

醋酸对巴氏醋杆菌生长和代谢活性的影响

郑宇, 姜春悦, 陈兴京, 杨晟, 王敏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 醋酸对微生物具有较高的毒性, 醋酸菌具有特殊的机制能够耐受较高浓度的醋酸, 常用于醋酸的发酵生产。本论文以巴氏醋杆菌 AC2005 为研究对象, 研究了醋酸对菌体生长、葡萄糖代谢和胞内 ATP 浓度的影响。与不含醋酸条件下相比, 培养基中加入 1% (V/V) 的醋酸, 菌体的生物量增加了 92%, 单位菌体葡萄糖消耗速率增加了 13%, 细胞代谢活性增加了 120%, 代谢产物中丙酮酸浓度增加了约 46%, 柠檬酸和琥珀酸的浓度分别降低了 80% 和 46%, 胞内 ATP 浓度增加了 171%。进一步利用液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 的方法分析了蛋白表达情况, 发现加入醋酸后细胞内与三羧酸循环相关的蛋白明显上调。结果表明, 醋酸菌可以通过提高菌体代谢活性, 增加胞内 ATP 浓度, 从而耐受较高浓度的醋酸。

关键词: 巴氏醋杆菌; 醋酸耐受性; 三羧酸循环; 代谢活性

文章编号: 1673-9078(2014)9-149-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.025

Effects of Acetic Acid on the Growth and Metabolic Activity of *Acetobacter pasteurianus*

ZHENG Yu, JIANG Chun-yue, CHEN Xing-jing, YANG Sheng, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Acetic acid is toxic to micro organisms; however, acetic acid bacteria can tolerate high concentrations of acetic acid via a specific mechanism and, therefore, are ideal for use in acetic acid fermentation. In this study, *Acetobacter pasteurianus* AC2005 was used to evaluate the effect of acetic acid on bacterial growth, glucose metabolism, and intracellular ATP concentration. The results showed that addition of 1% (v/v) acetic acid resulted in an increase in biomass by 92%, glucose consumption per unit mass by 13%, cell metabolic activity by 120%, intracellular ATP concentration by 171%, and pyruvic acid concentration in metabolites by approximately 46%, whereas a decrease in concentration of citric acid and succinic acid in metabolites by 80% and 46%, respectively, as compared to fermentation without addition of acetic acid. Moreover, expression of intracellular proteins, analyzed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) showed that proteins involved in the tricarboxylic acid cycle were up-regulated by addition of acetic acid. Thus, acetic acid bacteria could improve acetic acid tolerance by improving bacterial metabolic activity and increase intracellular ATP concentration.

Key words: *Acetobacter pasteurianus*; acetic acid tolerance; tricarboxylic acid cycle; metabolic activity

醋酸是一种常见的弱酸, 在生物和医药领域具有广泛应用。醋酸对微生物具有较高的毒性, 当浓度大于 5 g/L 时即会影响菌体的生长和代谢。醋酸对菌体产生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^[1]。醋酸菌具有特殊的机制能够耐受较高浓度的醋酸, *Acetobacter pasteurianus* 在 3% 醋酸条件

收稿日期: 2014-04-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2013AA102106); 国家自然科学基金资助项目 (31201406); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (13JQGNJC10000); 国家级大学生创新创业训练计划 (201310057057)

作者简介: 郑宇 (1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品发酵过程和微生物功能分析等方面的研究

下仍能够正常生长^[2]。

醋酸菌的醋酸耐受机制主要有以下几个方面: (1) 醋酸的过氧化机制。主要是在乙酰辅酶 A 转移酶 AarC 的作用下氧化醋酸并使其进入乙醛酸循环途径来实现的^[3]。(2) 质子泵泵出醋酸机制^[4]。依赖 ATP 水解的能量将醋酸和质子泵出, 维持细胞膜两侧正常的 pH 梯度和电势梯度, 保持胞内环境的平衡, 如细胞色素 C 氧化酶, NADH-辅酶 Q 还原酶等^[5]。(3) 改变细胞膜组成提高对醋酸的耐受能力。敲除 *Acetobacter aceti* 磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶 (Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase) 基因 *pmt*, 减少了细胞膜上的磷脂胆碱含量, 导致当培养基中含有醋酸时菌体生长缓慢, 说明细胞膜上的磷脂胆碱含量对细胞的醋酸耐受

