

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :299 - 308; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.007

巴氏醋酸杆菌对发酵中醋酸胁迫的生理应答

亓正良¹, 杨海麟¹, 夏小乐¹, 王武¹, 冷云伟², 余晓斌^{1*}, 权武³

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中国矿业大学, 江苏 徐州 221008

³徐州恒顺万通食品酿造公司, 江苏 徐州 221003

摘要:【目的】研究 *Acetobacter pasteurianus* CICIM B7003 对醋酸发酵形成的酸胁迫环境在细胞形态、生理、代谢方面的响应, 初步提出巴氏醋杆菌的动态耐酸机制模型, 为高酸度高强度液态深层醋酸发酵提供理论帮助。【方法】在9 L自吸式发酵罐中用 *A. pasteurianus* CICIM B7003 发酵醋酸, 选取不同生长阶段细胞检测其荚膜多糖含量、膜不饱和脂肪酸含量、耐酸基因转录水平、乙醇呼吸链酶和 ATP 酶活性, 研究醋酸菌形态、生理和代谢随醋酸积累的变化。【结果】醋酸的存在能减少细胞分泌荚膜多糖, 发酵中多糖占细胞干重百分比由最初 2.5% 下降到 0.89%; 随发酵进行细胞膜不饱和脂肪酸占膜总脂肪酸含量显著提高, 致使细胞膜流动性增加; 耐酸基因相对转录水平显著提高而提升了细胞对酸性环境的抗性; 乙醇呼吸链酶和 ATP 酶活性随醋酸积累也显著提高, 为细胞提供足够的能量以满足耐酸机制对能量的需求。【结论】初步确定 *A. pasteurianus* CICIM B7003 主要依靠改变细胞膜脂肪酸组分、激活耐酸基因转录、增强乙醇呼吸链活力及快速产能等机制的协同作用, 实现对酸胁迫的制衡。

关键词: 巴氏醋酸杆菌, 醋酸发酵, 醋酸胁迫, 耐酸生理应答

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0299-10

醋酸菌属于变形菌纲, 醋杆菌科, 是食醋酿造的主要菌种^[1]。大部分醋酸菌具有较强的利用乙醇生产醋酸的能力^[2]。醋酸菌特别是属于 *Acetobacter* 和 *Gluconoacetobacter* 属的部分菌株由于卓越的乙醇氧化和醋酸耐受能力而被广泛用于食醋的工业酿造^[3-4]。醋酸菌氧化乙醇成醋酸的分子机制已被深入研究, 大量研究证实醋酸菌把乙醇氧化为醋酸是由膜结合乙醇脱氢酶 (ADH), 乙醛脱氢酶 (ALDH)

和泛醌氧化酶共同作用下完成, 乙醇氧化失去的电子在这三种酶构成的乙醇呼吸链中传递^[5-7]。

食醋生产中醋酸菌不可避免地暴露于乙醇、乙酸等环境压力下。发酵中伴随乙醇氧化大量醋酸积累, 由于高浓度醋酸很容易经过细胞膜渗透到细胞质中, 故对菌体生长及代谢产生不利影响。醋酸所造成的环境压力是最主要也是最重要的生长代谢限制因素。目前, 醋酸菌耐酸机制还没彻底探明。业

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA10Z314); 江苏省创新工程 (JUDCF11009); 江南大学博士创新资助项目 (JUSRP111A25); 国家自然科学基金青年基金 (31301540)

* 通信作者。E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn; Tel: + 86-510-85918167

作者简介: 亓正良 (1986 -), 男, 山东莱芜人, 博士研究生, 主要研究方向为发酵工学。E-mail: qz2012@aliyun.com

收稿日期: 2013-07-11; **修回日期:** 2013-10-16

已证实 *A. aceti* 和 *Gluconacetobacter* 中存在如下一些与耐酸相关的分子机制: (1) 乙醇氧化相关的机制, 包括膜结合乙醇脱氢酶 (ADH)、乙醛脱氢酶 (ALDH) 机制。Okumura 等报道经自然诱变的 *A. aceti* 因 ADH 活性缺失而使该菌在含有醋酸培养基中的菌体浓度显著下降^[8]。Chinnawirotpisan 等在 *A. pasteurianus* 中也发现这一现象^[9]。(2) 醋酸同化机制, 业已证明 *aarA*、*aarC*、顺乌头酸酶基因编码的蛋白用于醋酸同化作用。*aarA* 编码柠檬酸合酶, *aarC* 编码醋酸激酶^[10]。(3) 可能将醋酸泵出的 ATP 结合性盒型 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白机制。ABC 转运蛋白超家族中的 AatA 蛋白与依靠质子动势驱动泵出醋酸的机制有所不同, ABC 转运机制是一种主动运输机制^[11]。(4) 通用抗逆机制, 包括分子伴侣及伴侣蛋白, 如 GrpE/DnaK/DnaJ^[12]。此外, 有报道称 *A. aceti* 膜的流动性与醋酸抗性有关, 当编码卵磷脂前体磷脂酰乙醇胺的磷脂酰乙醇胺-N-转甲基酶基因被阻断后, 醋酸菌在含有醋酸的培养基上生长极其缓慢^[13-14]。

阐明醋酸菌的醋酸抵御机制对于醋酸生产采取更有效的技术至关重要。醋酸菌耐酸机制应该是一个有机协调的整体, 但目前报道的耐酸分子机制都是相对独立的。本研究通过分析醋酸发酵中巴氏醋杆菌形态, 生化属性, 耐酸基因转录水平, 乙醇呼吸链中酶及 ATP 水解酶活性的变化, 首次提出巴氏醋杆菌可能存在的有机协作的耐酸机制模型, 为进一步研究提供了实验和模型基础, 同时对高酸度高强度醋酸发酵生产也有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 葡萄糖, 酵母粉, KH_2PO_4 , MgSO_4 , 无水乙醇, 冰醋酸等试剂, 购于国药集团; 葡萄糖标准品, 三磷酸腺苷酸 (ATP), Ubiquione 2 (Q_2), 购于 Sigma 公司; 荧光定量 PCR 相关试剂, 购于上海生工生物公司; Pilot-Acetator 9 L 发酵罐, 德国 Frings 公司; 日立 L-2000 高效液相色谱仪, 超速离心机, 日本日立公司; 可见分光光度计, 上海普美达; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.1.2 菌种: *Acetobacter pasteurianus* CICIM B7003 为本实验研究用菌株, 由徐州恒顺万通食品酿造有

