

酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)胁迫适应性反应机制

赵文英, 李华*, 王华

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 杨陵 712100)

摘要: 苹果酸-乳酸发酵有利于提高葡萄酒品质, 为了获得高活性的直投式酒酒球菌发酵制剂, 从生理和分子生物学的角度理解该菌种胁迫耐受性增强的机制是必要的。本文就酒酒球菌利用苹果酸-乳酸发酵和膜结合的 H^+ - F_0F_1 -ATP 酶以维持细胞内环境的稳定和能量供给; 胁迫适应过程中细胞膜组分的调整; 小热休克蛋白 Lo18 等胁迫蛋白及其相应的基因的表达和调控等方面进行了综述。胁迫适应性反应机制的研究对发酵剂菌株的筛选、发酵剂的制备及其他工程菌株的构建具有重要意义。

关键词: 酒酒球菌; 酸胁迫; 乙醇胁迫; 胁迫适应性反应

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0556-06

在葡萄酒酿造过程中, 由于葡萄原料含酸量偏高而常常面临着降酸的问题。苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic fermentation, MLF) 是葡萄酒生产中一种主要的生物降酸方法, 并且, 根据现代葡萄酒酿造基本原理, MLF 也是酿造优质干型葡萄酒必须进行的工艺环节^[1]。不同的苹果酸-乳酸菌 (Malolactic bacteria, MLB) 菌种酿酒特性不同, 能够适应葡萄酒环境、较专一地进行 MLF、并对酒质有增益作用的主要是酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*, *O. oeni*)^[2]。

在传统葡萄酒酿造过程中, 人们通过各种各样的方法来诱导自然 MLF, 但自然 MLF 启动随机, 任何延迟都可能导致葡萄酒质量的改变。因为葡萄酒的恶劣生境严重影响着乳酸菌的存活和生长, 如低 pH (一般 3.5), 高乙醇含量 [一般为 12% (V/V)], 一定的游离 SO_2 含量, 低温 (18~20 °C) 及营养物质缺乏等^[3,4]。使用筛选的 MLB 菌株作为发酵剂来接种葡萄酒, 可以通过添加足够量的 MLB, 以减缓由于 MLB 数量不足所带来的发酵缺陷。但实践发现从自然 MLF 的葡萄酒中分离出的酒酒球菌, 经实验室培养基的培养增殖后, 重新接种到葡萄酒中却能丧失其原有的生存能力^[14]。接种葡萄酒后的菌体存活率一般在 0.01%~1% 之间, 而且刚开始

存活的细菌也会逐渐丧失活性, 不能正常启动 MLF。发酵剂在接种前, 必须在添加有葡萄酒的培养基中预培养 2~3d, 方能有效地提高该菌株的接种存活率。这种活化发酵剂的方式是一种适应性的步骤, 不能让乳酸菌增殖, 相反, 还能减少活菌数^[3,4]。我们把从山东烟台地区筛选出的酒酒球菌菌株 SD-2h 通过改良型 ATB 培养基 [ATB 培养基+ SO_2 10mg/L, 无水乙醇 11% (V/V), pH3.2] 驯化培养和葡萄汁培养基扩大培养后, 直接将菌体接种葡萄酒, 结果表明 MLF 能顺利进行, 且 MLF 速率随接种量的增加而加快^[5]。用葡萄酒代替葡萄汁进行扩大培养, 能获得更好的发酵效果。在扩大培养过程中, 培养液 pH、温度、乙醇含量、营养状况对直接接种后 MLF 效率都存在影响^[6]。葡萄酒微生物学家们做了许多基础研究来探索 *O. oeni* 在葡萄酒环境中的存活机制, 同时, 人们需要发展直投式葡萄酒乳酸菌发酵剂的生产技术, 获得发酵活力强, 活菌数高, 在接种葡萄酒时可以直接使用, 无须中间继代培养和预培养过程的商品化发酵制剂。因此, *O. oeni* 胁迫适应性机制的研究备受关注。

