

阿魏酸对酒类酒球菌生长作用机理的研究

吕 珍¹, 杨 芮¹, 李 凯¹, 朱成龙¹, 刘树文^{1,2,*}

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2.陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以酒类酒球菌质膜蛋白含量和 H^+ -ATPase活性为研究指标, 探索阿魏酸对酒类酒球菌生长的作用机理。结果表明: 阿魏酸能够通过破坏酒类酒球菌细胞膜结构抑制生长, 主要表现在质膜蛋白含量的升高和 H^+ -ATPase活性的降低。50mg/L阿魏酸能够强烈抑制酒类酒球菌的生长, 并且随阿魏酸含量的增加抑制作用逐渐增强。不同菌株受到阿魏酸的抑制程度有所不同, 在选择的3株供试菌株中, *O. oeni* HB-2b受到的抑制作用最弱, *O. oeni* SD-2a和*O. oeni* SD-2gf的抑制程度相对较强。

关键词: 阿魏酸; 酒类酒球菌; 抑制; 质膜蛋白; H^+ -ATPase

Mechanism Underlying the Effect of Ferulic Acid on the Growth of *Oenococcus oeni*

LÜ Zhen¹, YANG Rui¹, LI Kai¹, ZHU Cheng-long¹, LIU Shu-wen^{1,2,*}

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract: The study aimed to explore the mechanism behind the effect of ferulic acid on the growth of *Oenococcus oeni* through determining plasma membrane protein content and H^+ -ATPase activity. The results showed that ferulic acid was able to inhibit microbial growth by destroying the cell membrane structure of *Oenococcus oeni*, especially elevating plasma membrane protein content and reducing H^+ -ATPase activity. Ferulic acid at 50 mg/L strongly suppressed the growth of *Oenococcus oeni* in a dose-dependent manner. Different strains made varying responses to different levels of ferulic acid. The inhibition effect of ferulic acid on the three strains tested decreased in the following order: *O. oeni* SD-2a > *O. oeni* SD-2gf > *O. oeni* HB-2b.

Key words: ferulic acid; *Oenococcus oeni*; inhibition; plasma membrane protein; H^+ -ATPase

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0177-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321037

阿魏酸(ferulic acid)最初在植物的种子和叶子中发现, 广泛存在于水果、蔬菜、药材及种子皮壳中, 在植物细胞壁中多以酯的形式存在, 与碳水化合物以共价键连接^[1], 成为细胞壁的骨架, 具有抗氧化、清除自由基、镇静、增加冠脉血流量、保护缺血心肌、促进腺淋巴细胞增殖等作用。在葡萄和葡萄酒中, 阿魏酸是羟基肉桂酸衍生物之一, 红葡萄酒中羟基肉桂酸衍生物的含量大约是60mg/L, 白葡萄酒中的含量显著高于红葡萄酒, 约为130mg/L。阿魏酸在欧洲葡萄中的平均含量约为5mg/kg^[2-3]。

近年来的研究表明, 酚酸作为葡萄和葡萄酒中原有的物质, 具有一定的抑菌效果。已经有很多研究证明了多酚、白藜芦醇、白皮杉醇、槲皮素、槲皮苷等能够抑制大肠杆菌ATPase活性^[4]。Cheng Dai等^[5]研究表明, 大

枣果皮游离酚以及结合酚能够显著抑制 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase以及 Na^+/K^+ -ATPase的活性, 与此同时超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、肌酸激酶以及乳酸脱氢酶等的活性也显著降低。酚类物质的结构与其抑制作用之间有很大联系, 含有两个酚环结构的多酚类物质能够完全抑制ATPase, 只有1个单独酚环或者有3个酚环的多酚类物质只能部分抑制ATPase。进一步研究表明, 酚类化合物羟基和硝基的位置在结合和抑制ATPase方面具有重要作用^[4]。阿魏酸结构中含有一个单独酚环, ATPase活性会被部分抑制。质膜 H^+ -ATPase是一种质子转运ATPase, 即质子泵^[6]。植物质膜 H^+ -ATPase是植物细胞的“主宰酶”, 与植物的生长发育有极为密切的关系^[7]。由于 H^+ -ATPase能控制细胞内外离子的相对稳定, 可直接

收稿日期: 2012-11-12

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B07); 中央高校基本科研业务费专项(2109021104);