限公司惠赠。

1.1.3 培养基: (1) 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10、酵母粉 10, 调 pH6.5, 121℃ 灭菌 20 min 后加入无水乙醇至终浓度为 24。(2) 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 5、酵母粉 5、 KH_2PO_4 0.6、 MgSO_4 0.4, 121℃ 灭菌 20 min 后根据实验设计加入无水乙醇及醋酸至一定浓度。(3) 固体培养基 (g/L): 葡萄糖 10、酵母粉 10、琼脂粉 20, 121℃ 灭菌 20 min, 冷却至 60℃ 左右, 加入无水乙醇至 32, 摇匀后倒平板。

1.1.4 荧光定量 PCR 引物: 引物序列采用 Premier 5.0 软件设计。(1) 管家基因 (23S rRNA) 引物序列, 23s-F: 5'-CCGACACAGGTGGACTGGTA-3'; 23s-R: 5'-CCTAGTTCCTTCAGCATCGTTCTC-3'。(2) 目的基因引物序列, *aatA*-F: 5'-GACGAACCGACGAA CGATCT-3'; *aatA*-R: 5'-CAGTTGTAAGGGGTTTCTG GTTC-3'; *grpE*-F: 5'-TCGTGCAAAGCGTGATCTG-3'; *grpE*-R: 5'-CGTCACGCGCAAATTTCTG-3'; *dnaK*-F: 5'-CATTGTGTCTGTGTCTGCTA-3'; *dnaK*-R: 5'-TTGGCTTCAGCGTCCCTC-3'; *dnaJ*-F: 5'-CAGCAGA AGCCAAGTTCA-3'; *dnaJ*-R: 5'-CGCTTTTGTTCGT CCTTCA-3'。

1.2 菌种活化

用接种环刮 2-3 环保藏斜面菌苔接入种子培养基 (无酒精和醋酸添加), 在 170 r/min, 30℃ 恒温条件下旋转床培养 24 h。取一定量菌液, 在 600 nm 波长处测量其 OD 值, 看其是否达到 0.8-1.0, 然后对菌进行革兰氏染色, 观察其形态, 判断菌自身状况是否良好及检查是否染菌。当达到以上的标准时, 可以进行发酵使用。

1.3 自吸式发酵罐发酵

将制备好种子按 10% (V/V) 接种量接入 Frings 9 L Pilot-Acetator 发酵罐, 内含 5.4 L 新鲜发酵培养基, 初始醋酸和酒精浓度分别为 10 g/L 和 32 g/L, 通气速率为 72 L/h, 30℃ 恒温培养 36 h。

1.4 平板培养

将涂布菌液的平板放入恒温培养箱 30℃ 下培养 60 h。

1.5 荧光定量 PCR

分别取培养 0 h 和 20 h 的发酵液收集菌体。用 Trizol 法提取细菌总 RNA, 按 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书迅速反转录第一链 cDNA。以 23S rRNA 基因为管家基因, 将反转录的

cDNA 上机检测, 荧光定量 PCR 反应体系和条件分别见表 1、2。

表 1. 荧光定量 PCR 反应体系

Table 1. Quantitative real-time PCR reaction system

reaction component	concentration	volume/ μ L
sybrGreen qPCR Master Mix	2 \times dilution	10
primer F	10 μ mol/L	1
primer R	10 μ mol/L	1
ddH ₂ O		7
template (cDNA)	50 mg/L	1
Total		20

表 2. 荧光定量 PCR 条件

Table 2. Quantitative real-time PCR reaction conditions

thermal cycler	time	T/ $^{\circ}$ C	cycles
initial Steps	2 min	95	0
melt	10 s	95	40
anneal/extend	40 s	60	40

1.6 细胞膜制备

取一定量醋酸发酵液, 8000 \times g 离心 10 min 获得菌体细胞, 用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (KPB, pH 5.8) 漂洗细胞 2-3 次后, 用同样 KPB 缓冲液重悬 (每克湿菌体加 4 mL 缓冲液)。细胞悬液用超声波破碎仪破壁 20 min (240 W 55 kHz, 1 s/3 s), 细胞破碎液 8000 \times g 离心 10 min, 取上清于 100000 \times g 超速离心 1.5 h, 倒掉上清, 沉淀为细胞膜, 重悬于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (KPB, pH 5.8), -20 $^{\circ}$ C 储存备用。整个提取过程在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行。

1.7 分析方法

1.7.1 苯酚-硫酸法测定细胞多糖含量: 用 50 mmol/L KPB 缓冲液 (pH 5.8) 洗涤菌体 2-3 次后重悬获取细胞悬液。将 50 mL 浓硫酸缓缓加入 10 mL 水中, 冷却至室温加入 0.6 g 苯酚晶体, 搅拌使其溶解配成显色液。取 1.00 mL 细胞悬液于试管中, 加入 5.00 mL 显色液震荡混匀, 置于沸水浴中保温 30 min, 取出放在冷水浴中冷却至室温并于 490 nm 处测定其 OD 值^[15]。每个样品平行测定 3 次, 且 $P < 0.05$ 。

1.7.2 气质联用测定细胞膜脂肪酸成分: 细胞膜脂肪酸制备参照 Miller 等人的方法操作^[16]。气相色谱分析条件: PEG 毛细管填充柱 (30 m \times 0.22 mm i. d., 0.25 μ m film, Restek); 载气: 氦气; 流速: 29.6 mL/min; 柱压: 63.4 kPa; 柱流量: 0.5 mL/min; 进样口温度: 260 $^{\circ}$ C; 检测器温度: 280 $^{\circ}$ C; 柱温升温程序: 起始温度为 100 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 随后以 40 $^{\circ}$ C/min