性有直接的影响^[6]。此外细胞膜中的鼠李糖和半乳糖组成也与醋酸耐受性有关^[7]。(4) 提高胞内蛋白在醋酸存在条件下的稳定性, 如乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶在较高醋酸浓度下保持稳定能够使菌体耐受醋酸^[8]。(5) 醋酸耐受相关蛋白的表达。醋酸能够诱导包括分子伴侣 GrpE、GroES 和 GroEL 等的表达^[9], ATP 依赖的转运蛋白 AatA 和 ClpB^[10-11]等也与醋酸耐受性相关。

在醋酸菌的培养过程中, 胞内能量对于菌体醋酸耐受性有重要影响, 其中, 醋酸分子的泵出机制以及 ATP 依赖型的转运蛋白, 如 AatA 和 ClpB 均与菌体的能量代谢直接相关^[2], 因此本论文从醋酸对醋酸菌代谢活性的影响出发, 研究醋酸菌代谢活性与醋酸耐受性之间的关系, 进一步完善醋酸菌的醋酸耐受性机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

巴氏醋杆菌 (*A. pasteurianus*) AC2005, 由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏 (保藏编号: CGMCC3089)。

1.1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 15, 碳酸钙 20, 琼脂 17, 自然 pH。

生长培养基 (YPG) (g/L): 葡萄糖 30, 酵母膏 10, 蛋白胨 10, pH 自然。接种前添加醋酸至所需要的浓度。

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养

培养基 (250 mL 摇瓶, 40 mL 装液量) 中接入斜面菌种 1 环, 在 30 °C, 摇床转速 180 r/min 条件下培养 15 h 左右。

1.2.2 发酵培养

按照 10% (V/V) 接种量接入种子液 (250 mL 摇瓶, 40 mL 装液量), 在 30 °C, 摇床转速 180 r/min 条件下培养。

1.3 醋酸对菌体生长和代谢的影响

接种前分别在生长培养基中添加不同浓度的醋酸或其他酸, 分析其对菌体生长、葡萄糖消耗、菌体代谢活性和胞内 ATP 浓度的影响。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度测定

用分光光度计测定发酵液在 610 nm 下的 OD 值, 表征菌体生物量。

1.4.2 葡萄糖浓度的测定

利用 SBA 生物传感仪 (SBA-40C, 山东省科学院生物研究所) 测定发酵液中葡萄糖浓度。

1.4.3 菌体活性的测定

收集对数中后期菌体, 利用 MTT 法测定菌体代谢活性^[12]。

1.4.4 菌体胞内 ATP 浓度的测定

收集对数中后期菌体, 利用 BacTiter-Glo™ 微生物细胞活性检测试剂盒 (G8230) (promega 公司) 测定菌体胞内 ATP 浓度。

1.4.5 葡萄糖代谢产物的测定

取收集对数中后期发酵液 12000 r/min 离心 3 min 后经 0.22 μm 的膜过滤后, 利用 HPLC 分析有机酸代谢产物。HPLC 条件为, 色谱柱: Aminex HPX-87H 300×7.8 (mm); 流动相: 0.005 mol/mL H₂SO₄, 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 20 μL; 紫外检测器波长: 215 nm; 柱温: 30 °C。

1.4.6 蛋白质谱分析

收集对数中后期菌体 PBS 洗涤后超声破碎, 4 °C, 12,000 r/min, 离心 10 min, 取上清, 按照 1:4 (蛋白溶液: 丙酮) 体积比加入预冷的丙酮, -20 °C 过夜沉淀; 4 °C, 12,000 r/min, 离心 10 min, 得到胞内总蛋白。蛋白样品送瀚盟生物技术 (天津) 有限公司进行质谱分析。检测软件: Proteomics Discovery 1.2 (Thermo); 检索算法: Sequest 算法; 比对数据库: *A. pasteurianus* IFO 3283-01 蛋白质组 (NCBI Accession: PRJNA59279)。