国家现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-30-ch-03)

作者简介: 吕珍(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: lv-zhen@126.com

*通信作者: 刘树文(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn

作为反应菌株生长情况的指标。但是目前很少有涉及酒类酒球菌 H^+ -ATPase方面的研究。再者由于酚酸的抑菌作用,近年来不断有学者提出将其作为葡萄酒酿造过程中亚硫酸替代者的观点^[8],但阿魏酸加入之后是否会对酒类酒球菌的生存产生影响还有待研究。本实验以酒类酒球菌质膜蛋白含量和 H^+ -ATPase活性为指标,探索阿魏酸对酒类酒球菌生长的作用机理。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

从西北农林科技大学葡萄酒学院选育并保藏的22株酒类酒球菌中随机挑选3株,分别为酒类酒球菌SD-2a(*O. oeni* SD-2a)、酒类酒球菌HB-2b(*O. oeni* HB-2b)以及酒类酒球菌SD-2gf(*O. oeni* SD-2gf)。

L-苹果酸(纯度 $\geq 99\%$)、阿魏酸、5-腺苷三磷酸二钠盐(纯度 $\geq 98\%$) 都来生物有限责任公司。

1.2 仪器与设备

MJ-2508型培养箱 上海跃进医用光学器械厂;
HS-840-V洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;
UV-2450紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基的配制

ATB培养基(g/L): 蛋白胨 10、酵母浸粉 5、葡萄糖 10、硫酸镁 0.2、硫酸锰0.05、盐酸半胱氨酸0.5, 番茄汁 250mL。配制好的培养基用1mol/L的HCl或者NaOH调节pH值至4.8, 于121℃高压蒸汽灭菌20min。

番茄汁的制备方法: 新鲜的西红柿, 沸水浸泡去皮后, 挤压成汁, 在沸水中煮2h, 过滤之后低温过夜, 10000r/min高速离心15min, 取上清液备用。

1.3.2 模拟酒精发酵结束后葡萄酒基础培养基的配制

模拟酒精发酵结束后葡萄酒的基础培养基^[9](g/L): L-苹果酸3、酵母浸粉4、甘油2、磷酸二氢钾0.6、乙酸钠2、硫酸铵1、氯化钾0.45、硫酸镁0.2、硫酸锰0.05、氯化钙0.13, 葡萄汁10mL, 用1mol/L HCl或者NaOH调节pH值至3.5, 115℃灭菌10min。用无水乙醇调节乙醇含量为10%。

1.3.3 菌株活化

将冷冻保藏于 -80°C 的*O. oeni* SD-2a、HB-2b、SD-2gf按体积分数2%接种量接至10mL ATB培养基中, 25℃活化7d。将第一次活化的菌悬液再按相同的接种量接至10mL培养基中, 培养3d, 再将二次活化的菌悬液以2%接种量转入100mL ATB培养基中进行扩培。

1.3.4 酒类酒球菌生长曲线测定

为得到稳定的阿魏酸处理效果, 测定模拟酒中菌株在600nm波长处光密度(OD_{600nm})值之前进行了3次酚酸处理。以2%的接种量将不同菌株接种至100mL不同模拟酒

中, 接种不同菌株的各培养基, 于25℃条件下培养, 每6h吸取适量菌悬液, 测定 OD_{600nm} 值, 同时测定各培养基的pH值。每个样品均设置3个重复, 取其平均值。以培养时间为横坐标, 以 OD_{600nm} 和pH值为纵坐标, 绘制生长曲线, 观察不同酚类物质作用下各菌株的生长状况。

培养基分为: 对照模拟酒培养基(添加0mg/L阿魏酸), 分别添加50mg/L和100mg/L阿魏酸的模拟酒培养基。

1.3.5 酒类酒球菌质膜 H^+ -ATPase的测定

1.3.5.1 磷标准曲线制作

磷标准曲线的制作参考李中超等^[10]的方法, 以磷浓度为横坐标(x , $\mu\text{mol/mL}$), A_{660nm} 为纵坐标(y), 得标准曲线方程为: $y=0.0393x-0.0127$, 相关系数 $R^2=0.9991$ 。

1.3.5.2 蛋白标准曲线制作

蛋白标准曲线的绘制参考Bradford法^[11]。以蛋白质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/mL}$), A_{595nm} 为纵坐标(y), 标准曲线回归方程为: $y=0.0055x+0.0395$, 相关系数 $R^2=0.999$ 。

