



醋酸菌耐酸机理及其群体感应研究新进展

夏凯, 朱军莉, 梁新乐*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要: 醋酸菌(acetic acid bacteria, AAB)是一类严格好氧的革兰氏阴性细菌,因其乙醇氧化生成醋酸能力强、高耐醋酸等特性而成为食醋发酵的主要工业菌种。醋酸菌的耐酸性对于高酸度食醋生产具有重要意义。随着醋酸菌的蛋白组学及基因组学研究的深入,其糖代谢、蛋白质代谢、脂代谢及应激响应等分子机制或过程也得到更多的阐释;葡糖醋杆菌中有关群体感应系统的研究报道则为从信号通路角度探索醋酸菌的耐酸机制提供了新的思路,进而对于高耐酸醋酸菌的选育以及醋酸发酵工艺的优化具有重要的参考意义。本文在简介蛋白组、基因组研究的基础上,着重综述醋酸菌群体感应的研究进展。

关键词: 醋酸菌, 群体感应, 信号分子, 耐酸机制

醋酸菌是一类严格好氧的革兰氏阴性细菌,分类学上隶属于 α 变形杆菌纲,红螺菌目,醋酸醋杆菌科^[1-2]。醋酸菌常见于气候温暖、空气湿润的区域,广泛分布于果园土壤、果汁、蜜饯、花朵以及一些昆虫的肠道内^[3]。在过去的几十年中,随着分子生物学技术的发展和醋酸菌新菌种的分离鉴定,醋酸菌的生物分类得到了更进一步的细化。醋酸菌最显著的特征即是对醇、糖类的不完全氧化特性,前者被用于食醋的生产,而后者被用于糖酸类如葡萄糖酸等生产的过程中^[4]。此外,醋酸菌的不完全氧化特性还被广泛用于生物电池研究开发中^[5]。而木醋醋酸菌产生的细菌纤维素则是一种优良的生物材料,因此醋酸菌具有广泛的工业价值^[6]。

对于食醋发酵生产而言,醋酸菌耐酸性能高低直接影响着菌种的产酸强度。不同的醋酸菌具有不同的醋酸耐受能力,其中葡糖醋杆菌属具有较高的耐酸性,可以达到10% (W/V)以上;而采用巴氏醋杆菌作为生产菌株时醋酸产量一般为5%–7% (W/V)。有报道表明即使0.5%的醋酸浓度即可对细菌产生抑制作用。因此,除了工艺优化提高菌株的产酸强度外,阐明醋酸菌的耐酸机制一直是醋酸菌研究领域的重点话题,对于高耐酸工业醋酸菌种的选育以及新型高酸度食醋的发酵生产具有重要的指导意义。结合本实验室醋酸菌的前期研究工作,本文综述了醋酸菌耐酸机制研究的最新概况、以及群体感应与耐酸机制的关联

基金项目: 国家自然科学基金(31171745); 浙江省自然科学基金(LY15C200006)

*通信作者。Tel: +86-571-8807024; E-mail: dbiot@mail.zjgsu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-07; 修回日期: 2016-07-20; 网络出版日期: 2016-09-23

性,讨论了醋酸菌可能存在的潜在机制,为高耐酸醋酸菌的选育及提高食醋产量提供新的研究思路。

1 醋酸菌分类研究概述

Beijerinck 于 1898 年对醋酸菌中的第 1 个属——醋杆菌属(*Acetobacter*)进行了描述。该属中只有 1 个菌种即 *Acetobacter aceti*, 该菌种具有氧化乙醇生成乙酸并且进一步氧化乙酸生成二氧化碳的能力。葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)是第 2 个确立的属,与醋杆菌属不同的是该属的菌种不能氧化乙醇生成乙酸,但能氧化葡萄糖产生葡萄糖酸,同时该属中的菌株长有端生鞭毛(醋杆菌属为周生鞭毛)。随着研究的深入,Yamada 等学者发现醋杆菌属的菌株又可以分为两大类,一类是呼吸链辅酶 Q-10 类型,而另一类则是 Q-9 类型。于此,一个新的属——葡萄糖酸醋杆菌属(*Gluconacetobacter*),从醋杆菌属(*Acetobacter*)中被分离出来,这一新的分类阶级也得到了基于 16S rRNA 序列分析的支持;同时原醋杆菌属中的部分种(如 *A. hansenii*, *A. europaeus*, *A. oboediens*, *A. intermedius*