1.5 数据分析

每个实验共设 3 个平行, 采用 Origin 7.5 软件进行数据的方差分析和图表生成。

2 结果与分析

2.1 醋酸对菌体生长的影响

在培养基中分别添加 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% (V/V) 的醋酸, 分析醋酸对菌体生长的影响。当醋酸浓度小于 0.5% 时, 对菌体的生长具有一定的促进作用, 随着醋酸浓度的增加, 菌体生长延滞期逐渐增加, 但进入对数期后菌体快速生长, 最终生物量与不添加醋酸相比增加了约 100% (图 1a)。醋酸还能够促进菌体对葡萄糖的消耗, 如图 1b 所示, 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 醋酸条件下, 单位菌体的葡萄糖消耗逐渐增加,

分别比对照增加了 13%、25%、35%和 35%。

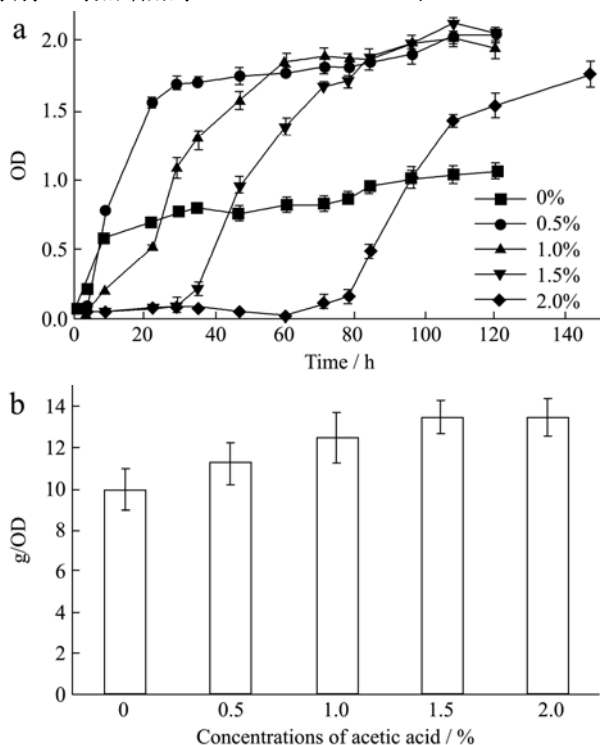


图 1 醋酸对巴氏醋杆菌 AC2005 生长和葡萄糖消耗的影响

Fig.1 Effects of acetic acid on the growth of *A. pasteurianus* AC2005 and glucose consumption

注: a-醋酸对菌体生长的影响; b-醋酸对单位菌体葡萄糖消耗的影响。

2.2 不同酸对菌体生长的影响

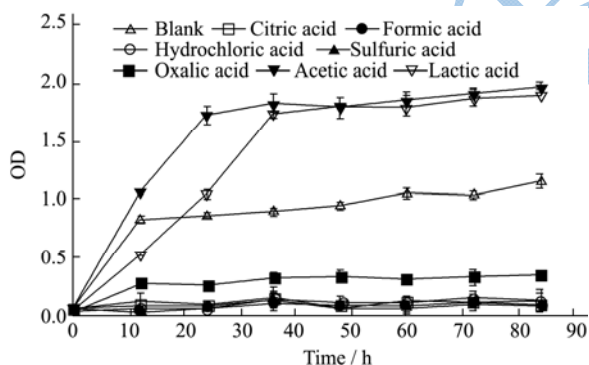


图 2 不同酸对巴氏醋杆菌 AC2005 生长的影响

Fig.2 Effects of acids on the growth of *A. pasteurianus* AC2005

分别向培养基中添加 0.08 mol/L 的甲酸、醋酸、草酸、柠檬酸、乳酸、盐酸、硫酸, 比较不同有机酸和无机酸对菌体生长的影响, 结果如图 2 所示。甲酸、柠檬酸、盐酸草酸、硫酸对菌体生长产生明显的抑制作用, 培养 84 h, 菌体几乎不生长。相同浓度的乳酸虽然也能够导致菌体生物量增加约 100%, 但对菌体生长的抑制作用大于相同摩尔浓度下的醋酸, 说明醋酸对菌体生长的促进作用具有其特殊性, 可能与醋酸菌