1.3.5.3 质膜的制备以及 H^+ -ATPase活性的测定

参考李中超^[10]和赵文英^[12]提供的方法。考察酒类酒球菌在模拟酒环境中的生长状况, 将在不同情况下活化好的3种菌株分别接种到对应的3种模拟酒培养基中: 不添加阿魏酸、加入50mg/L阿魏酸以及添加100mg/L阿魏酸的模拟酒。取100mL培养至不同时期的菌悬液(对数生长中期、对数生长后期、稳定生长中期)制备质膜, 测定质膜蛋白含量以及 H^+ -ATPase酶比活力。以每毫克蛋白每分钟催化生成的无机磷的含量为1个酶活力单位, 其酶比活力单位为 $\mu\text{mol Pi}/((\text{mg pro}) \cdot \text{min})$ 。

1.4 数据处理

采用DPS 9.5数据处理软件对实验数据的方差显著性进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养环境下酒类酒球菌生长曲线

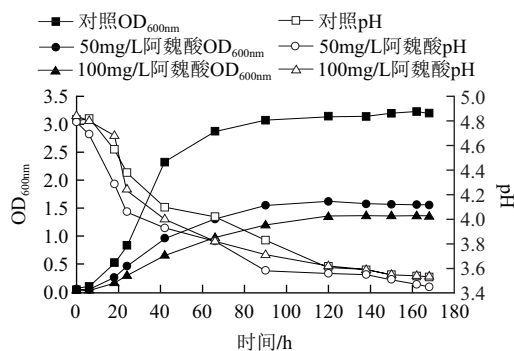


图1 酒类酒球菌SD-2a生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Oenococcus oeni* SD-2a

由图1可知, *O. oeni* SD-2a在对照模拟酒培养基以及添加了阿魏酸的培养基中都呈现出典型的细菌生长特点。以不添加阿魏酸时菌株的生长情况为对照, 培养6h之后进入对数生长期, 100h开始进入稳定生长期。加入阿魏酸之后, *O. oeni* SD-2a生长受到抑制, 生长速率降低, OD_{600nm} 值最大可达到1.5左右。随着阿魏酸含量的增加抑制作用逐渐增强。3种情况下, pH值均随着菌株的生长有所下降, 都从4.8下降到3.5左右。当阿魏酸添加量为50mg/L时对应的pH值均低于其他两种情况。

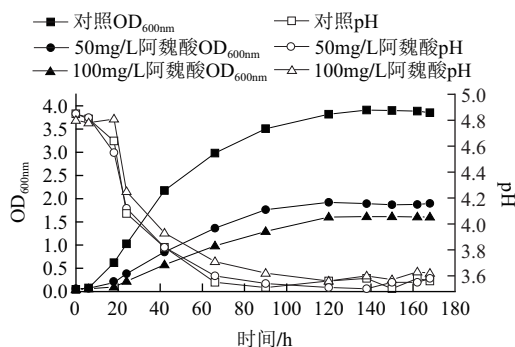


图2 酒类酒球菌HB-2b生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Oenococcus oeni* HB-2b

由图2可知, *O. oeni* HB-2b在3种培养基中同样呈现出典型的细菌生长趋势。以不含阿魏酸时*O. oeni* HB-2b在模拟酒中的生长状况为对照。对照迟滞期为6h, 随后逐渐进入对数生长期。加入阿魏酸之后, *O. oeni* HB-2b生长速率减慢, 18h之后才进入对数生长期, 直到120h以后开始进入稳定期, OD_{600nm} 的最大值也仅达到对照的50%左右, 大约在2.0附近。随着阿魏酸添加量的增加, OD_{600nm} 值逐渐减小, 可见阿魏酸对菌株的抑制作用逐渐增强。3种情况下, pH值均随着菌株生长过程的进行逐渐下降, 当菌株进入稳定之后, pH值也几乎保持稳定。当阿魏酸添加量为50mg/L时, 对应培养基pH值变化曲线几乎与对照重合, 而添加100mg/L阿魏酸的样品, pH值在整个研究过程中略高于对照, 但3种情况下所能达到的最低pH值均在3.6左右。

