水洗→乙腈、碳酸氢铵交替洗 3 次→DTT 还原→碘乙酰胺吸收→乙腈、碳酸氢铵再次清洗→蛋白酶消化(测序级、Promega)→肽段提取。将消化得到的肽段与质谱基质等体积混合, 室温下自然风干, 进行检测。肽段的查询: <http://www.matrixscience.com>, 菌种搜索范围: 真菌和微生物。

2 结果与讨论

2.1 不同发酵条件下非酿酒酵母生长曲线

由上图可见, 在完全混合发酵和两种透析袋发酵条件下非酿酒酵母的生长趋势基本一致, 但在生长速度、存活时间上存在一定的差别。生长速度方面: 由图可以看出, 发酵的前 2 天在各种发酵中非酿酒酵母的生长速度基本相同, 但从第 3 天开始生长速度出现差别, 即透析袋发酵的生长速度大于完全式混合的生长速度, 这就表明有些分子量大于 10.0 kD 的代谢产物对非酿酒酵母的生长起了抑制作用。而两种透析袋发酵的生长速度也存在差别, 截留分子量为 3.5 kD 的透析袋发酵生长速度较大, 同样说明有些分子量介于 3.5-10.0 kD 的代谢产物对非酿酒酵母的生长起了抑制作用, 上述结果结合一些最新研究^[8]可以得出, 酿酒酵母分泌的代谢产物无论分子量大小均有可能对非酿酒酵母的生长起抑制作用。存活时间方面: 由图 1 可见透析袋发酵中非酿酒酵母的存活时间明显长于完全混合式发酵, 分别延长至 18 d 和 22 d, 这与后期的死亡速率密不可分, 很有可能是细胞死亡后释放的部分胞内溶物对非酿酒酵母的死亡起一定的诱导作用, 通过限定不同分子量物质的沟通可以减弱这种诱导作用。由此可见混菌发酵中, 通过调整菌种之间部分物质的交换可以适当的调整非酿酒酵母的存活时间。

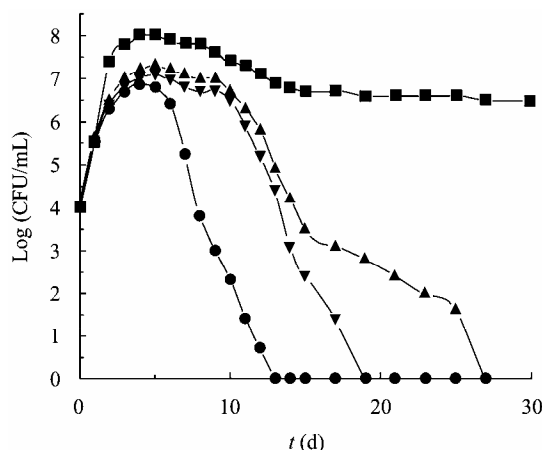


图1 不同发酵条件下非酿酒酵母生长变化情况线

Fig. 1 Biomass evolution of *K. thermotolerans* under different fermentations

注: ■: 纯培养; ●: 完全混合培养; ▲: 截留分子量为 3.5 kD 的混菌发酵; ▼: 截留分子量为 10.0 kD 的混菌发酵.

Note: ■: Single fermentation; ●: Full mixed fermentation; ▲: Dialysis tube fermentation with molecular weight cut-off value 3.5 kD; ▼: Dialysis tube fermentation with molecular weight cut-off value 10.0 kD.

2.2 双向电泳解析

由图 2 可以看出, 在不同发酵条件下非酵母菌胞内蛋白的总体分布基本一致, 蛋白质大部分集中在 pH 4-8 之间, 两种透析袋发酵分别检测到 495 个和 499 个蛋白质斑点。

浓度变化方面, 以 A 图作为空白组, 图 B 与图

A 相比较, 共有 65 个蛋白质斑点表达出现差异, 占蛋白质总数的 13% 左右。65 个变化的蛋白质斑点中, 有 33 个蛋白表达量下调, 28 个蛋白质上调, 并产生 4 个特异性蛋白质斑点。蛋白质表达的变化说明在不同分子量代谢产物作用下非酿酒酵母内部蛋白表达出现差异。这种差异的产生正是非酿酒酵母对外界环境的一种适应机制, 为进一步揭示在不同分子量代谢产物的作用下非酿酒酵母细胞内发生了什么变化, 也就是阐明非酿酒酵母体内的什么蛋白变化导致了它对外界环境的这种适应, 本研究选择浓度变化较大的 20 个蛋白质斑点进行了质谱分析。经分析共有 6 个蛋白质点被检出(表 1)。除两个未知蛋白外, 其他的蛋白分别参与了类固醇、赖氨酸、有机酸和 ATP 的生物合成。

