

文章编号: 1673 1689(2011)03-0453-05

# 绍兴黄酒成品麦曲中微生物胞外酶的双向电泳技术的建立

孔令琼<sup>1,2</sup>, 管政兵<sup>2</sup>, 陆健<sup>\* 1,2</sup>, 张波<sup>2</sup>, 商曰玲<sup>2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 应用宏蛋白质组学理论和思想, 利用双向电泳技术分离绍兴黄酒成品麦曲中主要包含各种微生物胞外酶的可溶性总蛋白。通过研究不同等电聚焦条件、不同 pH 值浸提缓冲液以及不同上样量等关键因素对双向电泳结果的影响, 建立了适合于绍兴黄酒成品麦曲微生物胞外酶的双向电泳条件, 得到了分辨率较高, 重复性较好的双向电泳图谱, 为进一步通过质谱分析手段全面鉴定麦曲中微生物胞外酶的组成, 明确其微生物来源奠定了基础。

**关键词:** 绍兴黄酒; 麦曲; 胞外酶; 宏蛋白质组学; 双向电泳

中图分类号: TS 262.4

文献标识码: A

## Establishment of a Two-Dimensional Electrophoresis Protocol for Extracellular Enzymes Excreted by Microorganisms from Shaoxing Rice Wine Wheat Qu

KONG Ling-qiong<sup>1,2</sup>, GUAN Zheng-bing<sup>2</sup>, LU Jian<sup>\* 1,2</sup>, ZHANG Bo<sup>2</sup>, SHANG Yue-ling<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this study, the two-dimensional (2-D) electrophoresis was used to separate the total extracellular enzymes were excreted by the microorganisms of wheat qu of Shaoxing rice wine. A 2-D electrophoresis technique which was suitable for the extracellular enzymes was established through investigating the the isoelectric focusing conditions, pH values of extraction buffer, and sampling volumes and other key factors on the effects of 2-D electrophoresis. It was demonstrated that the 2-D electrophoresis profiles had high resolution and good reproducibility. The results present here provided a basis for further identification of the extracellular enzymes excreted by the microorganisms from Shaoxing rice wine wheat qu by MALDI-TOF-MS/MS analysis.

**Key words:** Shaoxing rice wine, wheat qu, extracellular enzymes, metaproteomics, two-dimensional electrophoresis

收稿日期: 2010-05-25

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI63B06); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0790); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF200709)。

\* 通信作者: 陆健(1968-), 男, 江苏太仓人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酿造酒微生物与酶技术研究。Email: jlu@jiangnan.edu.cn

麦曲在黄酒的酿造过程中发挥着极其重要的作用,被喻为“酒之骨”,它不但是黄酒酿造的“粗酶制剂”,而且麦曲内蓄积了多种微生物的代谢产物,赋予了黄酒独特的风味<sup>[1-3]</sup>。研究表明,麦曲中微生物胞外酶主要是来源于各种霉菌和细菌分泌的各类水解酶系,包括淀粉酶系、蛋白酶系、纤维素酶系、半纤维素酶系、脂肪酶系等等。这些复合酶系共同作用将麦曲中的各种大分子物质(淀粉、蛋白质、脂肪等)分解为小分子物质,以便微生物的生长、繁殖、产酶、产酒<sup>[4-8]</sup>。

目前国内直接针对黄酒麦曲中微生物胞外酶的研究开展得较少,主要是利用色谱技术对麦曲中单一酶类进行纯化并开展酶学性质研究,如作者所在实验室就曾开展绍兴黄酒麦曲中 $\alpha$ -淀粉酶的分离、纯化及其酶学性质的研究<sup>[9]</sup>,通过现有的酶学研究方法,无法达到全面获取麦曲中微生物胞外酶组成,确定其微生物来源的目的。宏蛋白质组学(metaproteomics)<sup>[10-12]</sup>是最近几年被提出的新概念,其定义是指对某一特定环境中微生物群落的所有蛋白质进行大规模的分析和鉴定。宏蛋白质组的研究策略与经典的蛋白质组研究策略相似,主要包括环境总蛋白的提取纯化、蛋白质分离以及质谱鉴定和数据比对3个步骤。其中蛋白质的分离步骤一般采取双向电泳或液相色谱方法。本研究借助于宏蛋白质组学的理论和思想,利用双向电泳技术对绍兴黄酒成品麦曲中浸提出的所有可溶性蛋白(主要是各种微生物分泌的胞外酶蛋白,原料小麦的可溶性蛋白绝大部分已在固态发酵过程中被降解为小分子肽段<sup>[13]</sup>)进行高分辨率分离,为后续通过质谱分析手段大规模鉴定麦曲中的微生物胞外酶,并进一步弄清其微生物来源奠定基础。

