

研究报告

醋酸胁迫对 *Acetobacter pasteurianus* 产酸呼吸链活力的影响

朱传柳 夏小乐 史伟 王武*

(教育部工业微生物技术重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】以巴氏醋酸杆菌工业菌株沪酿 1.01 和模式菌株 *Acetobacter pasteurianus* ATCC 33445 为研究对象, 研究工业菌株与模式菌株在高浓度醋酸胁迫下的产酸发酵时呼吸链酶活、相关基因转录水平的变化规律。【方法】检测两种菌株在 0、1%、2%、3% 不同初始醋酸浓度下的生物量、产酸以及酶活, 并通过实时荧光定量 PCR 检测呼吸链相关酶合成基因的相对转录水平变化。【结果】两种菌株在 1% 初始醋酸浓度下产酸能力最强, 发酵 48 h 平均产酸速度达到 0.667 g/(L·h); 两种菌株的 ADH (乙醇脱氢酶) 和 ALDH (乙醛脱氢酶) 酶活也达到最高, 平均为 12.01 和 9.77 U/mg; 相关酶合成基因的相对转录水平较无底酸均提高。当初始醋酸浓度上升至 2% 和 3% 时, 菌体酶活、产酸能力逐渐下降, 呼吸链上的 *adh*、*cyt bd*、*cyt o* 和 *fapA* 基因转录水平上升, 其余基因都降低。【结论】确定了巴氏醋酸杆菌在高初始浓度醋酸条件下, 菌体会自发提高 *adh* 基因的转录水平, 启动底物磷酸化, 并将醋酸泵出到胞外; 同时 *aldh* 基因的表达受到抑制, 降低产酸, 从而维持体内较低醋酸浓度。此外, 呼吸链上其他外排相关酶转录水平也会提升, 如 *cyt bd* 和 *cyt o*, 辅助底物磷酸化进程, 加快释放能量。

关键词: 巴氏醋酸杆菌, 呼吸链, 代谢变化, 初始醋酸浓度, 实时荧光定量 PCR

Effects of acetic acid stress on the activity of acetic acid respiratory chains in *Acetobacter pasteurianus*

ZHU Chuan-Liu XIA Xiao-Le SHI Wei WANG Wu*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To analyze the regularity of the activity of respiratory chains and the transcriptional levels of related genes in *Acetobacter pasteurianus* under the stress of high acetic acid concentration, *A. pasteurianus* CICC 20001 and *A. pasteurianus* ATCC 33445 were studied. [Methods] The biomass, acid production and enzyme activity of the two strains have been analyzed in different initial acetic acid concentrations of 0, 1%, 2% and 3%. Real-time quantitative PCR was used to analyzed changes of relative transcriptional levels of respiratory chains related enzyme synthesis genes in different concentrations. [Results] It was found that acid production capacity of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31301540)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85913671; E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

Received: November 24, 2016; Accepted: March 21, 2017; Published online (www.cnki.net): April 05, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31301540)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85913671; E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-24; 接受日期: 2017-03-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-05

two strains was the strongest when initial acetic acid concentration was 1%; and their average acid production rate reached 0.667 g/(L·h) during 48 hours fermentation. At the same time, enzyme activity levels of ADH (alcohol dehydrogenase) and ALDH (acetaldehyde dehydrogenase) also rise to the highest of 12.01 and 9.77 U/mg on average. And the relative transcriptional level of the respiratory chain related enzyme synthesis genes were also increased compared with initial acid of 0. The enzyme activity and acid production capacity decreased gradually when initial acetic acid concentration increased to 2% and 3%. The *adh*, *cyt bd*, *cyt o* and *fapA* gene on respiratory chain maintained a relatively high transcriptional level while the transcriptional level of rest genes decreased. **[Conclusion]** It is identified that under high-intensity acetic acid conditions, the transcriptional level of *adh* gene is increased spontaneously, which activates the substrate phosphorylation and pump acetic acid out. At the same time, the *aldh* gene's expression is inhibited, which causing the reducing of acid production and maintaining rather low concentration of acetic acid. In addition, the level of other efflux enzymes in the respiratory chain will also increase, such as *cyt bd* and *cyt o*, which enhance the substrate phosphorylation in metabolic process and accelerate the release of energy.

Keywords: *Acetobacter pasteurianus*, Respiratory chains, Metabolic changes, Initial acetic acid concentration, Real-time quantitative PCR

目前,世界各国应用于工业生产的醋酸菌主要有醋酸杆菌、葡糖杆菌和葡糖酸醋酸杆菌 3 个属,而我国主要用于食醋生产的醋酸菌是中科 1.41 和沪酿 1.01,均为醋酸杆菌属中的巴氏醋酸杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*, *A. pasteurianus*)^[1-2]。

醋酸菌能够在膜结合的乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH)和泛醌氧化酶的复合体共同作用下将乙醇不完全氧化成醋酸,同时乙醇氧化失去的电子和 H⁺也在该呼吸链上传递,最终与氧结合生成水并释放能量^[3-5]。一般而言,醋酸对微生物具有毒性的主要原因是其作为亲脂性的物质能够跨越细胞膜进入细胞,增加胞内醋酸的浓度,破坏细胞膜的一些生理功能^[6]。但是,醋酸菌具有特殊的耐酸机制能够耐受较高浓度的醋酸,尤其是醋酸杆菌和葡糖杆菌属菌株,其在 3%甚至更高醋酸浓度的条件下仍能够正常生长。大量研究证实,乙醇呼吸链的氧化机制就是醋酸菌中的一个重要耐酸机制。Takemura 等^[7]通过自然诱变筛选得到一株 ADH 活性缺失的巴氏醋酸杆菌,该菌株在含有乙醇的培养基中生长缓慢且不产醋酸,而且在含有醋酸的培养基中不能生长,从而阐述了 ADH 对醋酸菌的产酸和耐酸具有至关重要的作用。Beppu^[8]将 ADH、ALDH 基因导入原始菌中过量表达,产酸量达到