2.3 不同发酵条件下几种主要有机酸的变化

酒石酸是葡萄酒发酵中产生量最大的有机酸, 酒石酸、柠檬酸和苹果酸等是构成酒最终滴定酸度的主要成分, 3 种有机酸的适量产生对调整酒最终滴定酸度和提高酒风味具有积极意义^[14]。由图 3 可见, 两种透析袋发酵中柠檬酸和苹果酸的浓度变化不大, 但酒石酸的浓度相差较大, 分别为 16.70 g/L 和 17.55 g/L, 相差 5.1%。也就是说通过限制酵母细胞间代谢产物的沟通可以适当提高酒的滴定酸度。

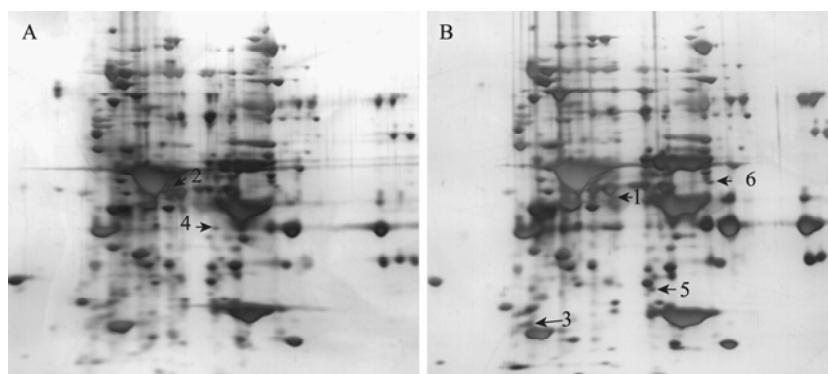


图2 两种透析袋发酵非酿酒酵母胞内蛋白双向电泳解析

Fig. 2 Two-dimensional PAGE analysis of global intracellular proteins of non-*Saccharomyces cerevisiae* under two disparate dialysis tube fermentation

注: pH 范围 3-10 (从左到右); A: 截留分子量为 3.5 kD 的透析袋发酵; B: 截留分子量为 10.0 kD 的透析袋发酵.

Note: pH range 3-10; A: Dialysis tube with molecular cut-off value of 3.5 kD; B: Dialysis tube with molecular cut-off value of 10.0 kD.

表 1 蛋白质质谱解析结果
Table 1 The results of protein spots identified by MALDI TOF/MS

编号及浓度变化趋势 Spot No. and concentration change	蛋白质名称 Protein names	数据库代码 Accession number	序列覆盖率 Sequence coverage (%)
1↑	4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	gi 283836573	33
2↓	Succinyl-diaminopimelatedesuccinylase	gi 154174233	21
3↑	Hypothetical protein PERMA_1430	gi 225850964	65
4↓	Hypothetical protein SCHCODRAFT_61226	gi 302674752	20
5↑	5-Formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	gi 145219705	31
6↑	V-ATPase C subunit	gi 94469226	22

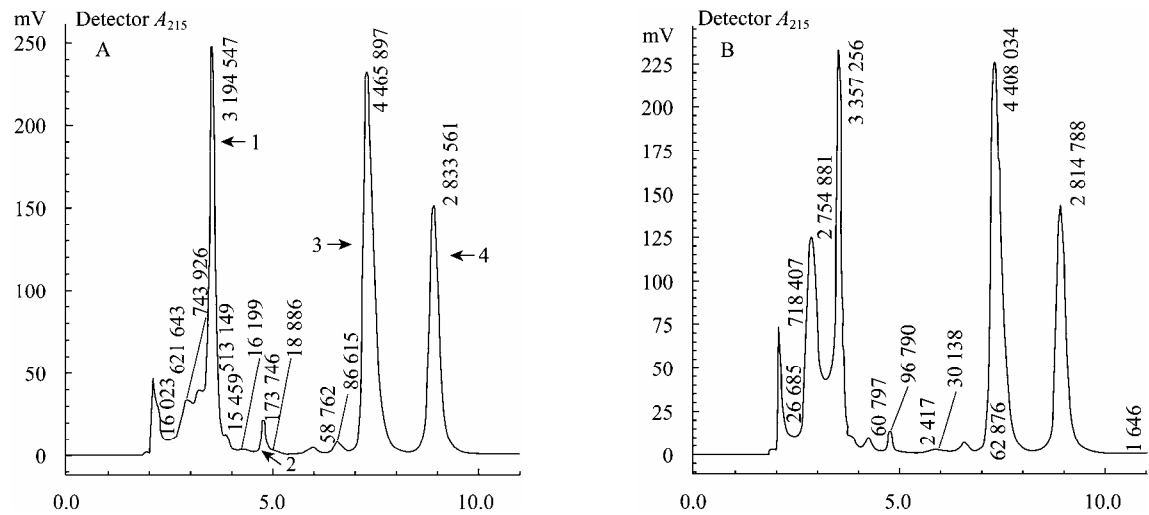


图 3 两种透析袋发酵条件下几种重要有机酸的变化

Fig. 3 Analysis on important organic acids under two disparate dialysis tube fermentation