由于双向电泳实验周期长、步骤繁琐、操作性强,实验过程中各个环节均影响双向电泳的分离效果,且直接关系到后期蛋白质谱分析的准确性和可靠性,对于不同来源的样品,一般都需要摸索出专用的实验条件。因此,针对某一具体样品的双向电泳实验方法的建立是高通量分析蛋白质混合物的先决条件。本研究的目标就是通过优化影响双向电泳结果的关键条件,建立一套高分辨率、高稳定性和高重复性的绍兴黄酒成品麦曲微生物胞外酶双向电泳技术体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 麦曲 绍兴黄酒机制麦曲:由浙江古越龙

山绍兴酒股份有限公司提供。

**1.1.2 试剂** 琼脂糖、溴酚蓝、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、固相IPG干胶条(非线性, pH 值为3~10, 7cm)、IPG Buffer(pH 值为3~10)、IPG覆盖液均为GE公司产品;CHAPS、脲为Amersham公司产品;Complete蛋白酶抑制剂混合片为Roche公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris碱、过硫酸铵、甘氨酸、考马斯亮蓝G-250、考马斯亮蓝R-250为纯化级产品;甲醇、正丁醇、甘油、冰醋酸、磷酸、三氯乙酸(TCA)、丙酮、乙酸钠、牛血清白蛋白均为国产分析纯产品。

**1.1.3 实验仪器** 等电聚焦电泳仪 Ettan IPG-phor 3: GE公司产品;高电流电泳仪: BIO-RAD公司产品;小型垂直电泳槽: BIO-RAD公司产品;TY-80S/80B脱色摇床: 生兴生物技术有限公司产品;JD-801凝胶电泳图像分析系统: 江苏省捷达科技发展有限公司产品;CR22G型高速冷冻离心机: 日本日立公司产品;Pico & Fresco17微量离心机: Thermo公司产品;UV-2100型紫外可见分光光度计: 尼龙柯仪器有限公司产品。

**1.1.4 溶液配制** 样品裂解液: 脲4.8 g, CHAPS 0.4 g, IPG缓冲液50  $\mu$ L, 加入双蒸水至总体积为10 mL(使用前加入20 mmol/L DTT)。

平衡液 I: 脲72.07 g, SDS 4.0 g, 1.5 mol/L Tris-HCl 6.7 mL(pH 8.8)、甘油69 mL、1 g/dL 溴酚蓝贮存液400  $\mu$ L, 加入双蒸水至200 mL, 使用前每10 mL加入DTT 100 mg。

平衡液 II: 脲72.07 g, SDS 4.0 g, 1.5 mol/L Tris-HCl 6.7 mL(pH 8.8)、甘油69 mL、1 g/dL 溴酚蓝贮存液400  $\mu$ L, 加入双蒸水至200 mL, 使用前每10 mL加入IAA 250 mg。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品制备

1) 粗酶液浸提: 称取25 g麦曲, 加入50 mL 0.09 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液和一片Complete蛋白酶抑制剂混合片, 在4℃条件下浸提过夜。然后依次用4层纱布、滤纸过滤, 滤液在10 000 r/min, 4℃条件下离心30 min, 上清液即为粗酶提取液。Bradford法测定蛋白含量<sup>[14]</sup>。

2) TCA-丙酮法沉淀蛋白: 取一定量粗酶提取液, 加入4倍体积的预冷丙酮溶液 I (含20 mmol/L DTT, 10 g/dL TCA), 摇匀, -20℃放置1 h 沉淀蛋白, 之后4℃下12 000 r/min离心30 min。弃上清, 收集沉淀。加入2 mL 预冷的丙酮溶液 II (含

20 mmol/L DTT),  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 1 h, 清洗沉淀,  $4^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min。重复清洗一次。弃上清, 收集沉淀, 然后置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 使丙酮完全挥发。