等)也随之被归类到葡萄糖酸醋杆菌属中^[2-3,7]。

2012 年 1 个新的属再次从葡萄糖酸醋杆菌属中被分离出来并命名为 *Komagataeibacter*, 该属中大部分菌种原属于 *Gluconacetobacter xylinus* 为代表的类群(*Ga. Xylinus*, *Ga. Hansenii*, *Ga. Europaeus*, *Ga. Oboediens*, *Ga. Intermedius*, *Ga. rhaeticus* 等)。和葡萄糖酸醋杆菌属相比, *Komagataeibacter* 属中菌种的典型特征是没有鞭毛、不能产生棕色化合物、部分菌株可以产生细胞纤维素、不能产生 2, 5-二酮-D-葡萄糖酸、可以由甘油产生二羟基丙酮、可以氧化葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、乙醇产生有机酸等^[8]。该新属的确立也使得我们对原葡萄糖酸醋杆菌属有了更进一步的了解和认识。至此,醋酸菌中最主要的属就确立为 *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* 以及 *Komagataeibacter*。但是新的属种还在不断被发现,如 *Acidomonas*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Asaia* 等属的菌株。随着这些年来一些新的菌种的发现和加入,醋酸菌也已被明确包含 19 个属, 87 个种的大类菌群(图 1)。随着分子分

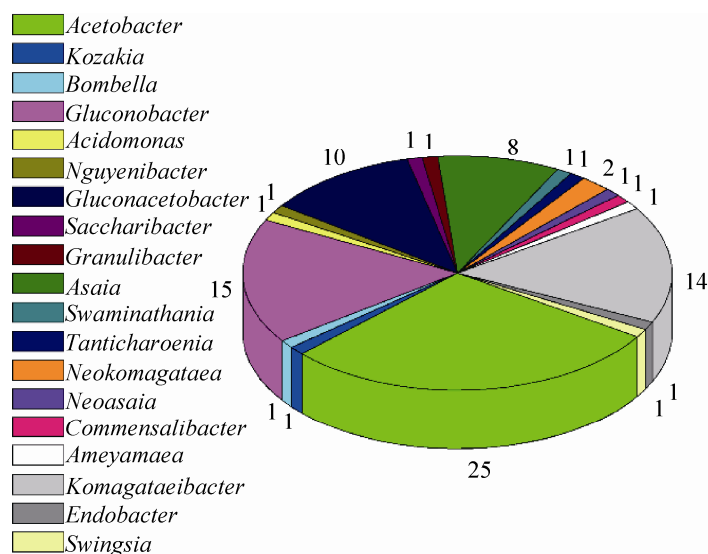


图 1. 醋酸菌属种分类组成图示

Figure 1. Diagram of currently described genera components of acetic acid bacteria and their species numbers included.

型分类技术的发展以及新醋酸菌种的被分离鉴定, 我们相信醋酸菌的分类学地位也将更新。醋酸菌分类的变化对于我们比较基因组学、代谢组学等角度来研究醋酸菌的遗传进化^[1,9]、生物学功能如产酸、耐酸性能具有指导意义^[4,6]。

2 醋酸菌耐酸性的分子机制

不同醋酸菌的耐酸性能存在明显差异, 如葡萄糖醋杆菌属的菌株耐酸能力普遍高于醋杆菌属的菌株; 而 *Saccharibacter* 和 *Asaia* 属的菌株却不能在含有醋酸的培养基上生长^[10-11]。目前关于醋酸菌耐酸性分子机制的认识主要来自于蛋白组学、转录组学和基因组学的研究, 可归纳为 5 个主要方面: (1) 醋酸的外排系统; (2) 醋酸在胞内的同化作用; (3) 关键酶的作用; (4) 细胞应激响应; (5) 细胞包被结构修饰等^[12-13]。但需要指出的是, 这些研究大都来自于低酸度、短时间刺激后醋酸菌样本。与之相比, 来自于高酸度食醋发酵过程的醋酸菌样本研究报道较少。最近, 我们与 Andrés-Barrao 几乎在同时报道了高酸度食醋发酵过程的醋酸菌样本的比较蛋白组学研究, 表明其生理过程存在显著的差异性。在高酸度食醋压力下(>9% W/V) 醋酸菌发生细胞膜结构刚性的改变、氧化还原酶类过量表达、膜脂组成的变化、以及和蛋白转录修饰折叠相关的蛋白的过量表达等^[14-16]。因此阐明耐酸性分子机制需要更多的试验样本。