本文将从能量供给、细胞膜组分调整、胁迫蛋白合成等三方面, 对 *O. oeni* 在恶劣葡萄酒生境条件下形成

*通讯作者。Tel/Fax: +86-29-87092107; E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 赵文英 (1977-), 女, 山西临汾人, 讲师, 在职博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zvr1zwy2@sohu.com

收稿日期: 2007-08-30; 修回日期: 2007-12-03

的胁迫适应性机制进行综述。

1 MLF 与膜 H^+ - F_0F_1 -ATP 酶

酒精发酵结束后的葡萄酒是 *O.oeni* 的不良生长基质, *O.oeni* 不仅需要增强对低 pH 值, 酒精及 SO_2 的抗性, 而且要从营养物质匮乏的葡萄酒中通过物质代谢获取生长所需的能量。而 MLF 在增强抗逆性和供给能量方面发挥着重要作用。对于 *O.oeni*, Cox 和 Henick-Kling^[7] 早已提出 MLF 本身并不产能, 而是通过质子推动力(Proton motive force, pmf)的形成, 促使膜上的 H^+ -ATP 酶合成 ATP 的。在葡萄酒酸性条件下, 苹果酸主要以一价苹果酸根离子的形式存在, 该离子在苹果酸通透酶的作用下, 被转运至细胞内。由于苹果酸在脱羧反应中消耗了一个质子, 所以细胞内 pH 值增加。细胞质碱性化导致跨膜 pH 梯度(ΔpH)(细胞内 pH 值高)的产生。同时由于带电的苹果酸根离子的摄入和不带电的乳酸的流出, 形成了电化学梯度($\Delta \Psi$), 两者结合就产生了跨膜的质子推动力(pmf)。pmf 驱动膜上的 H^+ - F_0F_1 -ATP 酶产生 ATP^[9](图 1)。实验已证实^[7]MLF 期间 *O.oeni* 具有较高的 ATP 产生量, 而且利用 H^+ -ATP 酶的抑制剂能阻止 ATP 的合成。

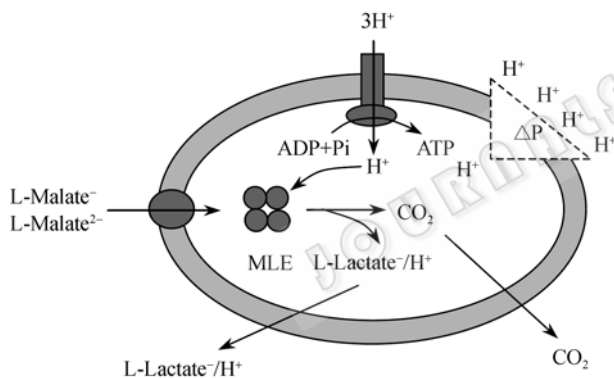


图 1 苹果酸—乳酸发酵能量产生机理模式图

Fig. 1 Model of energy derivation from malolactic fermentation.

另外, 由于葡萄酒中 pH 很低, 膜 H^+ -ATP 酶耦合 ATP 的水解, 将质子排出细胞, 对维持质子推动力, 和保持细胞内环境稳定都是很有利的。从长期 pH 2.6 培养条件下分离得到的抗酸的 *O.oeni* 突变体 LoV8413 发现具有很高的膜 H^+ -ATP 酶活性^[8]。与之相对应的 H^+ -ATP 酶活性缺陷的 *O.oeni* 突变体, 在 pH 5.3 条件下, 生长速率约为野生菌株的 46%~86%, 在 pH3.2 条件下, 不能生长, 且显著死亡。而且研究发现这些突变菌株在强酸条件下, 没有苹果酸乳酸活性^[11]。所以, *O.oeni* 膜 H^+ -ATP 酶不仅控制着细胞内的 pH, 在抗酸机制中也发