的速率增至 250 $^{\circ}$ C 并保持 5 min^[16]。C₉-C₂₀ 的脂肪酸成分均可根据各自的保留时间和质谱范围在图库中进行查找, 每个样品平行测定 3 次, 且 $P < 0.05$ 。

1.7.3 乙醇 (乙醛) 脱氢酶活性: 参照 Wood 氏法^[17], 取 0.5 mL McIlvaine 缓冲液 (pH4.0), 1.0 mol/L 乙醇 (乙醛) 溶液 0.1 mL, 细胞膜 0.1 mL, 10% Triton X-100 0.1 mL 于 10 mL 比色管中, 25 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后加入 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液 0.2 mL, 在 25 $^{\circ}$ C 条件下放置反应 5 min (同时做空白对照), 然后加入硫酸铁-Dupanol 溶液 0.5 mL 终止反应, 25 $^{\circ}$ C 下放置 20 min, 加入 3.5 mL 蒸馏水混合后, 用 722 型紫外分光光度计测定 660 nm 的 OD 值。在 25 $^{\circ}$ C、pH4.0 条件下, 1 min 氧化 1 μ mol 乙醇 (乙醛) 的酶量为 1 个酶活力单位。

1.7.4 ATP 水解酶活性: 透性细胞制备参考 Matsumoto 等^[18] 的方法制备。0.1 mL ATP (30 mmol/L) + 0.4 mL 反应液 (3.75 mmol/L MgCl₂、100 mmol/L KCl、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 置于试管中, 30 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 加入透性细胞悬浮液 0.5 mL, 再保温 30 min, 加入 0.2 mL 三氯乙酸 (20%, W/V) 中止反应, 6000 \times g 离心 10 min, 取上清液 0.5 mL 加入 2.5 mL 硫酸亚铁-钼酸铵试剂。反应 10 min, 颜色变蓝后, 在 660 nm 测吸光值。根据标准曲线求出 Pi 的含量。酶的活性单位为 μ mol (Pi) / g (biomass) / min。

1.7.5 细胞色素 c 末端氧化酶活性: 末端氧化酶活性以酶对 Q₂H₂ 的氧化能力表示。总反应体系 (1 mL): 50 mmol/L KPB (pH6.5), 30 mmol/L Q₂H₂, 0.02% (V/V) Tween 20, 细胞膜蛋白。反应在 25 $^{\circ}$ C, 275 nm 波长下进行测定。吸光值对 Q₂H₂ 的毫摩尔消光系数为 15.25。

1.7.6 透射电镜分析: 细胞样品以 2.5% (V/V) 的戊二醛固定 30 min, 离心收集菌体 5000 \times g, 5 min 并与 1.25% (W/V) 水质琼脂混合。将凝固后的琼脂制成 1 mm 左右的切片, 并在含有 2.5% (V/V) 戊二醛的磷酸缓冲液中再固定 30 min。经磷酸缓冲液洗涤 3 次后, 将切片重新固定于含有 1% (W/V) 四氧化锇的磷酸缓冲液中固定 1 h, 然后用超纯水漂洗切片并在 1% (W/V) 钼酰乙酸溶液中固定 1 h。以上固定过程均在室温下完成。经过乙醇和氧化丙烯的梯度脱水后, 细胞的琼脂切片被植入环氧树脂 Epon

812, 经钼酰乙酸染色后待用。

1.7.7 葡萄糖含量: 取待测发酵液与无水乙醇按 3:7 (V/V) 比例混合, 10000 × g 离心 10 min, 取上清用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 用日立 L-2000 高效液相色谱仪测定滤液葡萄糖。色谱条件: AMINEX HPX-87H (300 × 7.8 mm, Bio-Rad 公司); 示差遮光检测器; 流动相: 5 mmol/L 稀硫酸溶液; 柱温: 60℃; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 10 μL。以葡萄糖标准品做外标, 根据检测峰面积计算发酵液中葡萄糖含量。

1.7.8 总酸含量: 取 1 mL 发酵液于 50 mL 去离子水中, 加 3 滴 1% (W/V) 酚酞, 用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定至微红色 30 s 不褪。根据消耗的标准 NaOH 的量计算总酸含量。醋酸浓度 (g/L) = $C_{NaOH} \times V \times 60$ 。注: C_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液浓度 (mol/L), V 为滴定所用 NaOH 标准溶液体积 (mL)。

1.7.9 酒精含量: Frings Pilot-Acetator 9 L 发酵罐自带在线酒精检测电极。

1.7.10 生物量: 利用 721 型可见分光光度计检测 600 nm 处的 OD 值, 根据菌体浓度与 OD 值的关系曲线计算生物量。

2 结果

2.1 *A. pasteurianus* CICIM B7003 分批醋酸发酵的菌体生长与醇/酸转化

为了研究 *A. pasteurianus* CICIM B7003 对发酵形成的醋酸胁迫的动态生理应答, 实验首先用菌 CICIM B7003 在 Frings 9 L Pilot-Acetator 中开展分批醋酸发酵, 对生长及醇/酸转化进行分析。如图 1 所示, 发酵中醋酸菌依次经历生长延滞期 (0-4 h)、加速期 (5-6 h)、对数生长期 (7-16 h)、减速期 (17-28 h) 及稳定期 (29-36 h) 5 个阶段。因底物乙醇和产物醋酸的交替抑制作用, 致使该菌的最大比生长速率仅为 0.106 h^{-1} , 最大生物量为 0.544 g/L。醋酸最终积累量为 46.77 g/L, 醋酸对乙醇的转化率为 83%。由图 1 还得知醋酸积累与菌体生长呈偶联关系。发酵終了, 发酵液中的乙醇浓度由 36.2 g/L 降为 4.4 g/L, 而葡萄糖仅从 10.24 g/L 下降到 8.97 g/L, 说明当乙醇存在时会抑制该菌对葡萄糖的利用。