2.1 采用蛋白组学、转录组学方法阐述醋酸菌耐酸性分子机制

蛋白组学是研究醋酸菌耐酸机制的主要方法之一, 通过比较不同酸度条件下醋酸菌蛋白质表达轮廓差异表达, 探索响应过程中发挥重要作用的蛋白质。Nakano 等利用双向电泳技术分析了醋

酸刺激下 *A. aceti* 蛋白的差异表达, 首次确定了一个醋酸 ABC 蛋白转运子, 该蛋白的过量表达可以显著提高宿主细胞的乙酸产量及乙酸耐受能力, 同时也阐释了顺乌头酸酶与醋酸菌耐酸之间的关联^[17]。Andrés-Barrao 等研究了<4% (W/V) 酸度刺激下 *A. pasteurianus* 的应急响应, 鉴定了 53 个差异蛋白。这些蛋白在蛋白质折叠、压力响应、氧化还原过程、糖酵解过程、三羧酸循环、蛋白质合成过程、细胞膜修饰、外膜蛋白以及细胞形态变化等方面发挥着重要作用^[13]。以上醋酸菌蛋白组学研究的样本主要来自于低酸度的环境或者通过外加乙酸的方式进行短时间刺激。Andrés-Barrao 等^[15]报道了 *Komagataeibacter* spp. 在>10% (W/V) 酸度下生长的蛋白轮廓, 鉴定到 32 个蛋白表达上调了。这些蛋白主要涉及代谢过程、压力响应、蛋白折叠、氧化还原及生物合成过程。其中, 高表达的蛋白有三羧酸循环中的酶如柠檬酸合成酶、异柠檬酸脱氢酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、琥珀酰-CoA 和辅酶 A 转移酶等, 进一步证实了 TCA 循环在醋酸菌耐酸中的作用。这表明, 一方面醋酸被氧化降解达到了细胞质内脱毒的效果, 另一方面也为细胞提供了更多的能量供应从而有利于细菌耐酸性。但是, 醋酸的这一氧化过程对于食醋酸度的积累也是不利, 因此在醋酸过氧化及积累二者之间如何取得平衡, 这在工艺优化调整过程中是值得考虑的一个问题。与分枝氨基酸如异亮氨酸和缬氨酸氧化相关的 ketol-acid reductoisomerase (ilvC) 在高酸度下表达量上调了 19.87 倍, 但其机制还有待进一步研究。

我们实验室则对于巴氏醋杆菌 Ab3 的高酸度食醋生产过程[>9% (W/V) 醋酸, 5 d]进行了研究, 发现了一些新的耐酸性线索^[16]。我们鉴定了 26 个

差异表达蛋白, 涉及巴氏醋杆菌的能量代谢、细胞膜结构、代谢过程及蛋白合成等。与上述 *Komagataeibacter* spp. 高酸度下蛋白轮廓存在类似性。同时, 我们也鉴定了 1 个新的差异蛋白, 如在高酸度情况下 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶的表达量明显增加, 从而可能影响硫胺素以及核苷类化合物的合成。硫胺素对于醋酸菌的生长至关重要, 而核苷类化合物是极端微生物如嗜热菌细胞膜脂质组成中重要的组分, 因此该酶表达量的提升对于醋酸菌应对高酸度环境具有重要意义。此外我们还发现, OsmC 和 AhpC (alkyl hydroperoxide reductase subunit C) 在高酸度条件下表达量上调, 预示着在细胞表面结构和功能的改变, 这些蛋白在细胞适应高酸度环境中至关重要。而与能量代谢和蛋白合成相关的酶表达量在高酸度下也显著上调, 如转酮醇酶(transketolase)、蛋白转运蛋白(protein-export protein SecB)、转录终止子(transcription termination)、硫代硫酸硫基转移酶(thiosulfate sulfurtransferase)、以及转录延长因子(transcription elongation protein NusA)等, 表明醋酸