98.6 g/L,比原始菌株的产酸量提高了 40%,也提高了菌体的耐酸能力,证明了 ADH 和 ALDH 与醋酸菌的产酸和耐酸有着密切的联系。元正良等^[9]研究表明巴氏醋酸杆菌的 TCA 循环途径不完整,无法循环运转,不能在高醋酸环境下依靠 TCA 循环途径提供能量,并阐述菌株的主要供能代谢途径为乙醇呼吸链代谢途径。Matsushita 等^[10]也提出醋酸菌对醋酸的抗性机理是受能量控制的,呼吸链产生的能量可以抵抗醋酸环境。上述研究结果一方面可能是由于质子泵与产酸直接相关^[11],另一方面可能是能量积累有助于需能的外排机制(如 ABC 转运子)产生效应^[12]。

高浓度醋酸发酵下的产酸代谢规律以及呼吸链上调控菌体耐酸的关键基因目前尚未被系统报道,因此阐明乙醇呼吸链代谢规律对于醋酸菌的高产酸和耐酸具有重要意义。本文以沪酿 1.01 工业菌株(*A. pasteurianus* CICC 20001)和巴氏醋酸杆菌的模式菌 *A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株为研究对象进行摇床发酵实验。首先构建巴氏醋酸杆菌乙醇呼吸链代谢途径模型,进一步通过探究它们在 0、1%、2%、3%不同的初始醋酸浓度条件下的产酸强度、酶活以及乙醇呼吸链相关酶的基因相对转录水平变化,从中找出乙醇呼吸链的产酸代谢规律和调

控巴氏醋酸杆菌呼吸链上耐酸的关键基因, 为提高醋酸杆菌的耐酸性提供良好的理论依据和现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 葡萄糖、酵母粉、无水乙醇、冰醋酸等试剂购于国药集团; PCR 扩增引物、RNase-free ddH₂O、Trizol 提取试剂盒等荧光定量 PCR 相关试剂购于生工生物工程(上海)股份有限公司。其他试剂的配置:(1) 50 mmol/L KPB 缓冲液(pH 5.8): 称取 22.8 g 三水合磷酸氢二钾溶于 100 mL 水中, 配制 1 mol/L 磷酸氢二钾溶液; 再称取 13.6 g 磷酸二氢钾溶于 100 mL 水中, 配制 1 mol/L 磷酸二氢钾溶液。取 1 mol/L 磷酸氢二钾溶液 5 mL, 1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 45 mL, 混合并用蒸馏水定容至 1 000 mL; (2) McIlvaine 缓冲液(pH 4.0): 称取十二水合磷酸氢二钠 2.76 g、柠檬酸 1.29 g、乙二胺四乙酸二钠盐 3.72 g, 混合并用蒸馏水定容至 100 mL; (3) 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液: 称取 3.29 g 铁氰化钾, 用蒸馏水定容至 100 mL, 并放置在 4 °C 保存; (4)

硫酸铁-Dupanol 溶液的配制: 称取 5 g Fe₂(SO₄)₃·nH₂O 和 3 g Dupanol (月桂基硫酸钠), 量取 95 mL 85% 磷酸, 混合并用蒸馏水定容至 1 000 mL。

超速离心机, 日本日立公司; 可见分光光度计, 上海普美达公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物公司; Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

1.1.2 菌种: (1) 巴氏醋酸杆菌沪酿 1.01 菌株, 菌种号为 CICC 20001, 购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心; (2) 巴氏醋酸杆菌模式菌株, 菌种号为 ATCC 33445, 购买于美国 ATCC。

1.1.3 培养基: (1) 固体培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 10, 琼脂粉 20, 碳酸钙 20, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 冷却至 60 °C 左右, 加无水乙醇至 30 g/L, 摇匀后分装斜面或倒平板。(2) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10、酵母粉 10, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 接种前加无水乙醇至 30 g/L。

1.1.4 荧光定量 PCR 引物: 引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 实验所用引物如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Oligo-nucleotides for qRT-PCR

基因 Genes	引物名称 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')
16S rRNA	16S-F 16S-R	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG
<i>adh</i>	<i>adh</i> -F <i>adh</i> -R	TATGACGCCACGAACGGTAG AGCCCACTTCAACAGCAACAT
<i>aldh</i>	<i>aldh</i> -F <i>aldh</i> -R	AGTGGATGCTCGGAAGAATGA CTGTGTGCTGAATGACGTCGT
<i>ucb</i>	<i>ucb</i> -F <i>ucb</i> -R	AATCTGAATGGCTGGTGAAT CTGGCGTTCTATGGCTTCAA
<i>nadh</i>	<i>Nadh</i> -F <i>Nadh</i> -R	ATGGATGGCACCAAGTTTGT CCGTAGACTGGCGAGAAATAA
<i>cyt bd</i>	<i>Cyt bd</i> -F <i>Cyt bd</i> -R	TTGTTTCAGGGCGTAAAAGTTG CTCCCAACAAAGCATAACCAC
<i>cyt o</i>	<i>Cyt o</i> -F <i>Cyt o</i> -R	GGGTCTGGCTTGTGGTATCTT GTGCCATCAGTTTACGGGTGT
<i>cyt c</i>	<i>Cyt c</i> -F <i>Cyt c</i> -R	GTATCCCTTGAATCCTGAACA TCCGCAACTTATGGCGTATC
<i>cyt d1</i>	<i>Cyt d1</i> -F <i>Cyt d1</i> -R	AGGACCTTCAGGAAAGTGGC CTTGGTTGTGCGATGGTTTAC
<i>cyt d2</i>	<i>Cyt d2</i> -F <i>Cyt d2</i> -R	CATTCTGCTATCTGCCTTGGA ACGGTACATCGTTCTCGGTTT
<i>fapA</i>	<i>fapA</i> -F <i>fapA</i> -R	ATCTTCTTGAAACCGACCTG GGCTCTGTTTACGCAACTCAA
<i>fapB</i>	<i>fapB</i> -F <i>fapB</i> -R	GTTCTACCGAAGGCTCTAAAGTG CCTGCGTAAAGCGGAAAA