由图3可知, *O. oeni* SD-2gf在3种培养基中均呈现出典型的细菌生长特点。以不添加阿魏酸时*O. oeni* SD-2gf的生长曲线为对照。加入阿魏酸之后, *O. oeni* SD-2gf的生长受到抑制, 与前两株菌相似, 抑制效果随阿魏酸添加量的增加而增强。50mg/L和100mg/L阿魏酸对应菌株能达到的最大 OD_{600nm} 值很接近, 二者之间无显著性差异。不添加阿魏酸时, 对照的pH值随着菌株生长的进行逐渐下降, 当菌株即将进入稳定期时, pH值轻微升高, 之后有略微下降的趋势。添加阿魏酸之后, 迟滞期对应的pH值均有轻微升高, 随后逐渐下降。3种情况下, 最终pH值均在3.5左右。

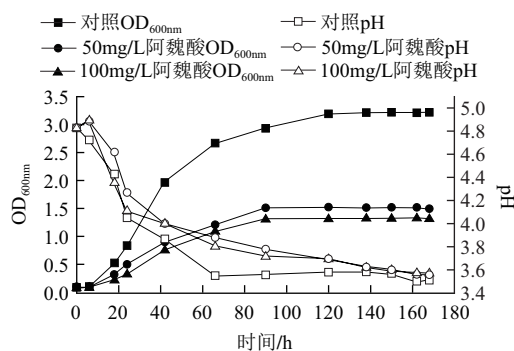


图3 酒类酒球菌SD-2gf生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Oenococcus oeni* SD-2gf

根据生长曲线测定结果可以看出, 3个菌株在没有添加阿魏酸的条件下, 都表现出良好的生长特性, 其中*O. oeni* HB-2b的菌密度高于其他两株菌, 随着培养过程的进行, 培养基pH值均呈现逐渐降低的趋势, 并且3种菌株最终达到的pH值几乎在3.5~3.6之间。添加了阿魏酸之后, 3个菌株的生长均受到明显抑制, 生长速率相对较慢, 需要较长的时间才能进入稳定期, 但依然表现出了显著的菌株生长特性。3株菌对应培养基的pH值均呈现下降趋势, 并且最终pH值与对应对照之间差异不大。

比较不添加阿魏酸时3个菌株的生长曲线可以看出, *O. oeni* HB-2b的 OD_{600nm} 值高于*O. oeni* SD-2a和*O. oeni* SD-2gf。添加阿魏酸之后, 虽然*O. oeni* HB-2b的生长也受到抑制, 但其 OD_{600nm} 值相比其他两株菌仍然处于较高的水平。*O. oeni* SD-2a和*O. oeni* SD-2gf生长状况极其相似, 二者生长受到的抑制作用均高于*O. oeni* HB-2b。由此可见, *O. oeni* HB-2b在对照模拟酒培养基以及添加阿魏酸的模拟酒中的存活率要高于*O. oeni* SD-2a和*O. oeni* SD-2gf。

2.2 阿魏酸对质膜蛋白含量的影响

细菌的细胞膜是防止胞外物质进入胞内的天然屏障, 有助于保证细胞内环境的相对稳定以及各种生化反应有序进行。蛋白质和脂类是构成细胞膜的主要成分, 同时还含有少量多糖、微量核酸、金属离子和水。脂类以不对称的脂双层形式存在于质膜中, 亲水端朝向细胞外液或胞质, 疏水的脂肪酸链彼此相对形成膜内部的疏水区。蛋白质则以贯穿膜内外的内在蛋白和结合在磷脂分子亲水部分的外在蛋白形式存在。细胞膜的完整性及膜通透酶的活性影响着酒类酒球菌细胞生长及代谢能量的产生。Garbay等^[13]研究发现在含有葡萄酒的培养基条件下, 酒类酒球菌的整体脂肪酸含量下降了, 导致细胞膜脂类结构的破坏。一旦蛋白质或者脂类受到破坏, 直接导致细菌细胞膜结构损伤, 影响细胞正常生长和生理功能。本实验测定了接种到模拟酒中之后处于对数生长期3种菌株细胞质膜蛋白含量。通过细胞质膜蛋白含量间接反应细菌的生长状况以及对不良环境的能力。