2.2 醋酸胁迫对细胞荚膜合成的影响

2.2.1 醋酸胁迫下细胞荚膜的表现变化: 当醋酸浓

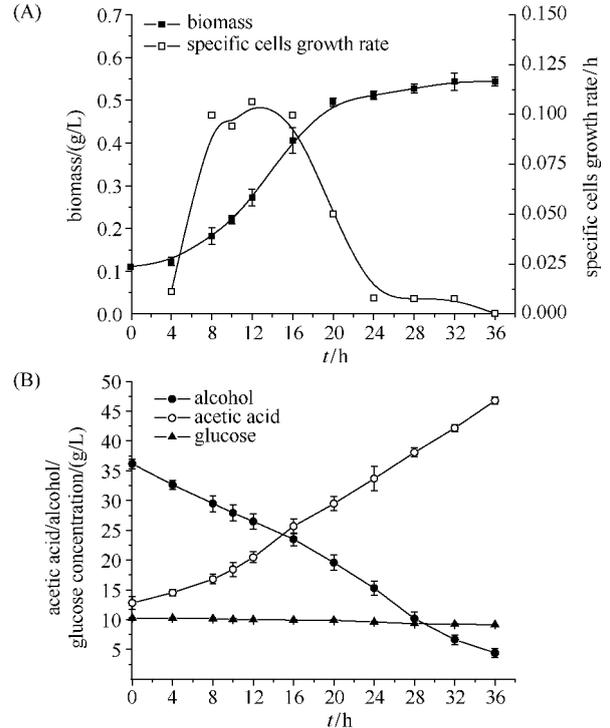


图 1. *A. pasteurianus* CICIM B7003 分批培养中 (A) 生长和 (B) 醇/酸转化曲线

Figure 1. Growth and alcohol metabolism of *A. pasteurianus* CICIM B7003 during batch fermentation. A: growth curve; B: alcohol and glucose metabolism curves.

度超过 10 g/L 时, 对大多数细菌会造成明显的毒害作用, 但醋酸菌仍能良好地生长^[19]。利用透射电镜技术观察菌 CICIM B7003 在不同醋酸浓度下菌体形态和荚膜的变化, 分析细胞对醋酸胁迫在形态方面的响应。将活化好的种子液梯度稀释后涂布于含不同醋酸浓度的平板 (0、10、30 和 40 g/L 醋酸), 培养 48 h 后拍摄电镜图 (图 2)。图 2-A 为无醋酸和乙醇添加的对照组, 胞外有明显的荚膜生成, 且细胞形状呈短粗的纺锤型。图 2-B 虽无醋酸添加, 但培养基中的乙醇被该菌氧化产生醋酸, 使菌体处于醋酸环境中。由电镜图可看到菌体周围没有明显的荚膜形成, 细胞呈长棒杆状且表面光滑。图 2-C 与图 2-B 相似, 细胞长度进一步增加, 呈细长杆状。图 2-D 中的醋酸对菌体开始产生毒害, 虽然依旧没有荚膜产生, 但细胞形态变得不规则, 长度缩短且表面毛糙。图 2-E 中只添加了 40 g/L 的醋酸, 细胞变化同图 2-D 相似, 细胞表面无荚膜, 长度更短且表面更毛糙。该图还表明醋酸菌的无荚膜表型确由醋酸胁迫造成。

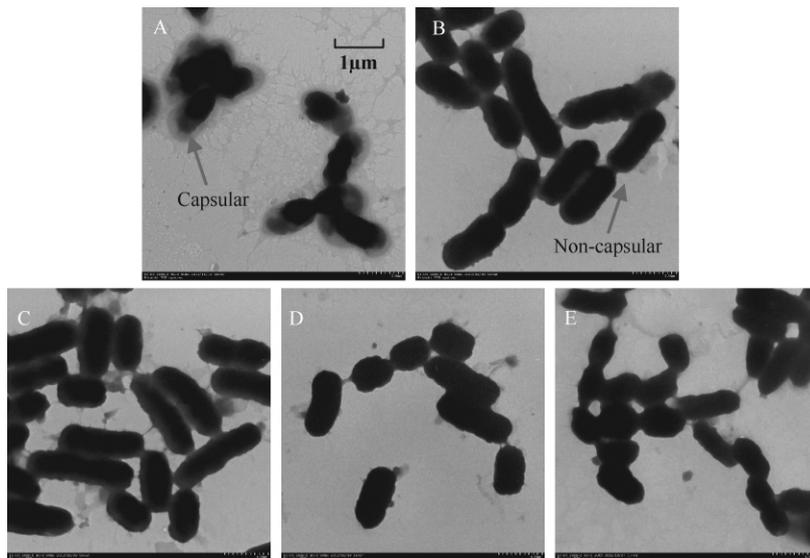


图 2. 不同培养条件下巴氏醋杆菌透射电镜图

Figure 2. Transmission electron micrographs (TEM) of *A. pasteurianus* CICIM B7003 in different acidic conditions. A: No alcohol and acetic acid was added; B: initial alcohol and acetic acid concentration were 32 g/L and 0 g/L; C: initial alcohol and acetic acid concentration were 32 g/L and 10 g/L; D: initial alcohol and acetic acid concentration were 32 g/L and 30 g/L; E: initial alcohol and acetic acid concentration were 0 g/L and 40 g/L.