菌在高酸度压力下为维持正常的生长需要消耗更多的能量及蛋白合成。虽然醋酸菌中关于这些蛋白的差异性表达的具体分子机制尚未阐释清楚, 但这些蛋白的变化与醋酸菌适应高酸度环境密切相关, 为今后的研究工作提供了重要对象和依据。关于耐酸性机制的蛋白组学研究如表 1 所示。

2.2 比较基因组学分析醋酸菌潜在耐酸性机制

随着第二代高通量测序技术的成熟以及生物信息学时代的到来, 越来越多的生物基因组得到了测序, 醋酸菌也不例外, 而这为从基因组水平研究醋酸菌的耐酸机制提供了保障。搜索 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库可以发现, 醋酸菌基因组序列数据库每年都在更新和变化。然而从现有的有关醋酸菌的基因组研究的文献报导可以看出, 采用比较基因组学方法研究探索醋酸菌的高耐酸机制以及进化机制的文献较少。

Azuma 等分析了巴氏醋杆菌全基因组, 发现其基因组不稳定, 存在大量的转座序列、插入序列、高突变的串联重复序列以及噬菌体区域^[9]。虽

表 1. 醋酸菌蛋白组学研究汇总
Table 1. Summaries of proteome research in acetic acid bacteria

Organism	Techniques	Proteins identified	Functions involved	References
<i>A. aceti</i> and <i>G. suboxydans</i>	2-DE	8 spots	NA	Lasko et al. ^[18]
<i>A. aceti</i>	2-DE	50 spots	Membrane-associated processes	Steiner et al. ^[19]
<i>A. aceti</i>	2-DE, NH ₂ -terminal	1	TCA cycle	Nakano et al. ^[20]
<i>A. aceti</i>	2-DE, NH ₂ -terminal	1	Efflux systems	Nakano et al. ^[21]
<i>A. pasteurianus</i>	2D-DIGE, MS/MS	53	Protein folding, stress response, oxidation-reduction processes, metabolic processes, protein biosynthesis and translation, membrane modifications	Andrés-Barrao et al. ^[13]
<i>K. spp.</i>	2D-DIGE, MS/MS	32	Metabolic processes, stress response, protein folding, oxidation-reduction processes and biosynthetic processes	Andrés-Barrao et al. ^[15]
<i>A. pasteurianus</i>	2-DE, MS/MS	26	Oxidoreductase activity, stress response, energy or protein metabolism, membrane modifications, cofactors	Wang et al. ^[16]

然这些区域的存在导致了醋酸菌基因组的不稳定并对醋酸菌的选育和保存工作产生不利的影响,但是也可能增强了菌株在不同生境中的适应性。这预示着不同醋酸菌所具有的耐酸特性与基因组特征及遗传变化相关。Wang 等在比较分析了 2 株 *A. pasteurianus* 基因组后,发现了醋酸菌的氨基酸代谢、尿素循环^[22]。在大肠杆菌中谷氨酸、赖氨酸代谢对于细菌适应低 pH 环境发挥着重要作用,大肠杆菌可以将谷氨酰胺转变为谷氨酸并释放氨以中和胞内过低的 pH,从而达到适应酸性环境的目的^[23-25]。因此 Wang 等推测其可能对醋酸菌的耐酸性具有重要贡献,但是和大肠杆菌细胞内完全一样的氨基酸代谢途径目前尚未在醋酸菌中找到实证。另外,尿素循环已被验证在一些微生物适应酸性环境的过程中具有重要作用^[26],而醋酸菌基因组中众多脲酶基因的发现则预示着尿素循环在醋酸菌的耐酸中发挥着相同的作用。依赖 PQQ 乙醇脱氢酶是醋酸菌氧化乙醇生成醋酸的关键酶,文献报道其活性对细胞耐酸性有直接贡献^[14,27]。通过对巴氏醋杆菌 Ab3 基因组的分析,我们发现在该菌基因组序列中存在着众多的膜结合 PQQ-ADH^[16]。因此,综合分析现已公布的醋酸菌基因组,发现编码依赖 PQQ 乙醇脱氢酶(PQQ-ADH)的基因数量存在显著的属间差异(图 2),*Komagataeibacter* 含有最多的 PQQ-ADH 及 ADH 编码基因,而 *Gluconobacter* 和 *Gluconacetobacter* 的个别菌株则不含有此基因。另外,PQQ-ADH 也存在种间差异 *K. europaeus* 5P3 含有高达 6 个,而 *K. hansenii* ATCC 23769 和 *K. medellinensis* NBRC 3288 中则不存在此基因。*A. pasteurianus* 中 PQQ-ADH 数量较为稳定。因此,推测 PQQ-ADH 数量的差异可能是 *A. pasteurianus* 与 *K. europaeus* 产酸、耐酸能力差异的另一个关键所在^[22]。