3) 沉淀溶解: 将干燥好的蛋白质沉淀加入适量的样品裂解液, 室温下充分溶解, 然后 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为麦曲宏蛋白质组样品。Bradford 法测定蛋白含量。

**1.2.2 双向电泳实验分析** 按照 GE 公司《双向电泳操作手册》进行水化上样和等电聚焦。在 Immobiline 干胶条再泡胀盘中加入适量麦曲宏蛋白质组样品, 将 IPG 干胶条水平放入其中, 加入少量 IPG 覆盖液, 水化过夜。水化过夜后的胶条转移到 Ettan IPGphor 胶条槽中, 设置等电聚焦程序进行等电聚焦。

等电聚焦结束后, 立即进行平衡。采用两步平衡法, 将 IPG 胶条先后在平衡液 I 和平衡液 II 中平衡 15 min。

平衡后进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 分离胶质量浓度为 12.5 g/dL ( $10\text{ cm} \times 7\text{ cm} \times 1\text{ mm}$ )。将平衡后的 IPG 胶条转移到已聚合的聚丙烯酰胺凝胶胶面顶端, 用 0.5 g/dL 的琼脂糖封闭, 排除胶条与胶面之间的气泡。以恒流方式进行电泳: 10 mA, 10 min, 然后电流调至 20 mA。当溴酚蓝指示剂迁移到凝胶底部时, 关闭电源, 结束电泳。

采用考马斯亮蓝染色法对凝胶进行染色。

**1.2.3 二维凝胶电泳分析** 脱色后的双向电泳凝胶用捷达 JD-801 凝胶电泳图像分析系统对其进行扫描分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 等电聚焦条件对双向电泳结果的影响

等电聚焦时间过长会导致电内渗和蛋白移动, 从而产生水平拖尾; 而聚焦时间过短, 会导致蛋白压缩不够紧密, 形成横向糊状拖尾。为研究等电聚焦的关键条件对本研究样品双向电泳效果的影响, 首先进行了等电聚焦条件的摸索。根据固相 IPG 干胶条(非线性, pH 3~10, 7 cm)使用说明书建议, 设定不同的等电聚焦总伏特小时数(Vh)进行试验。研究结果表明, 当总伏特小时数设定值为不低于  $7\,500\text{ V} \cdot \text{h}$  时, 样品的聚焦效果较好, 双向电泳图谱的分辨率较高。因此, 最终确定等电聚焦程序为: ①Step,  $300\text{ V} \times 2\text{ h}$ ; ②Gradient,  $1\,000\text{ V} \times 0.5\text{ h}$ ; ③Gradient,  $5\,000\text{ V} \times 1.5\text{ h}$ ; ④Step,  $5000\text{ V}$ ,  $2\,000\text{ Vh}$ 。

### 2.2 浸提缓冲液 pH 值对双向电泳结果的影响

黄酒大罐发酵过程中发酵醪液的 pH 值范围为 3.5~5.0 左右, 故本实验分别选取 pH 值为 4.2、4.4、5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸提麦曲, 制备麦曲的可溶性总蛋白样品。在上样量基本一致的条件(约  $100\text{ }\mu\text{g}$ )下进行双向电泳实验, 得到电泳图谱如图 1 所示。