2.2.2 发酵过程中细胞多糖含量的变化：荚膜在多元醇生产菌中比较常见，由图 2 可知，菌 CICIM B7003 也可形成荚膜，但随着环境中醋酸浓度升高会减少荚膜多糖的分泌。荚膜可能不是该菌抵御醋酸胁迫的必要屏障。收集培养不同时间的细胞（培养 4、12、20 和 28 h）检测细胞多糖占单位干菌体重的质量百分比（图 3）。发酵 4 h 时，醋酸浓度为 14.51 g/L，细胞多糖含量为 2.5%。发酵 12 h，醋酸浓度增到 20.46 g/L，细胞多糖含量降到 1.24%。到发酵 20 h 时，醋酸浓度为 29.47 g/L，与 12 h 时的

含量相比下降不明显（1.2%）。当发酵 28 h 时，醋酸浓度达到 38.07 g/L，细胞多糖质量仅占单位干菌体重的 0.89%，细胞多糖的合成量相对发酵初期明显减少。Andrés-Barrao 等^[20]报道了相似的现象，深入研究发现发酵过程中巴氏醋杆菌催化合成荚膜多糖前体 dTDP-鼠李糖的酶的表达量明显下降，从而导致荚膜多糖分泌量的减少。通过研究发酵过程中细胞多糖含量变化进一步验证了上述推测，同时，说明了透射电镜结果的可靠性。

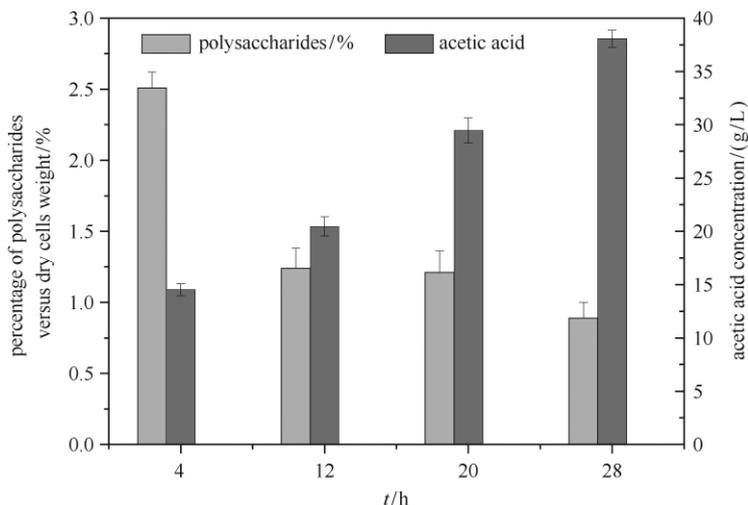


图 3. 发酵不同阶段 *A. pasteurianus* CICIM B7003 的多糖含量

Figure 3. Cellular polysaccharides change of *A. pasteurianus* CICIM B7003 during vinegar fermentation.

2.3 醋酸胁迫下细胞膜脂肪酸组分的变化

除了调节荚膜多糖的合成,一些极端微生物通过改变细胞膜不饱和脂肪酸的比例增加膜的流动性来抵抗不利的生存环境。利用 GC-MS 技术对对不同发酵阶段(4、20 和 28 h)的细胞膜脂肪酸种类及含量进行分析。由图 4 可知该菌膜脂肪酸主要成分是棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、十八碳烯酸(C18:1w8c)、油酸(C18:1w9c)和二十碳烯酸(C20:0)。十八碳烯酸和油酸百分含量合计后统一表示为(C18:1)。发酵初期(4 h),饱和脂肪酸占较大质量百分比:棕榈酸和硬脂酸分别占总脂肪酸含量的 27.82% 和 32.44%,十八碳烯酸和油酸总量仅占 21.57%。发酵到 20 h,棕榈酸和硬脂酸含量降到 18.02% 和 19.52%,十八碳烯酸和油酸总量上升到 47.6%。发酵 28 h 时,膜不饱和脂肪酸占脂肪酸总量的 47.91%,与对数期相差不大。随醋酸积累,膜不饱和脂肪酸比例上升,有利于增加膜的流动性,适应不利的环境。

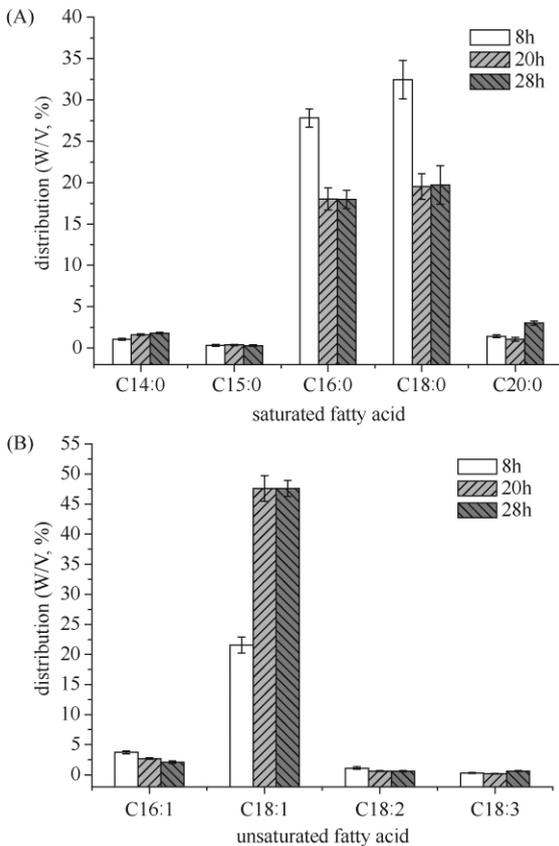


图 4. 细胞膜脂肪酸含量

Figure 4. Membrane fatty acids change of *A. pasteurianus* CICIM B7003 during vinegar fermentation. A: saturated fatty acid content; B: unsaturated fatty acid content.