特殊的醋酸耐受性机制有关。

2.3 H⁺和 AC⁻对菌体生长的影响

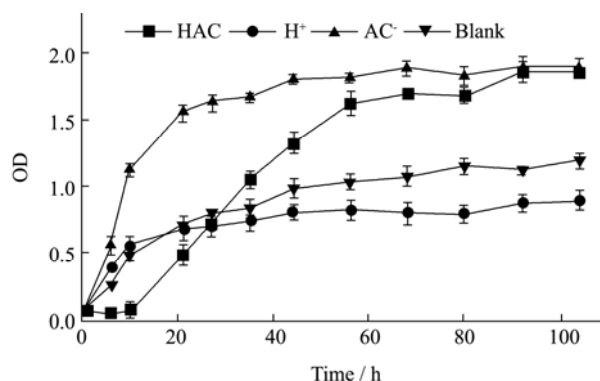


图 3 H⁺和 AC⁻对巴氏醋杆菌 AC2005 生长的影响

Fig.3 Effects of H⁺ and AC⁻ on the growth of *A. pasteurianus* AC2005

分别向培养基中添加 0.16 mol/L 的醋酸、醋酸钠, 以及用 HCl 调节 pH 与 0.16 mol/L 的醋酸一致, 研究醋酸组成部分分别对菌体生长的影响, 结果如图 3 所示。利用 HCl 调节培养基 pH 并未对菌体生长产生明显影响, 其生长过程与空白对照相似, 而相同摩尔浓度的醋酸钠则明显促进了菌体的生长, 其最终生物量与添加醋酸条件下相同, 并且对菌体生长没有抑制作用。因此, 醋酸对菌体生长的影响主要表现在两方面, 一方面醋酸分子对菌体的生长产生抑制作用, 而不是由于添加醋酸导致 pH 降低引起的; 另一方面醋酸根可以促进菌体的生长, 最终生物量与空白对照相比提高约 100%。醋酸对菌体生长的抑制作用主要是由于醋酸分子作为亲脂性分子进入细胞内使胞内的醋酸浓度增加^[2], 而部分解离产生的 AC⁻则可以促进菌体生长。

2.4 醋酸对菌体代谢活性的影响

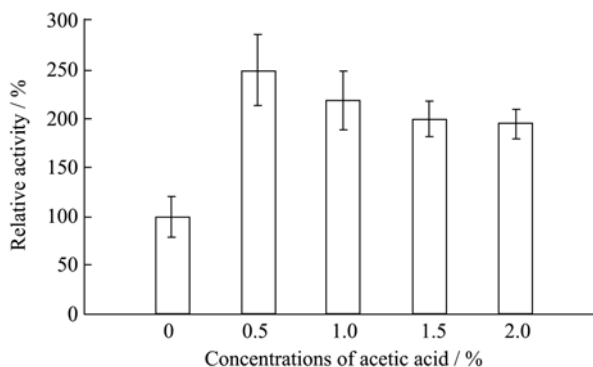


图 4 醋酸对巴氏醋杆菌 AC2005 代谢活性的影响

Fig.4 Effect of acetic acid on the metabolic activity of *A. pasteurianus* AC2005

醋酸的加入导致菌体葡萄糖消耗增加, 因此进一步利用 MTT 法分析醋酸对菌体代谢活性的影响, 结果

如图 4 所示。培养基中添加 0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的醋酸后，菌体的代谢活性增加，相对活力值分别是对照的 2.5 倍、2.2 倍、2 倍和 1.95 倍。MTT 法主要是通过琥珀酸脱氢酶来表征菌体的活性变化^[12]，菌体相对活性的增加说明其琥珀酸脱氢酶活性增加。