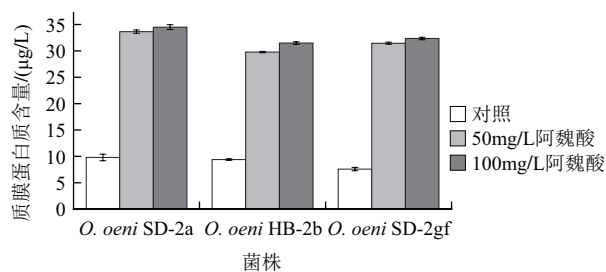


图4 阿魏酸对对数生长中期质膜蛋白质含量的影响

Fig.4 Plasma membrane protein content in the logarithmic-phase cells of the tested strains

由图4可知,不添加阿魏酸时,*O. oeni* SD-2a和*O. oeni* HB-2b对应的质膜蛋白含量很接近,*O. oeni* SD-2gf质膜蛋白含量相对较低。添加阿魏酸之后3株菌质膜蛋白含量均急剧升高。对*O. oeni* SD-2a,加入50mg/L和100mg/L阿魏酸之后,*O. oeni* SD-2a对应的质膜蛋白含量之间无显著性差异,分别是对照的3.4倍和3.5倍;*O. oeni* HB-2b对应的质膜蛋白含量分别是对照的3.2倍和3.4倍,二者差异显著;两个梯度下*O. oeni* SD-2gf对应的质膜蛋白含量分别是对照的4.1倍和4.3倍,二者之间无显著性差异。

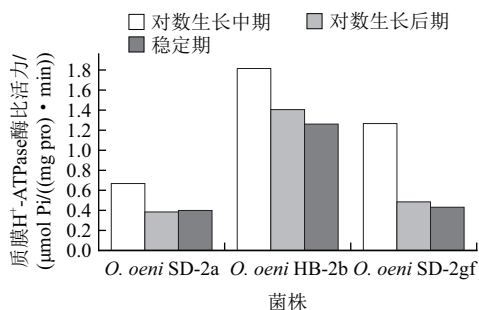
细胞膜作为细胞的天然屏障,很多因素都会导致脂类或者质膜蛋白的变化,使细胞膜受损。影响酒类酒球菌质膜磷脂与蛋白之间比例下降的因素很多,通常在磷脂含量降低的同时,膜蛋白含量急剧增加。当酒类酒球菌生长环境营养丰富,温度、pH值以及渗透压等处于适宜状态时,非必需蛋白的表达会受到一定程度的阻遏,更有利于合成生长必需组分。在不添加阿魏酸的正常模拟酒环境中,酒类酒球菌能够正常生长,细胞膜的损伤处于极低的水平,确保菌体正常生长的必需蛋白大量合成。一旦生存环境不利于细胞生存时,菌体就处于胁迫环境下,为了抵御外界不良环境维持正常生长,细胞会将部分用于生长的资源修复受损部位^[14],此时会有部分热休克蛋白大量合成,帮助细菌抵御不良环境。当酒类酒球菌处于高温(42℃)、高酸(pH 3)、高乙醇(12%)的环境中时,小热休克蛋白Lo18被大量诱导,直到生长稳定期也能被诱导产生^[15-16]。Lo18还能与细胞膜相结合,温度越高,结合数量越多。当培养基中含有乙醇和苯乙醇时,酒类酒球菌诱导产生的Lo18能通过直接作用于细胞膜磷脂来调整细胞膜的特性,有助于维持膜的完整性,从而增强了酒类酒球菌对葡萄酒环境的适应性。除了Lo18之外,酒类酒球菌的其他胁迫蛋白及其基因的表达不断被发现,它们包括:ClpX^[17]、TrxA^[18]、FtsH^[19]、ClpLP^[20]、OmrA^[21]、GroESL和DnaK^[22]。这些胁迫基因在酒类酒球菌胁迫适应性反应阶段的表达模式有所不同,翻译出来的蛋白不仅在胁迫条件下发挥作用,在细胞生长阶段也发挥着特定的生理作用^[12]。将阿魏酸加入模拟酒中之后,原有的生长环境遭到破坏,3种菌株均处