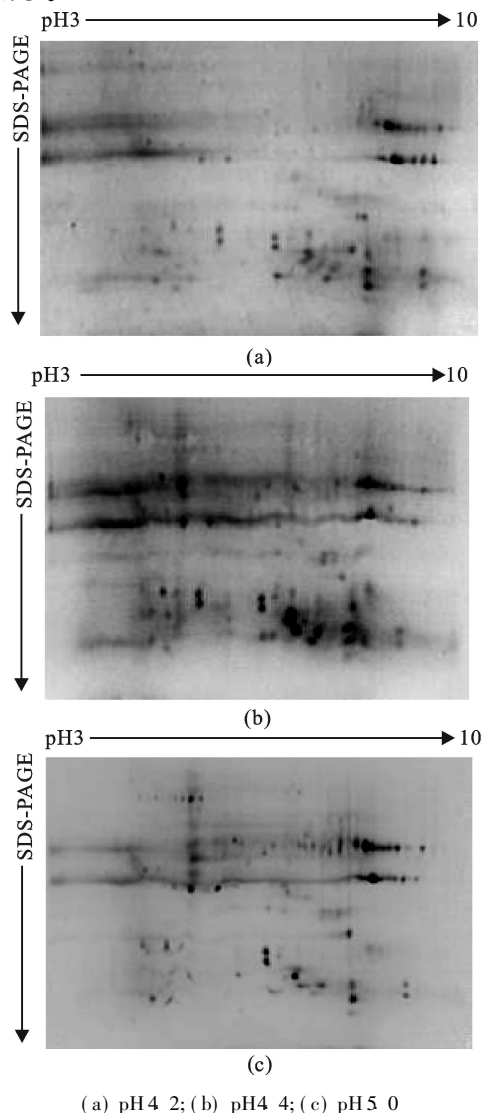


图 1 不同 pH 值的浸提缓冲液制备样品的双向电泳图谱

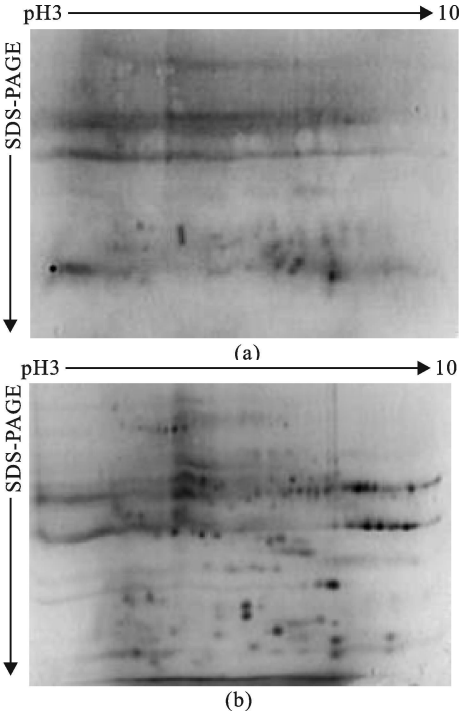
Fig. 1 The 2-D electrophoresis maps of samples prepared by extraction buffers with different pHs

通过分析比较可以看出, 每张双向电泳图谱上可获得 40~60 个可分辨的蛋白斑点, 且主要蛋白斑点在凝胶上的分布状况大体一致。在相对低分子量区域的偏碱性范围内, 都出现了若干分布较为集中的蛋白斑点, 而在低分子量区域的偏酸性区域, 分布的蛋白斑点则少得多, 说明大部分分子量较小的微生物胞外酶以碱性蛋白质为主。在凝胶的高分子量区域, 当以 pH 值为 4.2 的乙酸

乙酸钠浸提缓冲液制备样品时,可分辨的蛋白斑点相对较少;而当缓冲液为 pH 值为 4.4 和 pH 值为 5.0 时,有更多的蛋白斑点被分离出来,说明浸提缓冲液 pH 值的不同会影响所制备样品的组成。总体说来,当麦曲的浸提缓冲液 pH 值为 5.0 时,由双向电泳分离出来的蛋白斑点最多;就分辨率而言,3 种 pH 条件下的分离效果相差不大。

2.3 不同上样量对双向电泳结果的影响

蛋白质上样量的多少也直接影响双向电泳图谱的分辨率。图 2 表示的是用 pH 值为 5.0 的浸提缓冲液制备样品后,进行不同上样量的双向电泳图谱。可以看到,当上样量为 56 μg 时,图谱上肉眼可见的蛋白斑点非常少,低丰度蛋白质无法显示,且蛋白斑点模糊不清,表明此时上样量偏低(图 2a);而当上样量为 142 μg 时,部分蛋白斑点出现拖尾现象,表明此时上样量偏高(图 2b)。当上样量为 100 μg 左右时,蛋白斑点不仅较多,而且双向电泳图谱的分离分辨率较高,蛋白斑点清晰(图 1c),表明此时上样量较为合适。



(a) 上样量偏小(56 μg) (b) 上样量偏大(142 μg)  
图 2 蛋白样品上样量偏小或偏大的双向电泳图谱(浸提缓冲液 pH 5.0)  
Fig. 2 The 2-D electrophoresis maps with protein sampling too few or too much (extraction buffer pH5.0)