1.2 培养方法

1.2.1 菌种活化: 用无菌吸管吸取 1 mL 保藏菌液接种于 50 mL 种子培养基(无乙醇)中, 在 30 °C、170 r/min 振荡培养 24 h。取 3 mL 菌液于比色皿中, 在 600 nm 波长处测量其吸光值, 检测其 OD_{600} 值是否达到 0.8–1.0, 然后对菌体进行革兰氏染色并观察其形态, 判断菌体自身状况是否良好及检查是否染菌, 达到标准的可进行摇瓶发酵。

1.2.2 摇瓶发酵: 将制备好的种子按 10% (体积比) 接种量接入 500 mL 三角瓶, 内含 90 mL 新鲜发酵培养基, 初始醋酸浓度分别为 0、1%、2%、3%, 30 °C、170 r/min 恒温振荡培养。

1.2.3 平板培养: 将涂布菌液的平板放入 30 °C 的恒温培养箱中培养 60 h。

1.2.4 转接方法: 在无菌条件下将活化好的菌液转接到不含醋酸的种子培养基中, 30 °C、170 r/min 恒温振荡培养 24 h 后, 再转接到含 1% 初始醋酸浓度的培养基中, 并放入摇床继续振荡培养 24 h 后, 再将 1% 培养的菌液转接到含 2% 和 3% 的初始醋酸浓度中培养。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度: 采用稀释涂布平板法, 分别测定菌体悬浮液的吸光度 OD_{600} 和菌液浓度(CFU/mL), 每组做 3 个平行实验, 取平均值, 最后以吸光度 OD_{600} 为横坐标, 菌体浓度(CFU/mL)为纵坐标, 建立 OD_{600} 与菌体量的标准曲线(图 1)。

1.3.2 菌体产酸测定: 取 1 mL 发酵液于 150 mL 三角瓶, 稀释 50 倍, 滴加 2–3 滴 1% 酚酞, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定至微红, 30 s 内不褪色为滴定终点, 根据氢氧化钠标准溶液消耗体积 V (mL) 计算醋酸浓度:

$$\text{醋酸浓度(g/L)} = C_{\text{NaOH}} \times V \times 60$$

式中 C_{NaOH} 表示 NaOH 标准溶液的浓度(mol/L), V 代表滴定消耗 NaOH 标准溶液的体积(mL)。

1.3.3 蛋白浓度测定: 参照 Bradford 法测定, 用牛血清白蛋白作为标准蛋白。首先配置 1 g/L 的牛血清白蛋白标准溶液, 再用去离子水稀释至不同浓度, 然

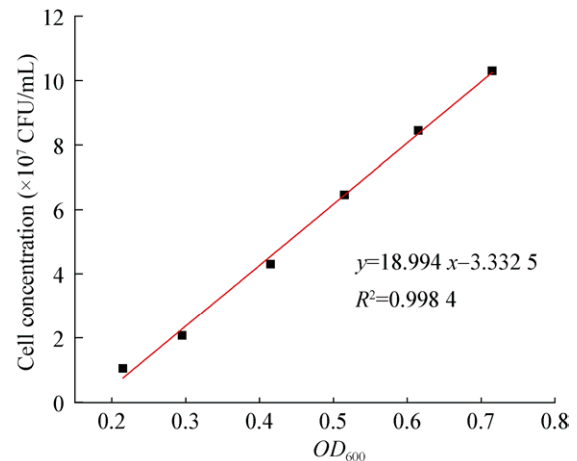


图 1 醋酸杆菌菌体浓度与吸光度 OD_{600} 的线性关系
Figure 1 Relationship between cell concentrations and the OD_{600} value

后向每支试管中加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂(每加一管, 立即在旋涡混合器上混合)。反应 5 min 后, 用分光光度计检测其在 595 nm 处的吸光值 OD_{595} 。绘制 OD_{595} 与蛋白浓度的标准曲线, 见图 2。

1.3.4 乙醇(乙醛)脱氢酶活力测定: (1) 粗酶液的获取: 取相应时间的适量菌液于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 去上清, 用 50 mmol/L (pH 5.8) 的磷酸盐缓冲液(KPB)洗涤 2 次, 然后重新悬浮于该缓冲液中(0.1 g 湿菌体/3 mL KPB), 在冰浴下进行超声破碎, 240 W, 2 s/2 s, 总时间 10 min。破碎液作为粗酶液待用。

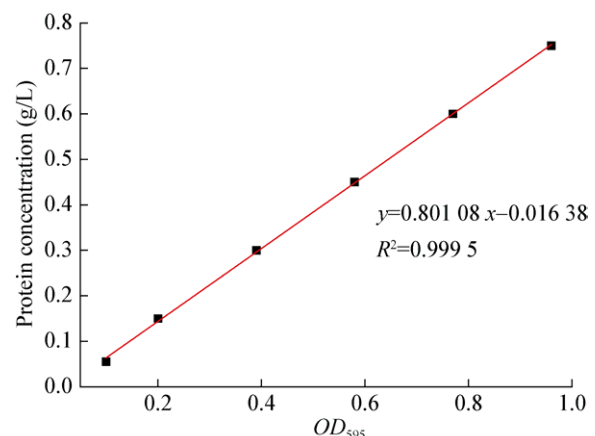


图 2 Bradford 法蛋白质浓度测定标准曲线
Figure 2 Calibration curve of protein concentrations with Bradford method

(2) 酶活测定: 参照 Wood 氏法^[13], 取 0.5 mL Mcllvaine 缓冲液(pH 4.0)、1.0 mol/L 乙醇(乙醛)溶液 0.1 mL、细胞膜 0.1 mL 和 10% Triton X-100 0.1 mL 于 10 mL 比色管中, 25 °C 保温 5 min 后加入 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液 0.2 mL, 在 25 °C 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 °C 放置 20 min, 加入 3.5 mL 蒸馏水混合后, 用紫外分光光度计测定 660 nm 吸光度。在 25 °C、pH 4.0 条件下, 1 min 氧化 1 μmol 乙醇的酶量为一个酶活力单位。