挥着重要作用, 而且对细胞的生长是必需的。

O.oeni H^+ -ATP 酶是典型的 F_1F_0 -ATP 酶。这个多聚酶就具有双重作用, 既可以用质子合成 ATP, 也可以反过来利用 ATP 水解产生的能量将质子泵出细胞^[10]。而编码苹果酸乳酸酶的操纵子在 H^+ -ATP 酶缺陷的突变体中没有被转录, 与苹果酸乳酸基因表达有关的编码 LysR-型调控蛋白的 *mleR* 基因也没有被转录。这便从分子水平上说明了 H^+ -ATP 酶活和 MLF 代谢之间有一定的关联^[11]。但 Fortier^[10] 提出 ATP 酶的活性不直接受苹果酸代谢的影响, 而受介质 pH 的影响强烈。*O.oeni* IOB84.13 在 pH 3.5 培养条件下, 24h 后 H^+ -ATP 酶的总活性达到最大, 是 pH 5.3 条件下 H^+ -ATP 酶活的 1.6 倍, 这表明在低 pH 培养条件下, H^+ -ATP 酶被逐渐诱导增加。介质 pH 越低, *atp* mRNA 的合成量越大, 同时基因的调控发生在转录水平上^[10]。所以, *O.oeni* 在酸胁迫条件下, 能通过诱导膜 H^+ -ATP 酶的活性, 以增强菌株的耐酸性, 同时, 膜 H^+ -ATP 酶的活性越强, MLF 活性也会越强, 这为 *O.oeni* 在葡萄酒环境中的生长提供了能量保障。由于葡萄酒中的其他胁迫因素, 如 SO_2 , 脂肪酸, 铜离子, 对膜 H^+ -ATP 酶具有较强的抑制作用, 所以会使细菌的生长和 MLF 受阻^[12]。故 *O.oeni* 膜 H^+ -ATP 酶活性可认为是细胞生理状态及进行 MLF 的良好指示物。

2 环境胁迫对 *O.oeni* 细胞膜组分的影响

细菌的细胞膜包围在有机体的外表面, 将其与外界环境隔离开。很多膜蛋白以各种方式结合或镶嵌在脂类双分子层中, 行使着各种重要的生理功能。脂类双分子层一方面为膜提供了一个结构基础和膜上蛋白质合适的微环境, 另一方面他们本身也参与了许多膜的功能^[19]。细菌的脂肪酸组成在很多情况下取决于其生长的环境, 所以其种类和数量是多变的。Garbay 等^[13] 研究发现在含有葡萄酒的培养基条件下, *O.oeni* 的整体脂肪酸含量下降了。而且多种胁迫因素都能致使 *O.oeni* 膜磷脂与蛋白比例的明显下降。不仅细胞膜的磷脂含量下降了, 而且更重要的是膜蛋白含量增加了近五倍。而且蛋白/磷脂比值越高, 菌体的接种存活率就越高^[14]。

2.1 乙醇胁迫与膜组分的调整

细胞膜的物理特性和流动性需要不断的调整, 因为这决定着膜的完整性及膜通透酶的活性, 从而影响着 *O.oeni* 细胞生长代谢能的产生。细胞膜的流动性是细胞的重要的特征, 它同时受到环境的影响和细胞的