3 结 语

双向电泳技术是宏蛋白质组学的关键技术之

一。应用双向电泳技术对黄酒麦曲中各种微生物胞外酶的可溶性宏蛋白质组进行分离,目前未见任何相关报道。本文通过一系列试验,对影响双向电泳结果的关键条件进行了研究,初步建立了适合于目标样品的双向电泳技术体系。

影响双向电泳结果的因素很多,包括材料的选择,样品的制备方法,样品上样量,等电聚焦程序,实验技术的熟练程度,试剂的纯度等等。高效的样品制备方法是双向电泳成功的关键,制备方法若选择不当,会造成大量盐离子和其它干扰物质残留,严重影响等电聚焦,从而影响双向电泳的结果。如过高盐离子浓度可能会导致 IEF 停止,而多糖类(尤其是带电荷的多糖)会导致双向电泳图谱中出现横条纹。本研究采用 TCA-丙酮法沉淀蛋白质,可以有效地去除盐离子、酚、多糖等干扰电泳效果的物质<sup>[15]</sup>。同时,通过增加丙酮清洗的次数,能够更彻底地去除上述杂质。但用 TCA-丙酮沉淀法制备样品,在 IEF 前必须将样品充分解聚,并使之完全溶解,以免产生水平条纹<sup>[16]</sup>。本实验的研究对象是麦曲微生物群落分泌的所有胞外酶,为防止蛋白水解酶对蛋白质的降解作用,在样品制备过程中加入了蛋白酶复合抑制剂,同时确保样品制备过程尽量保持在低温条件下。

在黄酒生产过程中,酵母接入发酵醪后,酒醪的 pH 值会逐步下降,由开始的 pH 值 5.4 左右,最后稳定在 pH 值 4.0~4.3 之间<sup>[17]</sup>。本研究分别采用了 pH 值为 4.2、4.4、5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸提麦曲用以制备样品进行双向电泳实验。由所得的双向电泳图谱可以看出,麦曲中微生物分泌的胞外酶具有各不相同的等电点,但不同制备条件下蛋白斑点在凝胶上的分布情况基本一致;当浸提缓冲液 pH 值为 5.0 时,分离得到的蛋白斑点最多。就分离分辨率来看,使用 3 种不同 pH 值的样品制备缓冲液进行双向电泳实验,分辨率都较高。

等电聚焦时间过短会影响双向电泳结果的分辨率,时间过长则会引起阴极漂移并丢失碱性蛋白。另外,等电聚焦时间过短或过长都会引起水平拖尾。通过实验发现,当等点聚焦总伏特小时数设定为 7 500 Vh 时,效果较好。

样品上样量的选择也是能否获得高质量双向电泳图谱的关键因素之一,上样量的大小选择取决于胶条的长度、pH 值范围以及染色方法等<sup>[18]</sup>。一般说来,低上样量有利于分离高丰度蛋白,高上样量有利于分离低丰度蛋白。但过高的上样量会造成蛋白质聚集或沉淀,引起蛋白斑点的拖尾。上样

量过低的话,蛋白斑点则容易造成蛋白点模糊不清,低丰度蛋白分离不出来。通过试验发现,对于本研究使用的 pH 值 3~ 10(7cm)的 IPG 胶条,当蛋白质的上样量为 100  $\mu\text{g}$  左右时,分离效果较好。