酶活性(U/mL)= $A_{660} \times 1/4 \times 1/5 \times 1/\text{酶液(mL)} \times \text{稀释倍数}$;

比酶活(U/mg)=酶活性(U/mL)/总蛋白(mg/mL)。

1.4 荧光定量 PCR

取不同初始醋酸浓度下培养的对数中后期菌液, 收集约 0.1 g 湿菌体, 立即用液氮速冻保存, 用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取细菌总 RNA, 如有 DNA 污染用 DNase I 去除, 按 AMV FirstStrand cDNA Synthesis Kit 说明书迅速反转录第一链 cDNA 后稀释备用, 反应体系为: 5 μL 总 RNA (0.2 g/L), 1 μL Random Primerp(dN)₆ (0.2 g/L) 和 5 μL RNase-free ddH₂O。以 16S rRNA 基因为管家基因, 将稀释后的 cDNA (50 mg/L) 上机检测。反应体系 (10 μL): 2×SYBR Green qPCR Master Mix 5 μL, 10 μmol/L Primer F 0.2 μL, 10 μmol/L Primer R 0.2 μL, ddH₂O 3.6 μL, 模板(cDNA) 1 μL。反应条件为: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。循环结束后利用熔解曲线检测产物特异性: 从 60 °C 缓慢升温至 97 °C, 每摄氏度采集 5 次荧光信号。

相对转录水平的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 实验组样品}} - \Delta C_{t \text{ 对照组样品}}$$

$$\text{相对转录水平} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

式中, $C_{t \text{ 目的基因}}$ 和 $C_{t \text{ 内参基因}}$ 分别表示目的基因和管家基因的 C_t 值。

1.5 数据处理

本研究中每个实验共设 3 个平行, 实验数据使

用 OriginPro8.5 和 Adobe Illustrator CS6 进行统计分析。所有图和表中的数据都是 3 个平行测量值的平均值, 误差线代表标准偏差, 显著性分析为 $P \leq 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 不同初始醋酸浓度对菌体生长的影响

醋酸作为亲酯性的物质能够跨越细胞膜进入细胞, 增加胞内醋酸的浓度, 破坏细胞膜的一些生理功能^[5], 从而制约醋酸菌的生长繁殖能力。不同初始醋酸浓度对两种菌株(*A. pasteurianus* ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001) 生长繁殖的影响结果如图 3 所示。在无底酸时, 两种菌株生长的菌体量最高, 分别约为 2.17×10^8 和 1.91×10^8 CFU/mL; 随着初始醋酸浓度的提高菌体量逐渐下降, 即菌体的生长繁殖能力受到抑制, 尤其在 3% 的醋酸浓度下两种菌体的菌体量最低, 分别约为 6.14×10^7 和 5.70×10^7 CFU/mL, 仅仅只有无底酸浓度下的 28.3% 和 29.8%, 而且菌体生长的延滞期也延长至 10 h。因此, 醋酸对菌体生长繁殖具有很强的抑制作用, 醋酸浓度越高, 抑制越明显。

2.2 初始醋酸对乙醇呼吸链产酸和酶活的影响

2.2.1 不同初始醋酸浓度下的产酸变化: 醋酸分子进入细胞内后会解离产生更多的醋酸根离子, 导致胞内 pH 值下降, 从而影响菌体产酸^[14]。不同浓度醋酸对两种菌株产酸的影响如图 4 所示, 与 Wang 等^[15]报道的结果类似, 当醋酸起始浓度为 1% 时, *A. pasteurianus* ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株的产酸能力都达到最佳, 最高分别可以产酸 33.6 和 30 g/L, 发酵 48 h 平均产酸速度达到 0.667 g/(L·h)。但随着醋酸浓度的继续提高, 当在 2% 和 3% 的初始醋酸浓度下时, 菌株的产酸能力就变得越来越弱, 尤其在 3% 醋酸浓度条件下, 它们各自只能产酸 19.8 和 18.6 g/L, 发酵 48 h 平均产酸速度只有 0.319 g/(L·h)。综合分析, 一定浓度的醋酸对菌株的产酸能力具有促进作用, 但醋酸浓度过高时, 它们的产酸能力就会受到抑制。

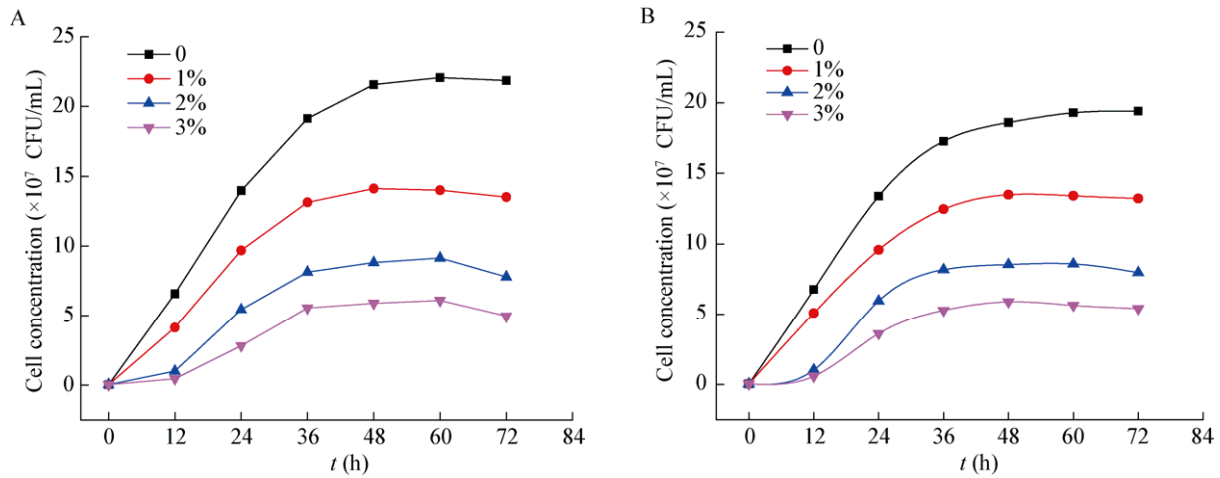


图3 *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A)和 *A. pasteurianus* CICC 20001 (B)在不同培养条件下的生长曲线
Figure 3 Growth curves of *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A) and *A. pasteurianus* CICC 20001 (B) under different culture conditions