调控。当细胞调控不能补偿环境影响时, 细胞膜就会发生生理变化, 引起生长停滞甚至死亡。

O.oeni 乙醇耐受性是影响接种存活率的重要因素之一。乙醇对膜的毒害作用主要表现在破坏了水相双电层, 与水分子竞争膜极性位点, 选择性地结合在膜蛋白的极性区域。乙醇增加了细胞膜的通透性, 使得质子或其他离子的透过率增强, 导致质子推动力分散, 能量转化效率降低。而且, 膜通透性的增加还会影响到膜内 pH 的稳定或导致重要代谢物的丢失。因此, 接种后造成 MLF 启动失败的原因可以解释为乙醇协同低 pH 值共同作用的结果^[15-17]。Graca da Silveira 等^[16]认为接受 8% (vol/vol) 乙醇胁迫处理的细胞比没有接受胁迫处理的细胞表现出了较强的乙醇耐受性, 因为受乙醇胁迫处理后的 *O.oeni*, 其细胞膜完整性增强了, 通透性降低了^[17], 且其细胞膜流动性降低了^[16]。膜组分分析表明接受 8% (V/V) 乙醇胁迫处理的细胞, 细胞膜磷脂总量减少了^[16], 且膜中乳杆菌酸(lactobacillic acid (C19cyc11))的含量增加了^[22]。*O.oeni* 对乙醇的适应性反应在很大程度上是基于乙醇对细胞膜物化特性的调整, 通过调整膜组分不断固化细胞膜而增加其完整性, 进而增强细胞在该介质中的生存能力^[19, 20]。其中, 乳杆菌酸在增强乙醇耐受性方面所发挥的作用值得进一步探讨。另外, 经乙醇胁迫适应后的细胞, 其代谢能力增强了。它们比没有进行乙醇胁迫处理的细胞, 能更有效的降解苹果酸和产生 ATP^[18]。这可能与细胞膜的完整性增强有关。由此可看出, 经乙醇胁迫处理的 *O.oeni* 不仅提高了对乙醇的耐受性, 而且增强了细胞代谢功能, 尤其是 MLF 的能力。但遗憾的是, 至今没有葡萄酒处理与其他单因素胁迫(如 pH 胁迫)处理对细胞膜完整性影响的报道。

2.2 酸胁迫与膜组分的调整

在乳酸菌中, 酸的耐受性可以在两个明显的生理阶段得到增强。(1) 在指数生长期: 细胞在非致死酸性条件下能诱导产生适应性胁迫反应; (2) 在进入稳定期后: 耐酸性增加是因为诱导了通用压力蛋白。相对于乙醇胁迫, 酸胁迫对细胞膜影响的研究要少的多。降低培养基的 pH 值, *O.oeni* 显著增加了细胞膜中乳杆菌酸的含量^[21]。Drici-Cachon 等^[7]研究了 3 株 *O.oeni* 在不同 pH 条件下, 膜脂肪酸的变化情况, 结果表明 pH 对 Lo107(嗜嗜酸菌)和 Lo8413(中性嗜酸菌)的调整幅度较大, 而对 LoATCC 23277(弱嗜酸)的调整幅度较小, 且脂肪酸的不饱和度随 pH 的变化而变化。这些研究只停留在培养基 pH 值对细胞膜组分的影响, 并没有揭示出

接种葡萄酒后 MLF 活性, 及冻干存活率与细胞膜组分之间的联系, 因此有待加强该领域的研究。

3 胁迫蛋白的合成

有研究表明^[37], 利用酸适应的方法能提高 *O.oeni* 对 SO₂ 的耐受性, 这可能与酸胁迫诱导胁迫蛋白的合成有关。细菌在利于其生存的条件下(例如丰富的营养, 适宜生长的温度, pH 值, 渗透压以及氧化还原电势等), 会尽可能地阻遏冗余或非必需蛋白的表达, 加速合成生长必需的细胞组分; 如果生存环境发生了变化, 不利于其生存时(例如不适合生长的物化条件, 营养不足等), 即在胁迫环境条件下, 细菌会将用于生长的资源转而用于合成那些可以抵御压力环境, 修复损伤的蛋白^[39]。而对 *O.oeni* 进行胁迫适应性反应机制的研究, 就是要找到这些在胁迫条件下发挥关键性作用的蛋白。