于胁迫环境。细胞为了维持正常的生长代谢,可能会诱导一些胁迫蛋白基因的大量表达,从而产生分子伴侣或蛋白酶,可能还会产生一些类似于Lo18的能够结合在质膜上面的胁迫蛋白,保护细胞的完整性。因此添加阿魏酸的样品对应的质膜蛋白含量显著高于对照。Campos等^[23]表明,酚类物质会增加葡萄酒乳酸菌的细胞膜通透性,而酚类物质对细胞膜通透性的影响可能与它们的结构和亲脂性差异有关,因此添加阿魏酸之后,*O. oeni* SD-2a质膜蛋白含量最高,*O. oeni* HB-2b质膜蛋白含量相对较低。

2.3 阿魏酸对H⁺-ATPase活性的影响

2.3.1 测定H⁺-ATPase活性的最佳时期

腺苷三磷酸酶(ATPase)是一类重要的膜结合蛋白酶,存在于细胞及细胞器膜上。在物质能量运转方面有很大贡献,既可以利用质子合成ATP,又能够水解ATP释放出能量将质子泵出^[24],主要分布在线粒体内膜、叶绿体类囊体膜以及细菌质膜^[25]。ATPase对于人体健康十分重要,目前已有学者提出通过调节ATPase活性治疗疾病的观点,如癌症、心脏疾病、糖尿病、溃疡^[26-27]。质膜H⁺-ATPase作为质子的转运ATPase,其活性大小与pH值有关。H⁺-ATPase基因随环境中酸度的增加表达量有所增加,pH值为4.0和5.0时表达量分别是pH值为6.5的3.3倍和2.8倍^[28]。阿魏酸能否通过降低H⁺-ATPase活性抑制酒类酒球菌生长还有待研究。在不添加阿魏酸的情况下,选取对数生长中期、对数生长后期以及稳定中期3个时期测定菌株在模拟酒环境下的H⁺-ATPase酶比活力,一方面有利于确定不同菌株H⁺-ATPase活性最高的时期,另一方面有助于观察阿魏酸添加之后对不同时期菌株H⁺-ATPase活性的影响程度。

图5 3个菌株在不同时期的H⁺-ATPase酶比活力Fig.5 H⁺-ATPase activity in the logarithmic-phase cells of the tested strains

由图5可知,3个菌株的H⁺-ATPase酶比活力随着发酵过程的进行逐渐下降。处于对数生长中期的菌体,繁殖速度快,代谢活跃,需要更多ATP维持正常生长,H⁺-ATPase酶比活力也相对较高;而当细菌进入对数生长后期或稳定期时,细菌生长代谢速率相对减慢,对ATP的需求相对减少,能量供应和消耗逐渐处于动态平衡,H⁺-ATPase酶比活力也有所下降。因此收集菌体用来测定H⁺-ATPase酶比活力的最佳时期是对数生长中期。

对3株菌而言,不论处于何种生长阶段,*O. oeni* HB-2b对应的酶活最高,酶活最低的是*O. oeni* SD-2a。 H^+ -ATPase作为细胞膜结合的蛋白酶,在消耗ATP的同时能够将质子泵出胞外,维持细胞内的中性环境,还能够产生细胞膜质子原动力^[29],产生ATP供细胞正常生长代谢。由此可见, H^+ -ATPase可以作为一个衡量细菌生长状况的重要指标。另外,由于 H^+ -ATPase有控制质子出入细胞的作用,有助于抵抗高酸环境对菌体的影响,增强菌体的抗性,提高菌体在酸性环境中的存活率^[10]。因此,*O. oeni* HB-2b直接接种到模拟酒环境中的存活率更高,也更有利于MLF的启动和进行。

2.3.2 阿魏酸对 H^+ -ATPase活性的影响

3株菌均在对数生长中期表现出了较高的 H^+ -ATPase活性,因此选择该时期为收集菌体测定质膜 H^+ -ATPase活性的最佳时期。将阿魏酸以50mg/L和100mg/L的量添加到模拟酒中,分别收集相应的处于对数生长中期的菌株测定 H^+ -ATPase酶比活力。每种菌株均以添加0mg/L阿魏酸的样品为对照。测定结果见表1。

表1 阿魏酸对3株酒类酒球菌质膜 H^+ -ATPase酶比活力的影响
Table 1 Effect of ferulic acid on plasma membrane H^+ -ATPase activity of the tested strains