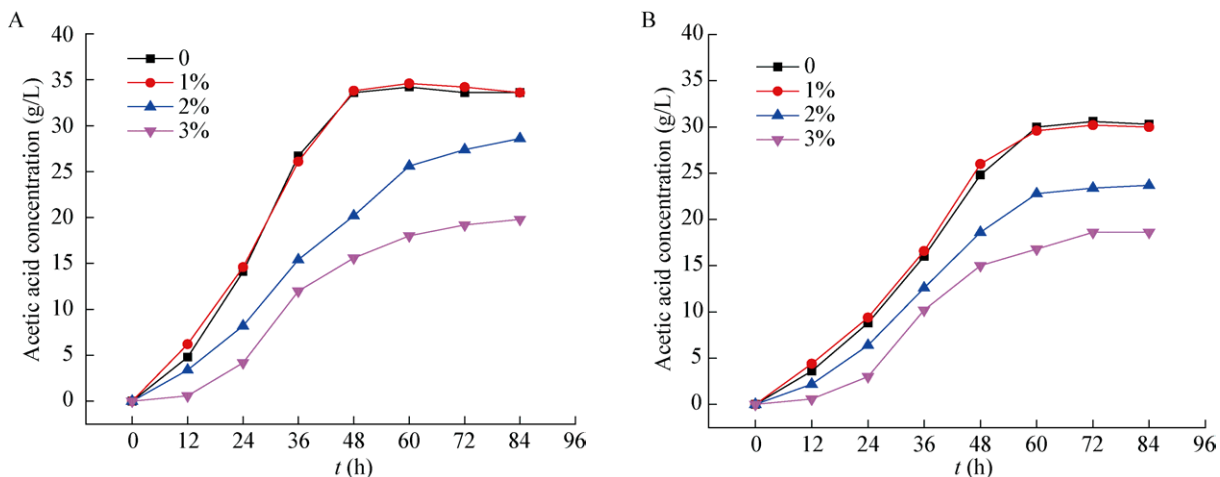


图4 *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A)和 *A. pasteurianus* CICC 20001 (B)在不同培养条件下的产酸曲线
Figure 4 Acid production curves of *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A) and *A. pasteurianus* CICC 20001 (B) under different culture conditions

2.2.2 醋酸发酵过程中乙醇呼吸链的酶活变化: 醋酸菌是在 ADH 帮助下将乙醇氧化成乙醛, 并在 ALDH 的帮助下继续将乙醛氧化成乙酸^[4]。图 5 显示了两种菌株在不同初始醋酸浓度下进入对数生长期后 12 h 的 ADH 和 ALDH 酶活变化。从图 5 中可以看出, 巴氏醋酸杆菌在 1% 的初始醋酸浓度下, ADH (ALDH) 的酶活最高, *A. pasteurianus* ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 两种菌株的酶活分别为 12.88 (11.03) 和 11.14 (8.51) U/mg, 两种菌

株的平均酶活达到 12.01 (9.77) U/mg。随着初始醋酸浓度的继续提高, 它们的酶活逐渐降低, 在 3% 的初始醋酸浓度下, ADH (ALDH) 的酶活只有 6.97 (4.39) 和 6.25 (3.82) U/mg, 它们的平均酶活为 6.61 (4.11) U/mg。这说明起初添加适量醋酸会增强 ADH 和 ALDH 基因的表达, 从而提高了它们的酶活; 但当醋酸浓度过高时, 菌体就会降低酶活, 减少产酸, 以降低醋酸对自身的伤害, 与菌株的产酸曲线相吻合。

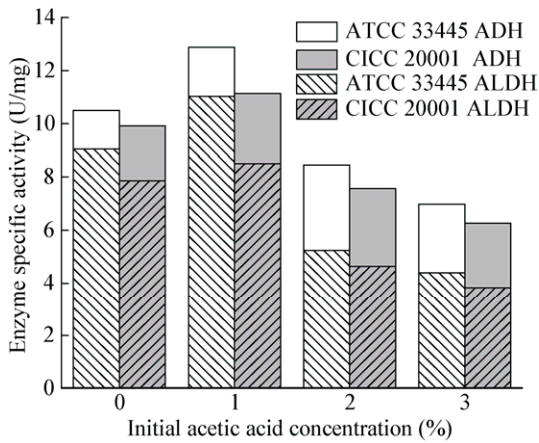


图 5 两种菌株在不同初始醋酸浓度条件下的 ADH 和 ALDH 的活性水平

Figure 5 Activity of ADH and ALDH in two strains under different initial acetic acid concentrations

2.3 不同初始醋酸浓度对乙醇呼吸链若干酶活与基因转录水平的影响

醋酸菌能通过一些耐酸机制来实现高浓度醋酸条件下的生长和代谢，而乙醇呼吸链不仅涉及菌

株的产酸，同时涉及耐酸。因此，首先确定乙醇呼吸链的代谢模型，并筛选乙醇呼吸链代谢途径相关酶的合成基因，探究它们在初始醋酸浓度分别为 0、1%、2%、3% 条件下各自相对转录水平的变化，从而找出调控醋酸菌耐酸的关键基因。