3.1 小热休克蛋白 Lo18 和相应的基因

O.oeni 在热(42 °C), 酸(pH 3), 乙醇(12% (V/V))休克处理后, 小热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)Lo18 能被大量诱导, 并且在生长稳定期也能被诱导产生^[23]。*O.oeni*Lo18 相应的基因(*hsp18*), 编码了由 148 个氨基酸所组成的多肽, 其分子量为 16938 Da。将 Lo18 纯化并分析氨基酸序列后发现, 它同丙酮丁醇梭杆菌(*Clostridium acetobutylicum*)Hsp18 的组成非常接近^[24]。由于原核生物的小分子量热休克蛋白同脊椎动物眼睛晶体的 α -晶体蛋白有相同的保守序列, 所以 *O.oeni*Lo18 可能参与了变性蛋白的重折叠。实验发现^[25]即使是在 60 °C 条件下, *O.oeni* 的 Lo18 仍能阻止柠檬酸合成酶和乳酸脱氢酶的聚集。这说明 Lo18 确实具有分子伴侣的功能。研究者发现随着温度的升高, Lo18 与膜结合的数量会增大^[36]。而且在乙醇和苯乙醇存在的条件下, *O.oeni* 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, 有助于保持膜的完整性^[26], 从而增强了 *O.oeni* 对葡萄酒环境的适应性。实验表明在 pH3.0 条件下, 具有较高的 MLF 活性并且 Lo18 的诱导量较大的 *O.oeni* 静息细胞, 在接种葡萄酒后的生长速率和苹果酸消耗率也都很高^[35]。所以, Lo18 是 *O.oeni* 在适应胁迫环境过程中发挥重要作用的一种胁迫蛋白。

3.2 其它胁迫蛋白及其基因表达

O.oeni 的其他胁迫蛋白及其基因的表达正不断被发现及报道。它们包括: ClpX^[27]; TrxA^[23, 28]; FtsH^[29]; ClpLP^[30]; OmrA^[31]; GroESL 和 DnaK^[32]; 研究者发现 *O.oeni* 在胁迫适应性反应阶段, 这些胁迫基因的表达

模式有所不同, 并且这些胁迫蛋白不仅在胁迫条件下发挥作用, 而且在周期生长阶段也发挥着特定的作用。

在前期研究 *O.oeni* 胁迫反应的机制时, 多是让细胞在短时间内接受一种胁迫因素来进行的。但 *O.oeni* 接种到葡萄酒中后, 接受到的是多种胁迫的影响。Beltramo 等^[33]利用反转录定量 PCR 技术, 比较了不同培养条件及在接种葡萄酒后, *O.oeni* 多种胁迫基因的表达情况。与 pH 5.3 的培养条件相比, 在 pH 3.5 条件下, *O.oeni* 大幅增加了 *clpL2*, *clpL 1*(编码蛋白酶 Clp 家族成员), *hsp18*(编码 Lo18) 和 *trxA*(编码硫氧还蛋白)的表达水平。这些基因并不像以前描述^[23,24]的那样只是在短暂胁迫后产生, 而是酸胁迫环境增加了这些基因的基础表达水平, 因此, 低 pH 条件下培养所得的菌体, 在接种到模拟葡萄酒中后, 菌体的存活率大大提高了。不难看出, 处于胁迫适应状态的 *O.oeni* 需要利用胁迫基因的大量表达, 合成分子伴侣和蛋白酶, 从而得以在葡萄酒环境中生存生长^[38]。另外, 实验也表明 *O.oeni* 存在着胁迫交叉保护现象, 因为经酸胁迫处理的细胞接种葡萄酒后, 增强了对乙醇(11%, V/V), 低温 18 (相对于 30)及营养困乏等胁迫的抗性。

3.3 胁迫基因的表达调控

O.oeni IOB 8413 (ATCC BAA-1163) 基因组的序列分析表明^[34], 在大多数主要的分子伴侣基因的上游存在着 *ctsR* 基因, 但没有发现可替代性 σ 因子的基因序列, 而且也没有找到其他的胁迫反应调控蛋白基因, 如 *hrcA*。*O.oeni* 是第一例 *dnaK* 和 *groESL* 受 CtsR 蛋白调控, 而非 HrcA 蛋白调控的菌种。由此可看出, *O.oeni* 同其他类似的革兰氏阳性细菌在胁迫基因调控机制上存在着差异。由 CtsR 调控的 *O.oeni* 胁迫基因表达模式和水平不同, 这可能与诱导因素有关, 也可能在转录后的水平上存在着其他的调节机制, 如 *clpX* mRNA 的 5' 末端被鉴定有一长的非翻译序列, 这可能与 mRNA 稳定性或控制翻译有关^[32]。这样, 鉴定调控子(Regulon)的数目, 并通过分析特异性的基因突变体对胁迫适应的影响, 进而研究这些调控子对 *O.oeni* 在葡萄酒中存活的贡献以及对抗冷冻干燥特性的影响, 便成了今后工作的重点。总之, 这些研究必将对理解 *O.oeni* 的细胞生理起到举足轻重的作用。