阿魏酸添加量/(mg/L)	质膜 H^+ -ATPase酶比活力/($\mu\text{mol Pi}/((\text{mg pro}) \cdot \text{min})$)		
	<i>O. oeni</i> SD-2a	<i>O. oeni</i> HB-2b	<i>O. oeni</i> SD-2gf
0	0.6678 \pm 0.0213 ^a	1.8155 \pm 0.0210 ^a	1.2666 \pm 0.0282 ^a
50	0.4364 \pm 0.0117 ^b	0.8446 \pm 0.0374 ^b	0.5510 \pm 0.0312 ^b
100	0.3594 \pm 0.0270 ^c	0.6933 \pm 0.0062 ^c	0.5084 \pm 0.0094 ^b

注:小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

由表1可知,添加阿魏酸之后,模拟酒环境下3株菌的质膜 H^+ -ATPase酶比活力与对照相比均显著下降。对*O. oeni* SD-2a而言,添加50mg/L和100mg/L阿魏酸导致其质膜 H^+ -ATPase酶比活力分别下降了34.6%和46.2%,二者呈显著性差异。结合生长曲线测定结果可以看出,阿魏酸能通过降低 H^+ -ATPase活性抑制*O. oeni* SD-2a生长,并且抑制程度随阿魏酸添加量的增加而增加。*O. oeni* HB-2b在对数生长中期的质膜 H^+ -ATPase酶比活力均高于*O. oeni* SD-2a。添加50mg/L和100mg/L阿魏酸之后,该菌株对应酶比活力分别是对照的46.5%和38.2%,二者差异显著。阿魏酸对*O. oeni* HB-2b质膜 H^+ -ATPase的抑制趋势与*O. oeni* SD-2a相似,均随着阿魏酸添加量的升高抑制效果逐渐增强。处于对数生长中期*O. oeni* SD-2gf质膜 H^+ -ATPase酶比活力同样低于*O. oeni* HB-2b对应酶比活力,但整体高于*O. oeni* SD-2a。添加阿魏酸之后,*O. oeni* SD-2gf质膜 H^+ -ATPase酶比活力显著下降,分别是对照的43.5%和40.1%,两个梯度下对应的酶比活力差异不显著。

结合各供试菌株生长曲线测定结果可以看出,阿魏酸能够通过促进质膜蛋白含量升高而降低酒类酒球菌质膜 H^+ -ATPase酶比活力。比较3株菌的酶比活力,其

中*O. oeni* SD-2a质膜 H^+ -ATPase酶比活力最低,其次是*O. oeni* SD-2gf,最高的是*O. oeni* HB-2b。由于 H^+ -ATPase可以作为菌株生长状况的指标,表明即使模拟酒中含有阿魏酸,*O. oeni* HB-2b的生长情况最好,*O. oeni* SD-2gf次之,3株菌中生长情况相对较弱的是*O. oeni* SD-2a。当模拟酒中阿魏酸添加量为100mg/L并接种*O. oeni* HB-2b时,对应酶比活力受到的抑制作用最强,但此时酶比活力依然高于其他两种菌;当阿魏酸的添加量为50mg/L并接种*O. oeni* SD-2a时,酶比活力的抑制程度最小。

3 结论

本实验随机选取了*O. oeni* SD-2a、HB-2b、SD-2gf作为供试菌株,通过质膜蛋白含量和 H^+ -ATPase活性为检测指标,研究阿魏酸对酒类酒球菌生长的作用机理。结果表明,阿魏酸的添加会使酒类酒球菌质膜蛋白含量显著上升,对膜结构造成一定的损伤,导致 H^+ -ATPase活性下降,从而抑制酒类酒球菌的生长,并且抑制作用随阿魏酸添加量的升高而增强。由于阿魏酸的抑制作用与其亲脂性有关,因此对不同菌株的抑制程度有所不同。3株供试酒类酒球菌中,添加阿魏酸之后*O. oeni* HB-2b质膜蛋白含量虽然显著上升,导致其质膜 H^+ -ATPase酶比活力下降,但相比其他两株菌*O. oeni* HB-2b质膜 H^+ -ATPase酶比活力仍处于相对较高的水平,在3株供试菌株中*O. oeni* HB-2b的生存能力最强。此外,Galland等^[30]从分子水平上说明了ATPase与苹果酸-乳酸发酵(MLF)代谢之间的关系,研究发现对于 H^+ -ATPase缺陷的突变体,MLF过程中编码苹果酸乳酸酶的操纵子没有被转录,由此说明 H^+ -ATPase还会对酒类酒球菌触发的MLF产生影响,因此还能从有机酸代谢的角度阐述 H^+ -ATPase与MLF之间的关系。