2.3.1 乙醇呼吸链代谢途径相关酶合成基因转录水平分析：参考模式菌株 *A. pasteurianus* ATCC 33445 代谢途径信息构建实验菌株呼吸链的主要代谢途径^[5,16]，勾勒巴氏醋酸杆菌乙醇呼吸链的模型，如图 6 所示。醋酸菌的产酸机制是醋酸菌能在以吡咯喹啉醌(PQQ)作为辅酶的乙醇脱氢酶(ADH)和乙醛脱氢酶(ALDH)以及泛醌氧化酶的复合体共同作用下，将乙醇不完全氧化成醋酸，而且乙醇氧化过程中失去的电子可以被膜上自由穿梭移动的辅酶 Q 吸收，得到电子的辅酶 Q 结合 H⁺由氧化态变成还原态，还原态辅酶 Q 被末端氧化酶(巴氏醋酸杆菌呼吸链上常见的末端氧化酶是细胞色素 o 和细胞色

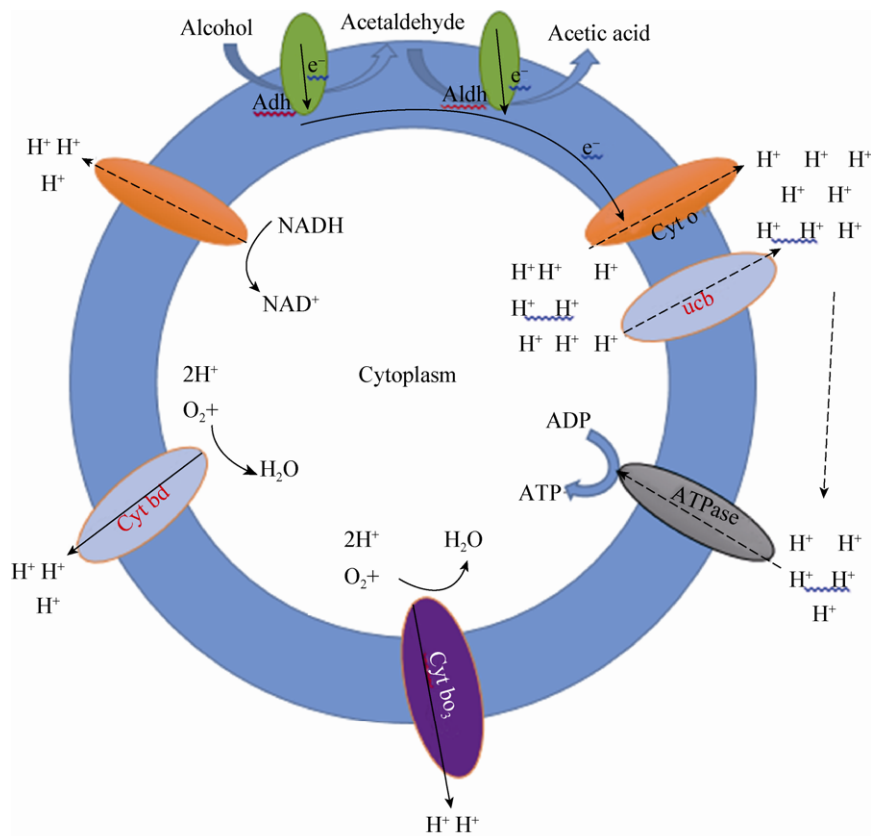


图 6 细胞膜呼吸链的模型

Figure 6 Model of cell membrane's respiratory chain

素 bd 末端氧化酶)氧化,最终电子被细胞质中的溶解氧获得生成 H_2O ,从而完成了整个乙醇呼吸^[17-18]。在整个呼吸过程中,胞内 H^+ 同时还被末端氧化酶泵到了膜外侧,从而形成质子梯度,推动三磷酸腺苷酶(ATPase)产生 ATP,为细胞提供正常代谢和抵抗醋酸所需要的能量。

根据呼吸链的代谢模型,筛选了乙醇呼吸链相关酶合成基因(表 2)做荧光定量分析,探究 *A. pasteurianus* ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株在初始醋酸浓度分别为 0、1%、2%、3% 条件下各自相对转录水平的变化。荧光定量 PCR 检测结果如图 7 所示,当初始醋酸浓度为 1% 时,*A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株体内与呼吸链相关的基因相对转录水平较无底酸条件下都提高了,该变化与菌株在 1% 条件下的产酸能力提高相一致,说明在该浓度下对菌株产酸有促进作用。当初始醋酸浓度为 2% 或 3% 时,*A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株的大部分呼吸链酶合成基因相对转录水平都开始下降,只剩 *cyt o*、*fapA*、*cyt bd*、*adh* 仍保持较高转录水平,最高的相对转录水平是无底酸条件下的 17.30、1.78、8.74 和 12.41 倍;*A. pasteurianus* CICC 20001 菌株中也只有 *cyt o*、*fapA*、*cyt bd* 和 *adh* 仍保持较高转录水平,

最高是无底酸条件下的 3.43、2.33、1.24 和 12.23 倍,其他基因的转录水平都降低。这表明在高初始醋酸浓度条件下,菌体会大幅度提高 *adh* 的转录水平,这一方面是为了提高巴氏醋酸杆菌的耐酸性^[7],另一方面是因为乙醇对菌体也有一定伤害,提高 *adh* 基因转录水平可以加速消耗乙醇,降低伤害。但菌体会降低 *aldh* 的转录水平,降低它的酶活,从而抑制菌体将乙醛转化成醋酸。同时,菌体还会提高乙醇呼吸链 *cyt o* 和 *cyt bd* 的转录水平,加速 H^+ 的外排,催化 ATPase 将 ADP 转化成 ATP,供菌体

表 2 巴氏醋酸杆菌呼吸链相关基因及其编码蛋白
Table 2 Respiratory chain related genes and their coding proteins of *A. pasteurianus*