4 研究展望

O.oeni 胁迫适应性机制的研究应获得以下目标: (1) 发展生化和分子手段以筛选高耐受性的菌株; 由于

O.oeni 菌株间存在着固有胁迫抗性的差异, 因此筛选出固有胁迫抗性强的菌株是进行直投式发酵剂生产的首要条件。通过测定待选菌株的苹果酸乳酸活性, ATP 酶活性以及 Lo18 的表达量, 可作为快速筛选发酵剂菌株的一种新策略。并且随着胁迫机制的深入研究, 有望找到更为准确可靠的分子指标。(2) 发展生化和分子手段来评估细胞是否完全适应胁迫环境, 并可应用于胁迫环境。由于 MLF 的启动和发酵速率决定于菌密度、细胞生理状态和特定的 MLF 活性, 而通过诱导 *O.oeni* 菌株的适应性胁迫反应无疑会增强该菌株对后续胁迫的抗性, 从而可以提高它在接种葡萄酒后的存活率及发酵活性, 而胁迫因素通常会影响菌体的生物量。因此, 在发酵剂制备过程中, 找到适当的生化或分子学指标来判定细胞的适应性是非常必要的。另外, 至于发酵剂的保藏, 胁迫处理能否增强菌株的抗冷冻干燥性, 并使其在保藏期间保持活性, 应作为今后一个的研究方向。(3) 异源表达 *O.oeni* 的胁迫相关基因来构建工程菌株, 使工程菌株具有耐酸、耐乙醇、耐冷冻干燥等特性。这在微生物育种方面具有诱人的发展前景。

参 考 文 献

- [1] 李华. 现代葡萄酒工艺学. 第二版. 西安: 陕西人民出版社, 2000.
- [2] 张春晖, 夏双梅, 李华. 酒类酒球菌的分离和发酵适应性研究. 中国食品学报(*Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*), 2004, 4: 35-38.
- [3] Lonvaud-Funel A. lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 76: 317-331.
- [4] Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and MLF in wine: A review. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 1999, 23: 447-455.
- [5] 王华, 王芳. 不同乳酸菌接种量进行苹果酸-乳酸发酵对葡萄酒质量的影响. 中国食品学报(*Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*), 2001, 2: 41-43.
- [6] 于清琴, 杨立英, 张历俊. 苹果酸-乳酸发酵的人工诱发程序中外葡萄与葡萄酒(*Sino-overseas grapevine & wine*), 2002, 1: 54-55.
- [7] Cox DJ, Henick-Kling T. Chemiosmotic energy from MLF. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171: 5750-5752.
- [8] Koebmann BJ, Nilsson D, Kuipers OP, et al. The membrane-bound H⁺-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 4738-4743.