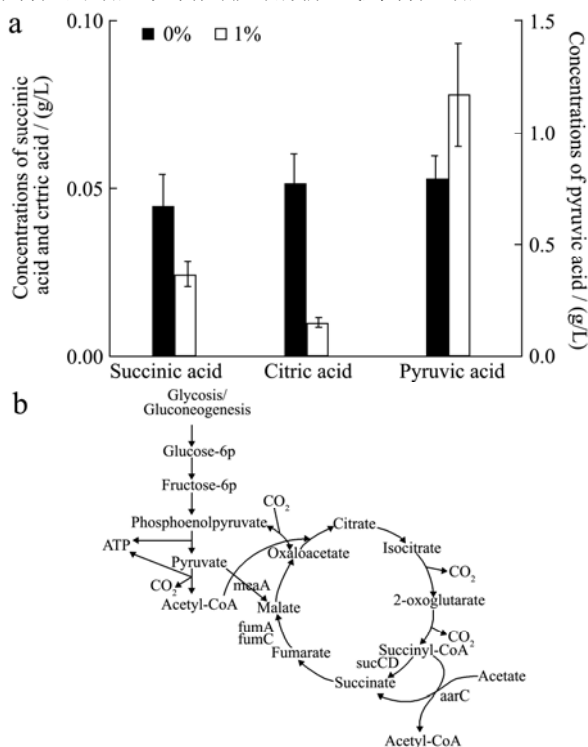


图 5 醋酸对巴氏醋杆菌 AC2005 代谢的影响

Fig.5 The effects of acetic acid on the metabolism of *A. pasteurianus* AC2005

注：a-醋酸对巴氏醋杆菌琥珀酸、柠檬酸和丙酮酸浓度的影响；b-巴氏醋杆菌葡萄糖代谢途径示意图。

已有研究表明，葡萄糖的消耗能够增加醋酸菌乙醇脱氢酶的活性，而乙醇脱氢酶活性的增加能够提高菌体的醋酸耐受性，同时，醋酸菌可以通过提高顺乌头酸酶酶活提高醋酸耐受性^[13]。为进一步分析醋酸对菌体葡萄糖代谢的影响，利用 HPLC 的方法分析了发酵液中的柠檬酸、琥珀酸和丙酮酸浓度变化。从图 5a 可以看出，发酵液中添加 1% 的醋酸后发酵液中丙酮酸的浓度明显增加，同时柠檬酸和琥珀酸的浓度分别降低了 80% 和 46%。在 TCA 循环过程中柠檬酸经顺乌头酸酶催化形成异柠檬酸，琥珀酸经琥珀酸脱氢酶催化生成延胡索酸，MTT 法证明醋酸能够提高琥珀酸脱氢酶的活性（图 4），因此发酵液中琥珀酸浓度的降低是由于琥珀酸脱氢酶活性的提高导致的，而柠檬酸浓度的降低可能是由于顺乌头酸酶活性的提高导致的^[13]。由于琥珀酸脱氢酶和顺乌头酸酶均是 TCA 循环中的关键酶，因此培养基中添加醋酸导致菌体生物量和葡萄糖

消耗的增加主要是由于醋酸促进了 TCA 循环引起的。

葡萄糖进入细胞后经过糖酵解途径产生丙酮酸，同时产生 ATP，如图 5b 所示。当培养基中添加醋酸后，醋酸可能通过 *aarC* 途径^[13]，利用琥珀酸辅酶 A 将胞内的醋酸转化为乙酰辅酶 A，进一步进入 TCA 循环，因此葡萄糖代谢产生的丙酮酸逐渐积累，导致丙酮酸浓度增加了约 46%。

2.5 醋酸对胞内 ATP 浓度的影响

醋酸促进了菌体对葡萄糖的消耗和 TCA 循环，葡萄糖代谢过程中会产生 ATP（如图 5B），因此分析了醋酸对胞内 ATP 浓度的影响，结果如图 6 所示。与对照相比，培养基中加入 1% 的醋酸后，胞内 ATP 浓度增加了约 171%。已有研究表明，质子泵和相关 ATP 依赖型蛋白等醋酸耐受性机制均与胞内的 ATP 浓度有直接的关系^[3, 11]，在醋酸压力条件下，提高菌体内 ATP 浓度是醋酸菌适应醋酸环境的一个重要因素，因此醋酸可以促进葡萄糖的代谢和 TCA 循环，产生更多的能量和还原力，发挥质子泵和相关 ATP 依赖蛋白的功能，减少醋酸对菌体的抑制作用，从而提高菌体醋酸耐受性。