基因	编码蛋白
Gene	Encoding protein
<i>adh</i>	PQQ-alcohol dehydrogenase
<i>aldh</i>	PQQ-aldehyde dehydrogenase
<i>cyt c</i>	cytochrome c oxidase
<i>cyt d1</i>	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I
<i>cyt d2</i>	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II
<i>nadh</i>	NADH dehydrogenase
<i>cytbd</i>	cytochrome b ubiquinol oxidase subunit II
<i>cyt o</i>	cytochrome o oxidase
<i>ucb</i>	Ubiquinol-cytochrome b reductase
<i>fapA</i>	F1F0 ATPase subunit a
<i>fapB</i>	F1F0 ATPase subunit b

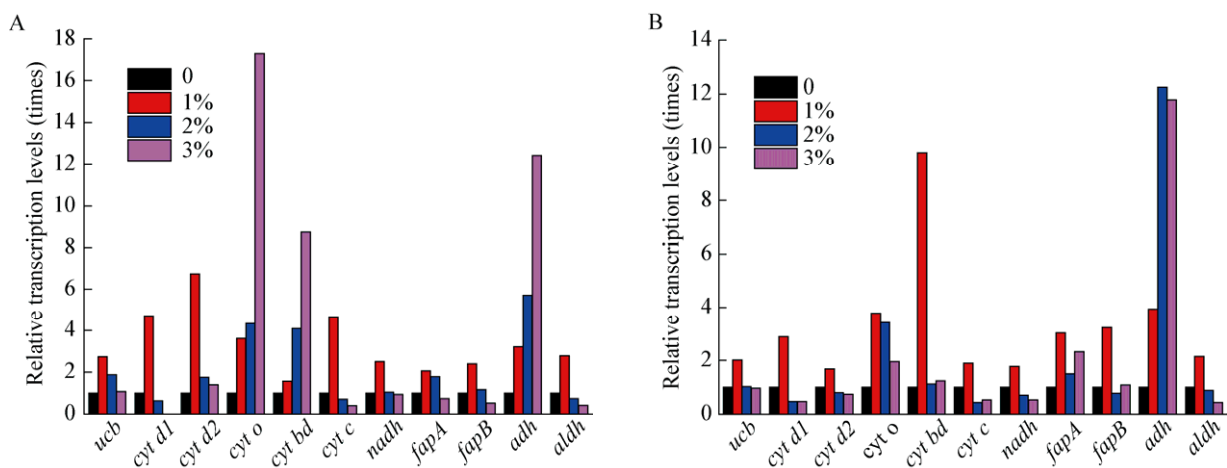


图 7 *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A)和 *A. pasteurianus* CICC 20001 (B)上与呼吸链相关的耐酸基因在不同培养条件下的相对转录水平

Figure 7 Relative transcription levels of relative levels of respiratory chain-related acid-resistant genes under different culture conditions in *A. pasteurianus* ATCC 33445 (A) and *A. pasteurianus* CICC 20001 (B)

使用。综上,在高浓度醋酸条件下,菌体首先会自发提高 *adh* 的转录水平,启动底物磷酸化,加快电子和质子传递,释放能量供机体使用,将醋酸泵出到胞外;同时让 *aldh* 基因的表达受到抑制,降低产酸,维持体内较低醋酸浓度,这可能是菌体在高醋酸浓度下的一种自适应机制。此外,呼吸链上其他外排相关酶转录水平也会提升,如 *cyt bd* 和 *cyt o*, 它们是底物磷酸化进程的一部分,会加速催化释放 ATP,以抵抗高醋酸的不利环境。

2.3.2 乙醇呼吸链上 *adh/aldh* 相对转录水平与酶活之间的关系: 由于首次发现了在高醋酸浓度下巴氏醋酸杆菌产酸路径会存在一个自适应机制。因此进一步分析了乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶在不同初始醋酸浓度下进入对数生长期后 12 h 的转录水平与酶活之间的关系。

A. pasteurianus ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株乙醇脱氢酶的转录水平与酶活之间的关系如表 3 所示。从表 3 中可以看出, *A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株和 *A. pasteurianus*

CICC 20001 菌株一开始会随着醋酸浓度的上升提高 *adh* 基因的转录水平,从而提高 ADH 酶活;但当醋酸浓度达到 2% 甚至更高时,虽然它的转录水平会随着醋酸浓度的继续增加而提高,但是 ADH 的酶活却会逐渐降低。ADH 出现负相关,表明在翻译层次,也出现了自适应机制,即转录水平虽然得到了提高,但是酶活并没有得到明显提高,而整体性随着酸度升高,其产酸通路逐渐减慢。

A. pasteurianus ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株乙醛脱氢酶的转录水平与酶活之间的关系如表 4 所示。从 *aldh* 基因的转录水平和酶活的变化中可以发现, *A. pasteurianus* ATCC 33445 和 *A. pasteurianus* CICC 20001 菌株一开始随着醋酸浓度的上升,也会提高 *aldh* 基因的转录水平,从而提高 ALDH 酶活;当醋酸浓度达到 2% 甚至更高时, *aldh* 基因的转录水平会随着醋酸浓度的继续增加而降低,ALDH 的酶活也会随着降低。这表明 *aldh* 基因的转录水平与酶活一直成正相关的关系,ALDH 才是乙醇氧化代谢途径的限速酶。

表 3 *adh* 基因的转录水平与酶活之间的关系

Table 3 The relationship between *adh* transcriptional level and enzyme activity

初始醋酸浓度 Initial acetic acid concentration (%)	菌株 Strain	转录水平 Transcriptional level (times)	酶活 Enzyme activity (U/mg)
0	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	1.00	6.750
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	1.00	6.450
1	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	3.21	8.445
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	3.94	8.280
2	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	5.70	8.120
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	8.78	6.675
3	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	12.41	6.045
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	12.23	5.070

表 4 *aldh* 基因的转录水平与酶活之间的关系

Table 4 The relationship between *aldh* transcriptional level and enzyme activity

初始醋酸浓度 Initial acetic acid concentration (%)	菌株 Strain	转录水平 Transcriptional level (times)	酶活 Enzyme activity (U/mg)
0	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	1.00	6.080
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	1.00	4.920
1	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	2.79	8.390
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	2.14	6.715
2	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	0.74	5.475
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	0.87	4.030
3	<i>A. pasteurianus</i> ATCC 33445	0.41	3.990
	<i>A. pasteurianus</i> CICC 20001	0.45	2.820