- [9] Salema M, Lolkema JS, San Romão MV, *et al.* The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 3127–3132.
- [10] Fortier LC, Tourdot-Marechal R, Divies C. Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 222: 165–169.
- [11] 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*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 1973–1979.
- [12] Carrete R, Vidal MT, Bordons A. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*, *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211: 155–159.
- [13] Garbay S, Rozes N, Lonvaud-Funel A. Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. *Food Microbiology*, 1995, 12: 387–395.
- [14] Garbay S, Lonvaud-Funel A. Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 81: 619–625.
- [15] Barry JA, Gawrisch K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid–water interface of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 1994, 33: 8082–8808.
- [16] Graca Silveira M, Golovina EA, Hoekstra FA, *et al.* Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5826–5832.
- [17] Graca Silveira M, Vitoria SRM, Loureiro DMC, *et al.* Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 6087–6093.
- [18] Graca Silveira M, Baumgartner M, Rombouts FM. Effect of Adaptation to Ethanol on Cytoplasmic and Membrane Protein Profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 2748–2755.
- [19] 情森芳. 膜分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [20] Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal PA, *et al.* Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 17: 118–124.
- [21] Schmitt P, Mathot AG. Fatty acid composition of the genus *Leuconostoc*. *Milchwissenschaft*, 1989, 44: 556–559.
- [22] Teixeira H, Goncalves MG, Rozes N, *et al.* Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress? *Microbiological Ecology*, 2002, 43: 146–153
- [23] Guzzo J, Jobin MP, Delmas F, *et al.* Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55: 27–31.
- [24] Guzzo J, Pierre F, Jobin MP, *et al.* A small heat shock protein induced by multiple stresses and during stationary growth phase from *Leuconostoc oenos*. *Letters of Applied Microbiology*, 1997, 24: 393–396.
- [25] Coucheney F, Gal L, Beney L, *et al.* A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1720: 92–98.
- [26] Delmas F, Pierre F, Coucheney F, *et al.* Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, 3: 601–610.
- [27] Jobin MP, Garmyn D, Divies C, *et al.* The *Oenococcus oeni* clpX Homologue Is a Heat Shock Gene Preferentially Expressed in Exponential Growth Phase. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 6634–6641.
- [28] Jobin MP, Garmyn D, Divies C, *et al.* Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology*, 1999, 145: 1245–1251.
- [29] Bourdineaud JP, Nehme B, Tesse S, *et al.* The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 2511–2520.
- [30] Beltramo C, Grandvalet C, Pierre F, *et al.* Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* clpPclpL locus expression in response to stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 2200–2205.
- [31] Bourdineaud JP, Nehme B, Tesse S, *et al.* A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 92: 1–14.
- [32] Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, *et al.* Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29: 465–475.
- [33] Beltramo C, Desroche N, Tourdot-Marechal R. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology*, 2006, 157: 267–274.
- [34] Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, *et al.* CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 5614–5623.
- [35] Coucheney F, Desroche N, Bou M, *et al.* A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic

- starters. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105: 463–470.
- [36] Guzzo J, Cavin JF, Divies C. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology Letters*, 1994, 16: 1189–1194.
- [37] Guzzo J, Jobin MP, Diviés C. Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160: 43–47.
- [38] Zhang D, Lovitt RW. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81: 1130–1140.
- [39] 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. *生物技术通讯(Letters in Biotechnology)*, 2007, 118: 511–514.

Adaptive Stress Response Mechanisms of *Oenococcus oeni* ——A Review

Wenyng Zhao, Hua Li*, Hua Wang

(College of Enology, Northwest University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Three main mechanisms for stress tolerance response of *O. oeni* were addressed in the review. Activation of MLF and membrane-bound H^+ - F_0F_1 -ATPases activity were utilized to maintain the intracellular environment and to control the energetic status of *Oenococcus oeni*; Cell membrane compositions and fluidity were adjusted to compensate for the various stresses environmental effects; In addition to a small heat shock protein Lo18, many other stress proteins and corresponding genes were also found to be involved in the *Oenococcal* adaptive stress responses. *CtsR*-dependent gene regulation systems were demonstrated in *Oenococcus oeni*. A better understanding of *Oenococcus oeni* stress adaptive response mechanisms should play an important role in screening of highly tolerant strains, mastering the characterization of malolactic starters and rationalizing industrial processes of preparing wine malolactic starter. Furthermore, *Oenococcus oeni* stress genes also could be used for constructing engineer strains with new properties.

Keywords: *Oenococcus oeni*; ethanol stress; acid stress; adaptive stress response

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87092107; E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

Received: 30 August 2007/ Revised: 3 January 2008

答 作 者 问

问: 在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表?

答: 这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物,有正式书号或刊号,则不能再在本刊发表;(2)如果不是正式出版物,则属于交流材料,论文可以投稿本刊。

问: 投稿时都需要哪些材料, 是否还需要纸稿?

答: 从 2006 年起, 本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供:(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位), 介绍信模板可从我刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊 E-mail 发出的“收稿通知”后, 需要及时补充纸样的 1 份稿件和介绍信, 并缴纳 100 元稿件受理费。

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿结果的时间可能会超过 2 个月。