2.4 发酵过程中乙醇呼吸链酶和 ATPase 活性的变化

醋酸菌直接利用乙醇呼吸链进行氧化乙醇产乙酸,且该代谢与醋酸菌耐酸有关。因此实验对发酵中该呼吸链酶的活性变化进行分析。如图 5 所示,发酵 4 h 时 ADH、ALDH 和 Cyto 的比酶活分别为 1.93、1.71 和 1.62 U/mg,醋酸生成速率仅为 0.49 g/(L·h)。进入指数期后,呼吸链活性明显提高,发酵 20 h 时 ADH、ALDH 和 Cyto 活性分别提高到 5.72、4.51 和 3.95 U/mg,醋化强度增加到 1.12 g/(L·h)。发酵后期,发酵液中乙醇含量减少导致呼吸酶活性有所降低,发酵 28 h 时,虽然 ADH、ALDH 和 Cyto 活性分别降低到 4.45、3.41 和 3.67 U/mg,但是醋酸生成速率仍维持在 1.01 g/L/(L·h)。随发酵进行,菌 CICIM B7003 乙醇呼吸链酶的比活明显增加,从某种意义上显示了乙醇氧化代谢与醋酸菌耐酸性能之间存在正相关。

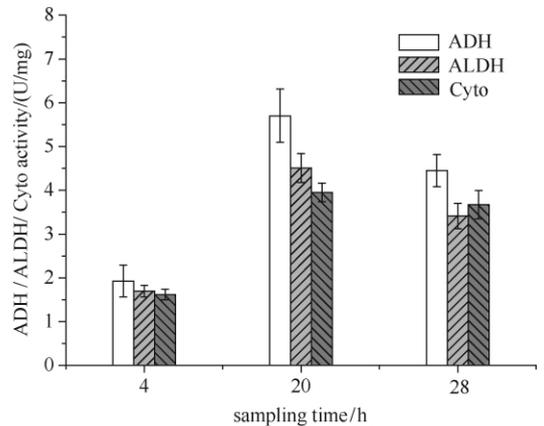


图 5. 乙醇呼吸链构成的酶活性变化

Figure 5. Activity change of enzymes in alcohol respiratory chain during vinegar fermentation.

已报道的醋酸菌耐酸机制大多需要消耗 ATP 来完成运行,推测发酵中 ATPase 活性会逐渐增加。实验得知,菌 CICIM B7003 的 ATPase 活确实随着发酵进程而升高(图 6)。发酵 4 h 时 ATP 酶活性仅为 1.31 $\mu\text{mol}(\text{Pi})/\text{g}(\text{biomass})/\text{min}$ 。进入对数期,酶活提高到 4.32 $\mu\text{mol}(\text{Pi})/\text{g}(\text{biomass})/\text{min}$ 。发酵后期,虽然乙醇呼吸链酶活略有下降,但 ATPase 却仍保持上升趋势,发酵 28 h 时,醋酸浓度达到 38.07 g/L,ATPase 的比活升到 4.78 $\mu\text{mol}(\text{Pi})/\text{g}(\text{biomass})/\text{min}$ 。说明醋酸菌为了能在较高酸度的环境中生存需要消耗大量的能量。

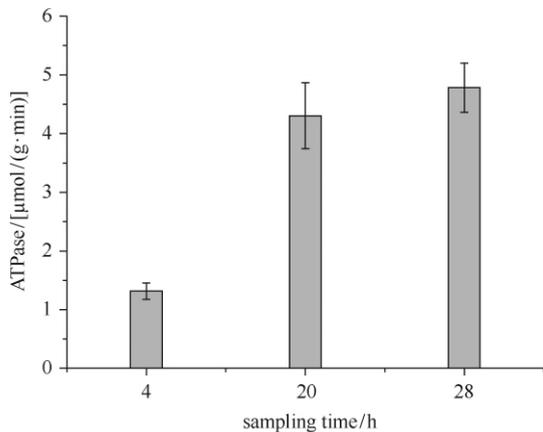


图 6. ATPase 酶活性变化

Figure 6. Activity of ATPase during vinegar fermentation.

2.5 醋酸积累对耐酸蛋白合成相关基因转录水平的影响

根据已经报道耐酸机制, 筛选出几个与巴氏醋杆菌耐受醋酸最相关的蛋白, 研究与它们合成相关的基因 (*grpE*、*dnaK*、*dnaJ*、*aatA*) 在醋酸积累过程中转录水平差异。GrpE、DnaK、DnaJ 组成一种分子伴侣/伴侣蛋白的抗逆体系, 严峻环境下保证代谢酶正确折叠及对错误折叠酶的纠错。*aatA* 编码一种 ABC 转运家族蛋白, 这种蛋白通过结合 ATP 完成对细胞内的醋酸根离子泵出, 减少醋酸对细胞的代谢的损害。利用荧光定量 PCR 技术对筛选基因进行相对转录水平分析发现这几种耐酸基因在随着醋酸积累量上升, 与发酵起始阶段相比, 转录水平都有所提高, 其中发酵 20 h 的 *grpE* 转录水平是发酵初期的 3.53 倍。*dnaK*、*dnaJ*、*aatA* 等基因的转录水平也分别为最初的 2.13、1.21 和 2.27 倍 (图 7)。

grpE 与 *dnaK* 和 *dnaJ* 串联于一个 *grpE-dnaK-dnaJ* 基因簇上^[21]。GrpE 被认为控制该抗逆体系的关键伴侣蛋白, 结果显示该蛋白合成相关基因的转录水平在发酵过程中提升最明显, 进一步说明其在 GrpE/DnaK/DnaJ 抗逆体系中的重要作用。Nakano 等^[10] 报道醋酸可诱导醋酸菌 AatA 表达量的提升, 实验结果显示 *aatA* 的转录水平在发酵过程中也显著提升, 表明该蛋白与醋酸发酵也密切相关。综上所述可知菌 CICIM B7003-02 中也存在上述蛋白所对应的耐酸机制。

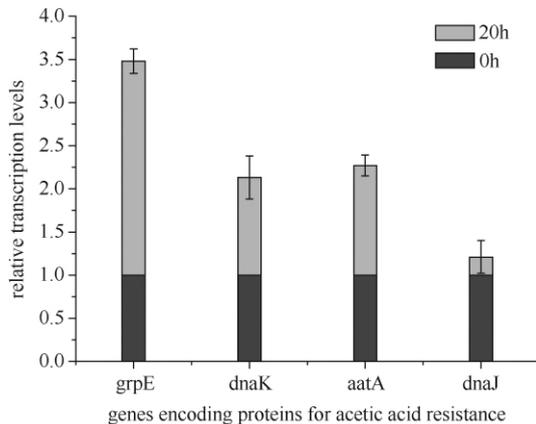


图 7. 耐酸蛋白合成相关基因的转录水平

Figure 7. Relative transcription level of acetic acid resistance genes during vinegar fermentation.