综上所述,本研究初步建立了适合于绍兴黄酒成品麦曲微生物胞外酶的双向电泳技术体系,得到

了分辨率较高,重复性较好的双向电泳图谱,为进一步通过质谱分析手段全面鉴定微生物胞外酶的组成,明确其微生物来源奠定基础。同时,本文提出的研究思路也可为其他传统固态发酵材料的微生物群落结构与功能研究提供参考和借鉴。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] 汪建国. 传统麦曲在黄酒酿造中的作用和特色[ J]. 中国酿造, 2004(139): 29– 31.  
WANG Jianguo. Function of traditional koji in rice wine and its characteristics[ J]. **China Brewing**, 2004(139): 29– 31. (in Chinese)
- [ 2 ] 汪建国,汪琦. 浅谈传统麦曲的改革与创新[ J]. 中国酿造, 2007(166): 53– 55.  
WANG Jianguo. Discussion on the innovation of the traditional wheat koji[ J]. **China Brewing**, 2007(166): 53– 55. (in Chinese)
- [ 3 ] 曹钰,陆健,方华,等. 绍兴黄酒麦曲中真菌多样性的研究[ J]. 食品科学, 2008(29): 277– 282.  
CAO Yu, LU Jian, FANG Hua, et al. Fungal diversity of wheat qu of shaoxing rice wine[ J]. **Food Science**, 2008(29): 277– 282. (in Chinese)
- [ 4 ] 寿虹志,凌志勇,杨旭,等. 浅析黄酒麦曲中的微生物与黄酒风味的关系[ J]. 中国酿造, 2007(67): 55– 57.  
SHOU Hongzhi, LING Zhiyong, YANG Xu, et al. Relationship between metabolites of wheat Qu microorganisms and flavor of rice wine[ J]. **China Brewing**, 2007(67): 55– 57. (in Chinese)
- [ 5 ] 傅金泉. 黄酒生产技术[ M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [ 6 ] 吴建新. 麦曲用量对黄酒风味和稳定性的影响[ J]. 中国酿造, 2002(121): 34– 35.  
WU Jianxin. The effect of maiqu on the flavor and stability of rice wine[ J]. **China Brewing**, 2002(121): 34– 35. (in Chinese)
- [ 7 ] 范文来,徐岩. 大曲酶系研究的回顾与展望[ J]. 酿酒, 2003: 35– 40.  
FAN Wenlai, XU Yan. Review of daqu enzyme's research[ J]. **Liquor Making**, 2003: 35– 40. (in Chinese)
- [ 8 ] 徐翔,毛健,陈正行,等. 黄酒生麦曲的生化性能及在发酵过程中的研究[ J]. 食品工业科技, 2008, (29): 140– 142.  
XU Xiang, MAO Jian, CHEN Zhengxing, et al. Study on Biochemical characteristics of several wheat koji and their difference during fermentation process[ J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, (29): 140– 142. (in Chinese)
- [ 9 ] 王璐,曹钰,陆健,等. 绍兴黄酒麦曲中 $\alpha$ -淀粉酶的初步研究[ J]. 中国酿造, 2007(170): 38– 41.  
WANG Lu, CAO Yu, LU Jian, et al. Study on  $\alpha$ -amylase from wheat qu of shaoxing rice wine[ J]. **China Brewing**, 2007(170): 38– 41. (in Chinese)
- [ 10 ] Rodriguez Valera F. Environmental genomics, the big picture[ J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2004(231): 153– 158.
- [ 11 ] Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems[ J]. **Trends Microbiol**, 2006(14): 92– 7.
- [ 12 ] Maron PA, Ranjard L, Mougel C, et al. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology[ J]. **Microb. Ecol.** 2007(53): 486– 93.
- [ 13 ] Oda K, Kakizono D, Yamada O, et al. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid state culture conditions[ J]. **Appl Environ Microbiol**. 2006(72): 3448– 3457.
- [ 14 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[ J]. **Anal Biochem**. 1976(72): 248– 254.
- [ 15 ] 周艳,张美玲. 温莪术蛋白双向电泳技术的建立[ J]. 温州医学院学报, 2009(4): 305– 308.  
ZHOU Yan, ZHANG Meiling. Establishment of technique of proteome two dimension electrophoresis of turmeric protein. [ J]. **Journal of Wenzhou Medical College**, 2009(4): 305– 308.
- [ 16 ] 乌日娜,张和平,孟和,等. 干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[ J]. 食品与生物技术学报, 2009(28): 598– 602.  
WU Rina, ZHANG Heping, MENG He, et al. Construction and optimization condition of proteomic map of lactobacillus casei[ J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009(28): 598– 602. (in Chinese)
- [ 17 ] 顾国贤. 酿造酒工艺学[ M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007, 475– 479.
- [ 18 ] 胡惠忠,付强. 猪卵母细胞蛋白质组双向电泳体系的建立及初步分析[ J]. 动物学杂志, 2008(43): 67– 71.  
HU Huizhong, FU Qiang. Two dimensional electrophoresis analysis of porcine oocyte proteome: a preliminary study [ J]. **Chinese Journal of Zoology**, 2008(43): 67– 71. (in Chinese)