参考文献:

- [1] 尤新. 植物种子皮壳氧化剂阿魏酸的生理功能和人体健康[J]. 中国食品添加剂, 2012(增刊1): 26-31.
- [2] ONG B, NAGEL C. Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of White Riesling grapes[J]. American journal of enology and viticulture, 1987, 29(4): 277-281.
- [3] SINGLETON V L, TROUSDALE E, ZAYA J. One reason sun-dried raisins brown so much[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1985, 36(2): 111-113.
- [4] AHMAD Z, AHMAD M, OKAFOR F. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(3): 476-486.
- [5] CHENG Dai, ZHU Chunqiu, CAO Jiankang, et al. The protective effects of polyphenols from jujube peel (*Ziziphus jujube* Mill) on isoproterenol-induced myocardial ischemia and aluminum-induced oxidative damage in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1302-1308.

- [6] SZE H. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1985, 36: 175-208.
- [7] SERRANO R. Structure and function of plasma membrane ATPase[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1989, 40: 61-94.
- [8] GARCÍA-RUIZ A, MORENO-ARRIBAS M V, PEDRO J, et al. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145: 426-431.
- [9] VAILLANT H, FORMISYN P, GERBAUX V. Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 79: 640-650.
- [10] 李中超. 酒类酒球菌SD-2a质膜H⁺-ATPase特性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [11] 王华. 葡萄酒分析检测[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 113.
- [12] 赵文英. 酒类酒球菌SD-2a胁迫适应性反应及其机制初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [13] GARBAY S, ROZES N, LONVAUD-FUNEL A. Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency[J]. Food Microbiol, 1995, 12: 387-395.
- [14] 朱力, 王恒樑, 黄培堂. 蛋白质组学在细菌应激反应研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 511-514.
- [15] GUZZO J, PIERRE F, JOBIN M P, et al. A small heat shock protein induced by multiple stresses and during stationary growth phase from *Leuconostoc oenos*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24(5): 393-396.
- [16] GUZZO J, JOBIN M P, DELMAS F, et al. Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1/3): 27-31.
- [17] JOBIN M P, GARMYN D, DIVIES C, et al. The *Oenococcus oeni* *clpX* homologue is a heat shock gene preferentially express in exponential growth phase[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(21): 6634-6641.
- [18] JOBIN M P, GARMYN D, DIVIES C, et al. Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock[J]. Microbiology, 1999, 145: 1245-1251.
- [19] BOURDINEAUD J P, NEHME B, TESSE S, et al. The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 2511-2520.
- [20] BELTRAMO C, GRANDVALET C, PIERRE F, et al. Evidence for multiple levels of regulation *Oenococcus oeni* *clpPclpL* locus expression in response to stress[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186: 2200-2205.
- [21] BOURDINEAUD J P, NEHME B, TESSE S, et al. A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 92: 1-14.
- [22] MILLS D A, RAWSTHORNE H, PARKER C, et al. Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29: 465-475.
- [23] CAMPOS F M, COUTO J A, FIGUEIREDO I V, et al. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135: 144-151.
- [24] 孔祥会, 王桂忠, 李少菁, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中4中类型ATPase活性比较研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(1): 98-101.
- [25] 张颖娉. ATP合成酶及其功能机制综述[J]. 分子生物物理学, 2004, 24(3): 36-40.
- [26] HONG S, PEDERSEN P L. ATP synthase and the action of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(4): 590-641.
- [27] PEDERSEN P L. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2007, 39(1): 1-12.
- [28] CHEN Xia, SUN Zhihong, MENG He, et al. The acid tolerance association with expression of H⁺-ATPase in *Lactobacillus casei*[J]. International Journal of Dairy Technology, 2009, 62(2): 272-276.
- [29] 陈霞, 孙志宏, 张文弈, 等. 酸胁迫对干酪乳杆菌H⁺-ATP酶基因表达的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 479-482.
- [30] GALLAND D, TOURDOT-MARECHAL R, ABRAHAM M, et al. Absence of malolactic activity is a characteristic of H⁺-ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*[J]. Applied Environment Microbiology, 2003, 69: 1973-1979.