注：1：酒石酸；2：醋酸；3：柠檬酸；4：苹果酸。A：截留分子量为 10.0 kD 的透析袋发酵；B：截留分子量为 3.5 kD 的透析袋发酵。

Note: 1: Tartaric Acid peak; 2: Acetic Acid peak; 3: Citric Acid peak; 4: Hydroxy succinic Acid. A: Dialysis tube with molecular cut-off value of 10.0 kD; B: Dialysis tube with molecular cut-off value of 3.5 kD.

醋酸是造成酒挥发酸度的主要原因，挥发酸对酒的风味产生不良影响，一般在发酵过程中酿酒酵母会产生相对比较高浓度的醋酸(0.25–0.50 g/L)等挥发酸，是挥发酸的主要产生者。本实验中醋酸的含量在两种透析袋发酵中差别较大，分别为 0.58 g/L 和 0.32 g/L，降低 44.3%，由此可见代谢物之间的沟通对于调节酒的挥发酸度至关重要。

3 结论

通过上述的实验可以得到以下结论：

(1) 通过对不同分子量代谢产物作用下非酿酒

酵母生长状况的研究表明，酿酒酵母产生的不同分子量的代谢产物会对非酵母菌的生长产生抑制作用，同时通过调整菌种之间部分物质的交换可以适当调整非酿酒酵母的存活时间。

(2) 通过对非酿酒酵母胞内蛋白的研究发现不同代谢产物作用下蛋白质表达存在差异，这种差异的产生恰好说明了 3.5–10.0 kD 代谢产物对非酿酒酵母起一定的抑制作用，这种抑制作用在内部蛋白表达上得到显现，为揭示酵母菌产生这种抗性机制的原因，采用 MALDI-TOF 对差异较大的蛋白斑点进行了分析，结果显示这种抗性机制与细胞内部类

固醇、赖氨酸、有机酸和 ATP 的生物合成有关。

(3) 通过不同孔径的透析袋限定酵母间物质的交换能够一定程度上调整酒的滴定酸度和挥发酸度, 限定物质之间的沟通一方面减少了代谢产物对酿酒酵母的抑制, 同时也减小了对非酿酒酵母的抑制, 增加了几种重要有机酸的分泌, 有利于酒风味的调整。

参考文献

- [1] Ciani M, Picciotti G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making[J]. *Biothechnology Letters*, 1995, 17(11): 1247-1250.
- [2] Viegas CA, Rosa MF, Sá-Correia I, et al. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(1): 21-28.
- [3] Edwards CG, Beelman RB, Bartley CE, et al. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification[J]. *Am J Enol Vitic*, 1990, 41(1): 48-56.
- [4] Bisson LF. Stuck and sluggish fermentations[J]. *Am J Enol Vitic*, 1999, 50(1): 107-119.
- [5] Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour[J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 86(1/2): 11-22.
- [6] Woods DR, Bevan EA. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Gen Microbiol*, 1968, 51(1): 115-126.
- [7] Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(3): 257-276.
- [8] Albergaria H, Francisco D, Gori K, et al. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(3): 965-972.
- [9] Nissen P, Arnebrog N. Characterization of early deaths of non-*saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Arch Microbiol*, 2003, 180(4): 257-263.
- [10] Cheraiti N, Guezenec S, Salmon JM. Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 255-260.
- [11] 杨文洲, 薛永常, 窦少华, 等. 不同碳源对酵母代谢有机酸的影响[J]. *中国酿造*, 2007, 175(10): 20-23.
- [12] 湛垚垚, 龙潜, 卢小霞, 等. 乙胺丁醇处理前后耻垢分枝杆菌 MC2155 细胞蛋白双向电泳图谱的差异分析[J]. *大连医科大学学报*, 2007, 29(9): 1-3.
- [13] 王祥余, 朴永哲, 翟明昌, 等. 酿酒酵母 FFC2146 胞内蛋白及胞外蛋白双向电泳条件优化及图谱建立[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(2): 270-274.
- [14] Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M, et al. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *World Microbiol Biotechnol*, 2007, 23(5): 735-739.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。