3 讨论

A. pasteurianus CICIM B7003 中的 *grpE* 和 *dnaK* 转录水平随发酵进行明显提升, *dnaJ* 的转录水平也略有提高, 说明此抗逆体系在该菌中也发挥作用。Andrés-Barrao 等^[20] 也发现巴氏醋杆菌细胞中的 GrpE 和 DnaK 蛋白表达量在发酵中后期比初期显著提高, 并推测 *grpE-dnaK-dnaJ* 抗逆体系在巴氏醋杆菌中的普遍存在性。GrpE/DnaK/DnaJ 的运行机制已经得到很好地证实^[22-23]。结合本研究结果和已报道的该体系的运行机制绘制出 GrpE/DnaK/DnaJ 抗逆机制模型, 详见图 8 的区域 (1)。菌株 CICIM B7003 利用该机制可保证蛋白在酸性环境下的正确折叠。

发酵过程中菌株 CICIM B7003 的 *aatA* 转录水平也明显提升, 说明该菌株也具有依赖 AatA 蛋白的醋酸泵出体系。AatA 蛋白位于细胞膜上, 通过消耗 ATP 将渗入胞内的醋酸等有机酸泵出, 以此维持胞内 pH 的相对稳定^[24]。菌株 CICIM B7003 中依赖 AatA 蛋白的醋酸泵出体系模型可表示为图 8 中的区域 (2) 部分。

随发酵进行, 菌株 CICIM B7003 的乙醇呼吸链酶系活性升高, 在发酵后期仍保持较高的活性。目前对于乙醇氧化体系在耐酸中的作用机制还未见报道。但有研究发现产高酸菌的 ADH 对于高浓度的醋酸具有更好的耐受能力^[14]。乙醇呼吸链运行过程中推动膜内外质子梯度的形成, 利于 ATP 生成,

由此推测乙醇氧化代谢与耐酸机制的能量供应有关。研究还得知发酵中菌株 CICIM B7003 的 ATPase 活性不断提升,即使在发酵后期仍处于高的酶活水平。细胞的能量水平可能决定了巴氏醋杆菌耐酸能力的高低。据此勾勒出菌 CICIM B7003 基于乙醇呼吸链供能的耐酸机制,如图 8 中的区域(3)所示。

此外,细胞减少荚膜分泌有利于加快周质中的醋酸排放到外界环境中,减少对细胞的毒害。膜不饱和和脂肪酸含量增加能增强膜流动性,可能有利于辅酶 Q 在磷脂双分子层中的穿梭,促进膜两侧质子动势的形成,进而有助于 ATP 生成。

通用抗逆机制和醋酸泵出机制都需要消耗 ATP 来实现其功能,ATP 很可能是多种耐酸机制协作的纽带。由此推测出 *A. pasteurianus* CICIM B7003 中可能存在的耐酸协作机制(图 8):(1)通用抗性机制保证胞内蛋白正确折叠和修正错误装配,使胞内的酶和蛋白发挥其正常功能;(2)正确折叠的 AatA 蛋白排出渗入胞内的醋酸,提供给分子伴侣/伴侣蛋白及其它酶相对稳定的细胞内环境;(3)乙醇呼吸链供能机制实现 ATP 的快速生成,供给通用抗性机制和醋酸泵出机制等耐酸机制需要的 ATP。综上分析,醋酸菌的各种耐酸机制应该是一个相互协作的有机整体,以实现对抗酸环境的抗性。

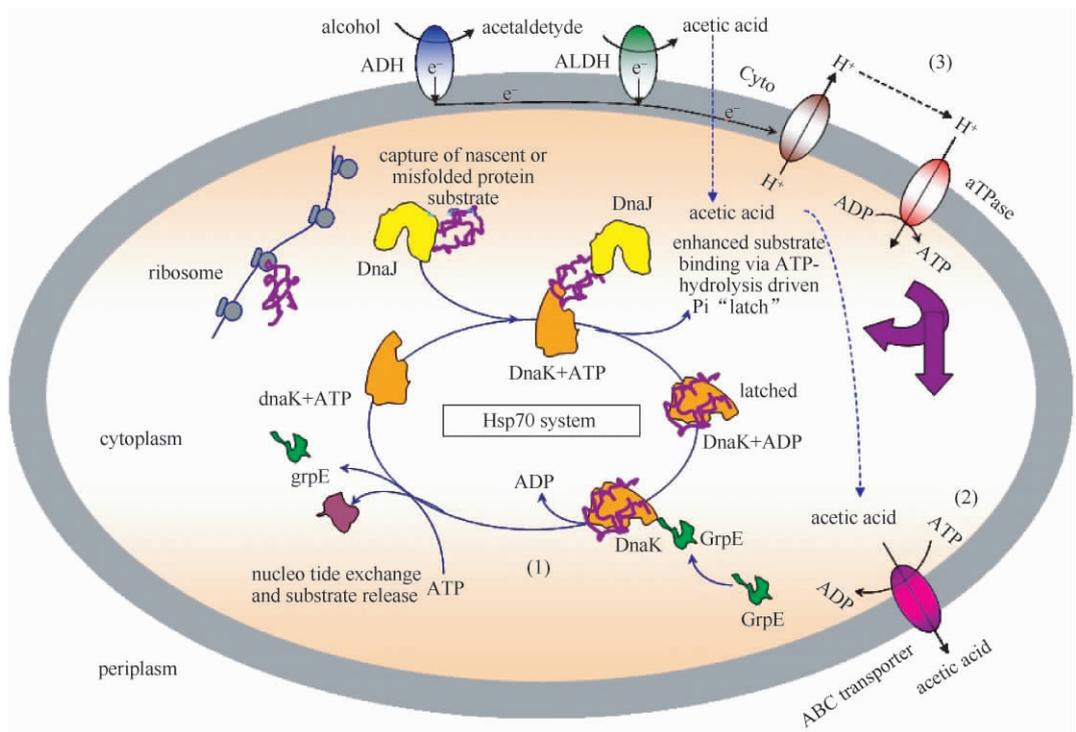


图 8. *A. pasteurianus* CICIM B7003 对醋酸积累过程可能存在的协作机制模型

Figure 8. Schematic representation of response machineries that confer acetic acid resistance during vinegar fermentation.

