

优良醋酸菌种 AC2005 的鉴定

王洪臣, 王敏, 刘洪祥, 骆健美, 张锦丽

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 将醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 片段转入载体 pMD18-T, 并转化大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*)。经测序和序列分析显示, 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 片段与巴斯德醋杆菌 16S rDNA 片段同源性均达 95%。根据醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 的生理生化特征, 培养特征, 形态特征结果将醋酸杆菌 AC2005 归属为巴斯德醋杆菌罗旺亚种 (*Acetobacter. pasteurianus subsp.lovaniensis*)。

关键词: 醋酸杆菌罗旺亚种; 16S rDNA 序列分析; 菌种鉴定; 醋酸

中图分类号: TS201.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0513-04

Identification of high Acidic acid-producing Strain of *Acetobacter AC2005*

WANG Hong-chen, WANG Min, LIU Hong-xiang, LUO Jian-mei, ZHANG Jin-li

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The 16S rDNA sequence of *Acetobacter AC2005* was transferred into plasmid pMD18-T after amplified by PCR. Then the recombinant plasmid was transformed in *Escherichia coli*. The analysis of 16S rDNA sequence indicated that the sequence was similar to the 16S rDNA sequence of *Acetobacter pasteurianus* with the homology up to 95%. According to the differences in biochemical characteristics, incubation characteristics, conservative sequence contrast, the strain was further identified as *A. pasteurianus subsp.lovaniensis*.

Key words: *A. pasteurianus subsp.lovaniensis*; 16S rRNA sequence analysis; bacteria identification; Acetic acid.

食醋菌种是影响食醋品质的关键因素之一, 目前国内液态食醋生产使用的菌种主要是醋酸菌 AS1.41 (*Acetobacter.rancensL.*) 恶臭醋酸杆菌浑浊变种和沪酿 1.01 醋酸杆菌 (*A.lovanienseL.*), 工业产酸产量在 70~80 g/L, 国外则可以生产 140 g/L 以上的高酸度醋, 因此选育优良的食醋专用菌种, 适合工业化生产, 成为食醋行业目前所面临的主要问题。

醋酸杆菌 AC2005 是本研究室在醋醅中分离得到的优良醋酸菌株, 具有耐受高浓度乙醇 ($\geq 14\%$ (V/V)) 的优良特性, 摇瓶发酵产酸 80 g/L 以上, 醋酸转化率在 95% 以上, 具有较高的应用价值。胡会萍等^[1]根据培养特征和生理生化特征对山西老陈醋优势醋酸菌进行鉴定。但由于醋酸杆菌各种属间培养特征和形态特征相似, 生理生化特征区别不明显。本论文采用 16S rDNA 保守序列分析和生理生化特征相结合的方法, 对醋酸杆菌 AC2005 进行了分类鉴定。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-02-22

基金项目: 天津市科技攻关计划重点项目 (06YFGZNC 00400)

作者简介: 王洪臣 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物发酵研究

通讯作者: 王敏, 教授, 博士生导师

1.1 菌种

1.1.1 菌株来源

醋酸杆菌 AC2005: 本研究室提供。

1.1.2 参照菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 均为天津科技大学生物工程微生物制药研究室保藏菌种。

1.1.3 工程菌和质粒

E.coli DH5 α 由天津科技大学微生物制药研究室保存, 克隆载体 pMD18-T 购于大连宝生物工程有限

1.2 培养基

1.2.1 液体培养基

葡萄糖 10 g/L, 酵母膏 15 g/L, 乙醇 50 mL/L, 乙酸 15 mL/L。

1.2.2 生理生化鉴定用培养基

醋酸定性培养基, 产纤维素培养基, 铵盐唯一氮源培养基, 产葡萄糖培养基, 生酮实验培养基, 明胶水解培养基, 淀粉水解培养基^[2-4]。

1.3 主要仪器

PCR 扩增仪 (Gene Amp PCR System 9600), Perkin Elmer 公司产品; 高速冷冻离心机, 日本 Kubota

产品; DNA/RNA 定量仪, 瑞典 Pharmacia Biotech 公司生产; 超声波破碎仪, Cole Palmer CPX 600, HYG 回转式恒温调速摇瓶柜 (上海欣蕊自动化设备公司), WS2-134-75 电热恒温培养箱 (天津市实验仪器厂)。

1.4 主要试剂

Tap 聚合酶、dNTP、氨苄青霉素 (Amp)、氯仿、苯酚购于上海生工生物工程有限公司; DNA 抽提试剂盒为 TIANGEN 产品, DNA 回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司。

1.5 引物

选择 Messick 等报道的通用引物对 fD1/rD1^[5]。该引物能扩增大多数细菌近乎全长的 16s rRNA 基因, 由大连宝生物公司合成。引物序列如下:

P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

P2: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

1.6 实验方法

1.6.1 培养方法

1.6.1.1 斜面及平板培养

恒温培养箱 30 °C 培养 48 h。

1.6.1.2 摇床培养

刮取 3~4 环斜面菌种接入装有 40 mL 液体培养基中摇床培养, 摇床转速为 180 r/min, 培养温度 30 °C。

1.6.2 醋酸杆菌 AC2005 形态观察

将试管斜面上的菌株在液体培养基中连续活化两次, 第 1 次活化菌体培养 30 h, 转接, 再第 2 次活化 24~30 h, 取样进行革兰氏染色, 以枯草芽孢杆菌作阳性对照、大肠杆菌作阴性对照。同时进行细胞个体形态及排列方式的观察。

1.6.3 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 序列分析

1.6.3.1 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 的获取

根据文献^[6]提取醋酸杆菌 AC2005 总 DNA。

1.6.3.2 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 的 PCR 扩增

反应在 50 μL 体系中进行: 10×buffer 5.0 μL, dNTP 1.0 μL, fD1 1.0 μL, rD1 1.0 μL, 模板 1.0 μL, Taq DNA Polymerase 0.5 μL, ddH₂O 39.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 循环扩增 30 次; 72 °C 10 min。

1.6.3.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳与 PCR 产物的回收

取 5 μL PCR 扩增产物在 0.7% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 DNA marker DL2000 作标准分子量, 在紫外灯下观察电泳结果并拍照。采用北京鼎国生物技术公司 PCR 产物回收试剂盒回收, 方法依试剂盒使用说明。

1.6.3.4 基因克隆与鉴定

利用 T-A 连接, 按 pMD18-T 载体说明书将纯化

的 PCR 产物直接连接于 pMD18-T 载体中, 按化学法转化到 *E.coli* DH5α 感受态细胞, 在蓝白筛选平板上挑选白斑, 接于含有 Amp 的 LB 培养基过夜培养。取 1.5 mL 培养物用于质粒抽提, 然后进行酶切 (*EcoR* I 和 *Hind* III) 和 PCR 鉴定^[7]。

1.6.3.5 测序及序列分析

挑选阳性克隆送大连宝生物工程有限公司进行 DNA 双向测序。同时利用 DNAMAN 分析软件将测序所得的醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 核苷酸序列与 GenBank 上收录的代表菌株 16S rRNA 基因核苷酸序列进行同源性比对和系统进化树的建立。

2 结果与讨论

2.1 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 的序列分析

2.1.1 醋酸杆菌 AC2005 总 DNA 的提取

收集摇瓶培养 14 h 的醋酸杆菌 AC2005 菌体, 提取总 DNA。

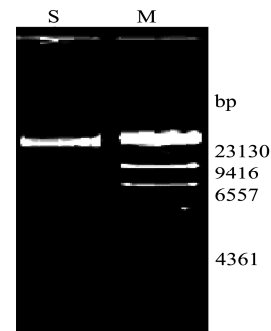


图 1 醋酸杆菌总 DNA 图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of total DNA

M: λ HindIII fragment Marker; S: total DNA of Acetobactor AC2005

图 1 醋酸杆菌总 DNA 图谱可看出, 醋酸杆菌 AC2005 总 DNA 分子量约 23kb, 符合 PCR 模板要求。

2.1.2 醋酸杆菌 AC2005 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

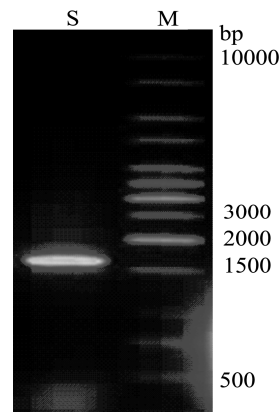


图 2 醋酸杆菌 AC2005 16s rDNA 的 PCR 图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis of 16s rDNA

M: λ HindIII fragment Marker; S: Acetobactor AC2005 16s rDNA/PCR

利用 Ex Taq DNA 聚合酶扩增, PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 见图 2。从图 2 可知, 醋酸杆菌 AC2005 在约 1600 bp 处出现特异的目的片段, 与预计的片段大小吻合。

2.1.3 PCR 产物的克隆及阳性克隆的筛选

PCR 产物分别与 pMD18T 载体连接并转化 *E.coli* DH5 α 受体菌之后, 在 Amp^r 培养基表面生长, 其中蓝色菌落为阴性克隆, 为 T 载体自身环化所产生。白色的菌落可能是所需的阳性克隆, 需做进一步的鉴定。