3 结论与讨论

醋酸对巴氏醋酸杆菌的生长繁殖和产酸的影响与 Wang 等^[15]的研究结果相吻合。大量研究结果证实,巴氏醋酸杆菌能够抵抗醋酸的伤害,主要是因为其体内具有一系列耐酸机制。但是高浓度醋酸发酵下的产酸代谢规律以及呼吸链上调控菌体耐酸的关键基因尚未见系统报道。

研究表明,巴氏醋酸杆菌在高浓度初始醋酸浓度培养时,菌体代谢系统发生自发调节,一方面提高 *adh* 基因的转录水平,启动底物磷酸化,从而释放能量供机体使用,将醋酸泵出到胞外;同时让 *aldh* 基因的表达受到抑制,降低产酸,维持体内较低醋酸浓度。*adh* 和 *aldh* 的这种变化可能是菌体在高酸浓度下的一种自适应机制。另一方面,呼吸链上 *cyt bd*、*cyt o* 和 *fapA* 相关酶转录水平也会提升,它们会辅助底物磷酸化进程,加速催化释放 ATP,以抵抗高醋酸的不利环境。但是由于不同醋酸菌的末端氧化酶有所不同,所以在不同生存条件下细胞会自行调节使用末端氧化酶参与呼吸代谢^[17,19],所以 *A. pasteurianus* CICC 20001 和 *A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株的 *cyt o* 和 *cyt bd* 基因转录水平变化存在一定的差异。

研究中还发现,虽然检测到 *adh* 基因在高浓度醋酸条件下有较高的转录水平,但是 ADH 在高浓度醋酸条件下酶活却很低,主要原因可能是:此时转录与转译并非一一对应的关系,转译过程需要一定的能量,在高浓度醋酸胁迫的情况下,菌体消耗能量既用于维持自身的生命活动,又要快速形成 ABC 转运系统^[12]和应激蛋白^[20-21](GroEL/S、DnaJ/K),以抵御醋酸对机体的伤害。Inoki 等^[22]和 Liu 等^[23]的研究也曾指出,能量供给不足将减弱有关酶类的转译水平。

综上所述,*A. pasteurianus* CICC 20001 和 *A. pasteurianus* ATCC 33445 菌株在测试过程中呼吸链应答情况相对平行,说明上述分析的规律应为客观存在。后续研究中,可进一步通过优化 *adh*、*aldh*、*cyt o*、*cyt bd*、*fapA* 表达的条件,促进 *Acetobacter pasteurianus* 呼吸链活力的增强,从而提高产醋酸和耐高酸的能力。

参考文献

- [1] Bartowsky EJ, Henschke PA. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(1): 60-70
- [2] Sengun IY, Karabiyikli S. Importance of acetic acid bacteria in food industry[J]. Food Control, 2011, 22(5): 647-656
- [3] Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(1): 46-53
- [4] Chinnawirotpisan P, Theeragool G, Limtong S, et al. Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(6): 564-571
- [5] Yakushi T, Matsushita K. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1257-1265
- [6] Zheng Y, Jiang CY, Chen XJ, et al. Effects of acetic acid on the growth and metabolic activity of *Acetobacter pasteurianus*[J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(9): 149-153 (in Chinese)
郑宇, 姜春悦, 陈兴京, 等. 醋酸对巴氏醋杆菌生长和代谢活性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 149-153
- [7] Takemura H, Horinouchi S, Beppu T. Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(22): 7070-7076
- [8] Beppu T. Genetic organization of *Acetobacter* for acetic acid fermentation[J]. Antonievan Leeuwenhoek, 1993, 64(2): 121-135
- [9] Qi ZL, Yang HL, Xia XL, et al. Analysis of energetic metabolism of *Acetobacter pasteurianus* during high acidic vinegar fermentation[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2171-2181 (in Chinese)
元正良, 杨海麟, 夏小乐, 等. 巴氏醋杆菌高酸度醋发酵过程的能量代谢分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2171-2181
- [10] Matsushita K, Toyama H, Adachi O. Respiratory chains in acetic acid bacteria: membrane-bound periplasmic sugar and alcohol respirations[A]//Zannoni D. Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems[M]. Netherlands: Springer, 2004, 36: 81-99
- [11] Matsushita K, Inoue T, Adachi O, et al. *Acetobacter acetii* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4346-4352
- [12] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter acetii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 497-505
- [13] Shinagawa E, Toyama H, Matsushita K, et al. A novel type of formaldehyde-oxidizing enzyme from the membrane of *Acetobacter* sp. SKU 14[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(4): 850-857
- [14] Nakano S, Fukaya M. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(1): 54-59
- [15] Wang B, Shao YC, Chen T, et al. Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics[J]. Scientific

- Reports, 2015, 5: 18330
- [16] Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, et al. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(17): 5768-5783
- [17] González B, Martínez S, Chávez JL, et al. Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2006, 1757(12): 1614-1622
- [18] Chávez-Pacheco JL, Contreras-Zentella M, Membrillo-Hernández J, et al. The quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter xylinus*: molecular and catalytic properties[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(9): 703-713
- [19] Matsushita K, Toyama H, Adachi O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria[J]. Advances in Microbial Physiology, 1994, 36: 247-301
- [20] Ishikawa M, Okamoto-Kainuma A, Matsui K, et al. Cloning and characterization of *clpB* in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 69-71
- [21] Okamoto-Kainuma A, Yan W, Fukaya M. Cloning and characterization of the *dnaKJ* operon in *Acetobacter acetii*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 97(5): 339-342
- [22] Inoki K, Zhu TQ, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival[J]. Cell, 2003, 115(5): 577-590
- [23] Liu LP, Cash TP, Jones RG, et al. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth[J]. Molecular Cell, 2006, 21(4): 521-531

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出,多于3人时列出前3人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整,不用缩写,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.2406)