4 结论

醋酸的存在使 *A. pasteurianus* CICIM B7003 减少了荚膜多糖的分泌,发酵后期细胞多糖含量仅占细胞干重的 0.89%。同时,提高了膜不饱和和脂肪酸的质量百分比,由发酵初期的 21.57% 上升到 47.91%,有利于增加细胞膜的流动性,适应酸性环

境。随着醋酸积累,通用抗逆蛋白基因 (*grpE*、*dnaK*) 和醋酸泵出蛋白基因 (*aatA*) 的相对转录水平都有明显升高,乙醇呼吸链代谢也越来越活跃。据此推测出菌 CICIM B7003 主要依靠改变细胞外周组分、激活耐酸蛋白合成、增强乙醇呼吸链活力快速产能等机制的协同作用,实现对酸胁迫的耐受。今后研究工作将对耐酸协作模型及产能代谢做深入的研究。

参考文献

- [1] De Ley J, Swings J, Gossele F. Key to the genera of the family *Acetobacteraceae*//Krieg NR, Holt JG (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1984: 268-278.
- [2] Bartowsky EJ, Henschke PA. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125: 60-70.
- [3] Swings J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*// Balows A, Truper H, Dworkin G, Harder M, Schleifer W (Eds.). *The Prokaryotes*, vol 3. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1992, 2268-2286.
- [4] Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the genetic level. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1997, 61:1244-1251.
- [5] Kondo K, Beppu T, Horinouchi S. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177: 5048-5055.
- [6] Thurner C, Vela C, Thony-Meyer L, Meile L, Teuber M. Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Archives of Microbiology*, 1997, 168: 81-91.
- [7] Yakushi T, Matsushita K. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86: 1257-1265.
- [8] Okumura H, Uozumi T, Beppu T. Biochemical characteristics of spontaneous mutants of *Acetobacter aceti* deficient in ethanol oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, 49: 2485-2487.
- [9] Chinnawirotpisan P, Theeragool G, Limtong S, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96: 564-571.
- [10] Nakano S, Fukaya M. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125 (1): 54-59.
- [11] Matsushita K, Inoue T, Adachi O, Toyama H. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 4346-4352.
- [12] Okamoto-Kainuma A, Yan W, Kadono S, Tayama K, Koizumi Y, Yanagida F. Cloning and characterization of *groESL* operon in *Acetobacter aceti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94: 140-147.
- [13] Hanada T, Kashima Y, Kosugi A, Koizumi Y, Yanagida F, Uda S. A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter aceti* and some properties of its disruptant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65: 2741-2748.
- [14] Trecek J, Toyama H, Czuba J, Misiewicz A, Matsushita K. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70: 366-373.
- [15] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [16] Miller L, Berger T. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Hewlett-Packard Application Note*, 1985, 228: 241.
- [17] Wood WA, Fetting RA, Hertlein BC. Gluconic dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Methods Enzymol*, 1962, 5: 287-291.
- [18] Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 93(1): 109-113.
- [19] Jiménez-Hornero J E, Santos-Dueñas I M, García-García I. Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part I: The proposed model. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 45(1): 1-6.
- [20] Andrés-Barrao C, Saad MM, Chappuis ML, Boffa M, Perret X, Pérez RO, Barja F. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(6): 1701-1717.
- [21] Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 2006, 125(3): 443-451.
- [22] Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*,

2005, 12 (10) : 842-846.

- [23] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, 295 (5561) : 1852-1858.

- [24] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72: 497-505.

Physiological response to acetic acid stress of *Acetobacter pasteurianus* during vinegar fermentation

Zhengliang Qi¹, Hailin Yang¹, Xiaole Xia¹, Wu Wang¹, Yunwei Leng², Xiaobin Yu¹, Wu Quan³

¹The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

²China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, Jiangsu Province, China

³Xuzhou Hengshun Wantong Food Brewing Company, Xuzhou 221003, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim of the study is to propose a dynamic acetic acid resistance mechanism through analysis on response of cellular morphology, physiology and metabolism of *A. pasteurianus* CICIM B7003 during vinegar fermentation.

[Methods] Vinegar fermentation was carried out in a Frings 9 L acetator by strain B7003 and cultures were sampled at different cellular growth phases. Simultaneously, percentage of capsular polysaccharide versus dry cells weight, ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids, transcription of acetic acid resistance genes, activity of alcohol respiratory chain enzymes and ATPase were detected for these samples to assay the responses of bacterial morphology, physiology and metabolism.

[Results] When acetic acid was existed, no obvious capsular polysaccharide was secreted by cells. As vinegar fermentation proceeding, percentage of capsular polysaccharide versus dry cells weight was reduced from 2.5% to 0.89%. Ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids was increased obviously which can improve membrane fluidity. Also transcription level of acetic acid resistance genes was promoted. Interestingly, activity of alcohol respiratory chain and ATPase was not inhibited but promoted obviously with acetic acid accumulation which could provide enough energy for acetic acid resistance mechanism. [Conclusion] On the basis of the results obtained from the experiment, *A. pasteurianus* CICIM B7003 relies mainly on the cooperation of changes of extracellular capsular polysaccharide and membrane fatty acids, activation of acid resistance genes transcription, enhancement of activity of alcohol respiratory chain and rapid energy production to tolerate acidic environment.

Keywords: *Acetobacter pasteurianus*, acetic acid fermentation, acetic acid stress, physiological response to acetic acid stress

(本文责编:张晓丽)

Supported by National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z314), by the Students Program of Jiangnan University (JUDCF11009), by the Scientific Program of Jiangnan University (JUSRP111A25) and by the National Natural Science Foundation of China (31301540)

Corresponding author. Tel: +86-510-85918167; E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

Received: 11 June 2013/Revised:16 October 2013