2.1.4 重组质粒的鉴定

采用碱裂解法提取重组菌的质粒 DNA, 以该重组质粒为模板进行 PCR, 从图 3 可看出在约 1600 bp 处扩增出特异性条带, 初步表明 16S rDNA 已成功地插入到 pMD18 载体中。

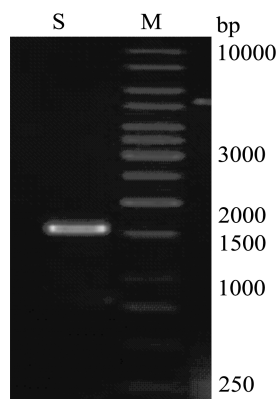


图 3 重组表达质粒 pMD18T-16srRNA PCR 图谱
Fig.3 Identification of pMD18T-16srRNA by PCR
 M :1kb DNA marker; S :pMD18T-16srRNA /PCR

对重组质粒 DNA 进行双酶切。从图 4 重组质粒 pMD18T-16s rRNA 双酶切图谱可知双酶切产生一条与线性 pMD18T 载体大小相符的大片段和一条与 16S rDNA 大小相符的小片段, 证明 16S rDNA 片段成功地插入到 pMD18T 载体中, 将重组表达质粒命名为 pMD18T-16S rRNA。

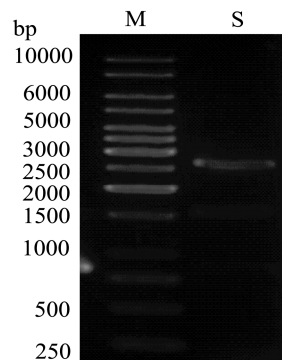


图 4 重组质粒 pMD18T-16srRNA 双酶切图谱
Fig.4 Identification of Recombinant Plasmid
 pMD18T-16srRNA digested by two enzymes

M:1 kbDNA marker; S: pMD18T-16SrRNA/ *EcoR* I +*Hind* III

2.1.5 测序结果及序列分析

将穿刺培养阳性的转化子送至公司测序, 序列结果显示目的基因为 1571 bp, 接近 16S rDNA 基因片段的长度。测得序列已登录到 GenBank, 登录号为 EU034024。醋酸杆菌 AC2005 的 16S rDNA 序列与巴斯德属醋酸杆菌 16S rDNA 序列与很高的同源性较高, 达 95%以上。

菌种与其他菌类的相似度见图 5。

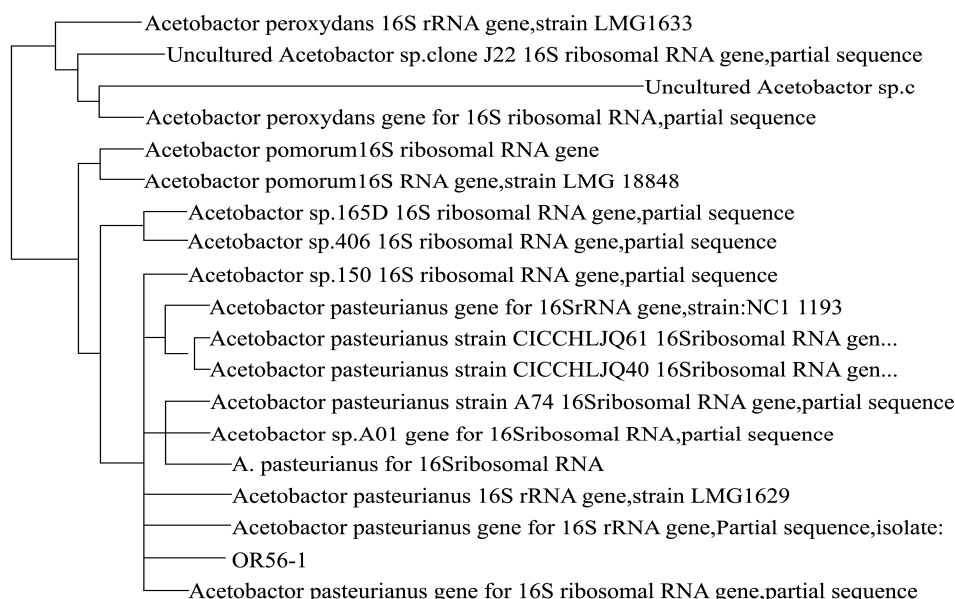


图 5 醋酸杆菌 AC2005 在进化树中的位置
Fig.5 Position of Acetobacter AC2005 in the evolutionary tree