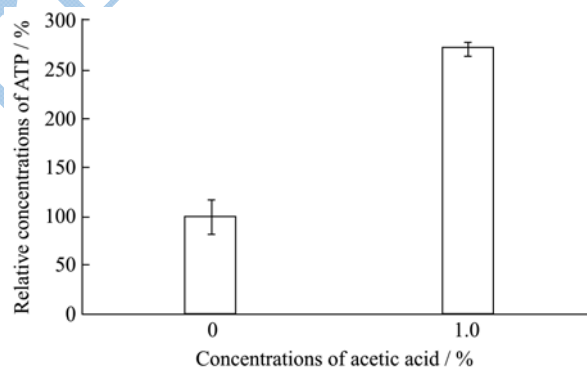


图 6 醋酸对巴氏醋杆菌 AC2005 胞内 ATP 浓度的影响

Fig.6 Effect of acetic acid on the ATP concentration of *A. pasteurianus* AC2005

2.6 醋酸对菌体蛋白表达的影响

由于巴氏醋杆菌具有较高的醋酸耐受性和醋酸积累能力，具有重要的工业应用价值，其全基因组测序已经完成^[14]，有利于对其蛋白表达差异进行分析。本论文利用蛋白质谱的方法比较了培养基中有无醋酸条件下的胞内蛋白表达差异，重点分析了与葡萄糖代谢和 TCA 循环相关的蛋白，如表 1 所示。比较不同条件下相关蛋白的相对浓度可以看出，当培养基中添加 1% 醋酸时，与葡萄糖代谢和 TCA 循环相关的蛋白表达所占比例均有所增加，该结果与醋酸促进葡萄糖消耗和

TCA 循环的结果相一致。

表 1 葡萄糖代谢和 TCA 循环相关蛋白的比较

Table 1 Comparison of proteins related with glucose metabolism and TCA cycle

蛋白功能	蛋白名称	占总蛋白比例/%	
		0%醋酸	1%醋酸
葡萄糖代谢	甘油 3-磷酸脱氢酶	0.0032	0.0060
	磷酸丙酮酸合成酶	0.0025	0.0051
	丙酮酸脱氢酶	0.0024	0.0051
TCA 循环	顺乌头酸酶	0.0083	0.0143
	柠檬酸合成酶	0.0031	0.0065
	异苹果酸脱氢酶	0.0029	0.0029
	异柠檬酸脱氢酶	0.0020	0.0024
	延胡索酸合成酶	0.0008	0.0017
	磷酸甘油酸激酶	0.0016	0.0031
	苹果酸脱氢酶	0.0009	0.0017

3 结论

醋酸菌具有特殊的机制耐受醋酸，醋酸对巴氏醋杆菌 AC2005 生长和代谢的影响主要有以下几个方面：

- 3.1 培养基中添加醋酸可以提高菌体浓度；
- 3.2 醋酸主要以未解离的分子形式对醋酸菌生长产生抑制作用，一定浓度的醋酸根可以促进菌体生长；
- 3.3 醋酸能够提高菌体的代谢活性，促进菌体对葡萄糖的消耗和 TCA 循环过程，同时促进菌体产生较多的 ATP 和还原力，从而耐受较高浓度的醋酸。

参考文献

[1] Lasko D R, Zamboni N, Sauer U. Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(2): 243-247

[2] Saeki A, Taniguchi M, Matsushita K, et al. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(9): 317-323

[3] Fukaya M, Takemura H, Tayama K, et al. The *aarC* gene responsible for acetic acid assimilation confers acetic acid resistance on *Acetobacter aceti* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76(4): 270-275

[4] Matsushita K, Inoue T, Adachi O, et al. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4346-

4352

[5] Chan S I. Proton pumping in cytochrome oxidase: the coupling between proton and electron gating [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(19): 8505-8506

[6] Hanada T, Kashima Y, Kosugi A, et al. A gene encoding phosphatidylethanolamine n-methyltransferase from *Acetobacter aceti* and some properties of its disruptant [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(12): 2741-2748

[7] Trček J, Jernejc K, Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression [J]. Extremophiles, 2007, 11(4): 627-635

[8] 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

[9] Ishikawa M, Okamoto K A, Jochi T, et al. Cloning and characterization of *grpE* in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(1): 25-31

[10] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 497-505

[11] Morio I A, Okamoto K, Kazaki M, et al. Cloning and characterization of *clpB* operon in *Acetobacter aceti* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 69-71

[12] 陈胜杰,陈欢,曹献英,等.MTT法在木醋杆菌活力检测中的应用[J].安徽农业科学,2012,40(16):8828-8832

CHEN Sheng-jie, CHEN Huan, CAO Xian-ying, et al. Application of MTT in the determination of *Bacillus xylinus* vitality [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(16): 8828-8832

[13] Mullins E A, Francois J A, Kappock T J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA): acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter Aceti* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(14): 4933-4940

[14] 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