2.2 醋酸杆菌 AC2005 生理生化特征

2.2.1 形态特征

醋酸杆菌 AC2005 细胞为短杆状, 有时为椭圆状, 革兰氏染色阴性, 单生或成对或成链生长, 大小为 (0.6~0.7)×(0.8~1.0) μm, 不产生芽孢。菌落圆形, 突起, 表面光滑, 在含碳酸钙的固体培养基上能产生透明圈。

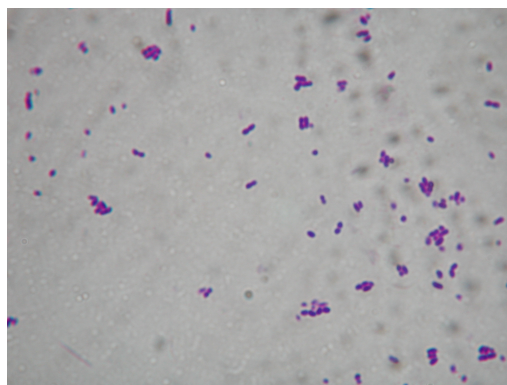


图 6 醋酸杆菌 AC2005 的个体形态 (×10×100)

Fig.6 Morphological observation of *Acetobacter* AC2005 under optical microscope (×10×100)

2.2.2 培养特征

醋酸杆菌 AC2005 能氧化乙醇成乙酸, 并可氧化乙酸生成二氧化碳和水, 温度生长范围广泛, 在 15℃~35℃ 之间均可生长, 最适宜生长温度为 32℃。在 Hoyer-frateur 培养基上不生长, 10% 高糖培养基上可生长。

2.2.3 生理生化实验

表 1 醋酸杆菌 AC2005 生理生化特征实验结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of *Acetobacter* AC2005

实验项目	实验结果	实验项目	实验结果
醋酸定性试验	+	产葡萄糖酸实验	+
产纤维素试验	-	生酮试验	-
淀粉水解实验	-	接触酶试验	+
明胶水解	-	铵盐唯一氮源	-

注: “+”代表阳性, “-”代表阴性

根据上述实验结果, 对照《伯杰氏细菌鉴定手册》将醋酸杆菌 AC2005 归属为巴斯德醋酸杆菌罗旺亚种 (*A. pasteurianus* subsp. *lovaniensis*)。

3 结论与讨论

醋酸杆菌可快速氧化乙醇生成乙酸, 能利用乙醇做唯一碳源, 是工业上生产食醋的主要菌株。本文中通过 16S rDNA 保守序列比对及分析将醋酸杆菌 AC2005 归属为巴斯德醋酸杆菌^[8], 并通过生理生化特征实验将醋酸杆菌 AC2005 进一步确定为巴斯德醋酸杆菌罗旺亚种 (*A. pasteurianus* subsp. *lovaniensis*), 为醋酸杆菌 AC2005 的应用研究提供一定理论基础。

参考文献

[1] 胡会萍,郝林.山西老陈醋优势醋酸菌的分离鉴定[J].山西农业大学学报,2004,24(3):283-285

[2] 焦振泉,刘秀梅.16S rRNA序列同源性分析与细菌系统分类鉴定[J].国外医学卫生学分册.1998,25(1):12-16

[3] 施安辉,王瑜.洛口醋醅中优势醋酸菌的分离与鉴定[J].中国调味品,1993,(3):9-12.

[4] R E 布坎南,E 吉本斯.中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译.伯杰醋酸杆菌 AC2005 鉴定手册(第八版)[S].北京:科学出版社,1984:362-366

[5] Messick JB, Berent LM, Cooper SK. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cat and differentiation of *H.felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis [J]. J Clin Microbiol.1998,36(2):462-466

[6] 宫强,关道明,王耀兵,等.大肠杆菌总 DNA 快速提取方法的比较研究[J].海洋环境科学,2005,(4):63-66

[7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1999:250-270

[8] 干咏华,李爱红,安东善,等.6 种常见呼吸道感染细菌 16S rRNA 基因克隆[J].中国免疫学杂志, 2007,(5):25-28

用生物传感器检测肉毒(杆)菌毒素

最近, 研究者们发明一种快速检测是否存在肉毒(杆)菌毒素的新方法。肉毒(杆)菌毒素是梭菌属肉毒(杆)菌合成的神经毒素。它引起很大恐慌, 在于它可用于攻击美国的食品供用。它也可降低加工食品中的氧气含量。

研究者们发明的这种毒素生物传感器能雇用活的神经系统菌种以微电极矩阵形式存活于试管中。一个微电极矩阵是一个附带表皮植入电极格子的培养皿, 可启动矩阵上神经系统菌种的动作电位的细胞外记录。

研究者们相信用这些矩阵测量皮层神经网络的行动将为毒素的检测提供极有价值的衬底。

(新闻来源: 中国食品科技学会)