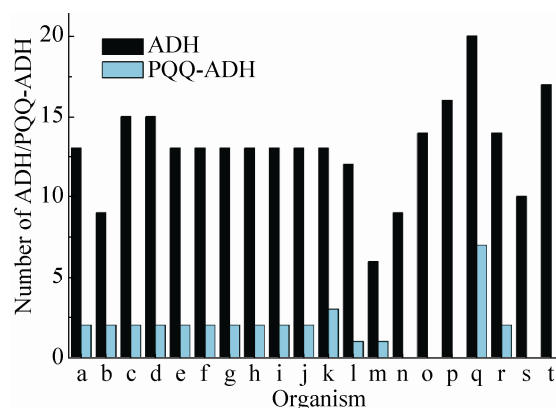


图 2. 醋酸菌基因组中乙醇脱氢酶编码基因数量

Figure 2. Gene numbers of alcohol dehydrogenases (ADHs) in acetic acid strains. a: *A. pasteurianus* Ab3, b: *A. pasteurianus* 386B, c: *A. pasteurianus* IFO 3283-01, d: *A. pasteurianus* IFO 3283-03, e: *A. pasteurianus* IFO 3283-07, f: *A. pasteurianus* IFO 3283-12, g: *A. pasteurianus* IFO 3283-22, h: *A. pasteurianus* IFO 3283-26, i: *A. pasteurianus* IFO 3283-32, j: *A. pasteurianus* IFO 3283-01-42C, k: *A. pasteurianus* NBRC 101655, l: *Ga. diazotrophicus* PA1 5, m: *G. oxydans* 621H, n: *G. oxydans* H24, o: *K. hansenii* ATCC 23769, p: *K. medellinensis* NBRC 3288, q: *K. europaeus* 5P3, r: *K. oboediens* 174Bp2, s: *K. rhaeticus* AF1, t: *K. xylinus* E25.

微生物也可以通过调整细胞膜组成中脂肪酸的含量变化来应对环境中温度、pH、渗透压以及其它一些压力条件的变化,不同酸度条件下醋酸菌中膜脂肪酸的变化研究发现细胞膜中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的组成及比例变化有助于醋酸菌适应高酸度环境^[14]。环丙烷脂肪酸是在环丙烷脂肪酸合成酶的作用下,S-腺苷蛋氨酸提供甲基,和细胞膜上的不饱和脂肪酸结合,将 C=C 双键环化而形成^[28]。基因组测序表明,巴氏醋杆菌 Ab3 含有环丙烷脂肪酸合成酶基因(*cfa*)。我们的研究表明在环丙烷脂肪酸合成酶基因的敲除后,巴氏醋杆菌 Ab3 的生长以及前中期产酸都受到明显的抑制,这与 *cfa* 基因的相关报道类似^[29]。在其它菌

中如大肠杆菌、乳酸菌等, 环丙烷脂肪酸的合成对细菌酸性环境下生存具有积极贡献^[30-31]。因此, 通过比较基因组学寻找与脂质合成代谢有关的新基因, 为耐酸性机制研究提供了预测的方向或目标, 将有助于发现或阐明醋酸菌耐酸性的新机制。

3 醋酸菌群体感应研究

群体感应(quorum sensing)是细菌根据外界环境的变化自发的产生和释放一些特定的信号分子, 同时感知其浓度的变化, 完成细胞与细胞间的交流, 从而调节微生物的群体行为^[32-33]。目前已发现的信号分子主要有 5 类: 酰基高丝氨酸内酯类(AHLs), 环肽类(DKPs), 4-羟基-2-烷基喹啉类(HAQs), diffusible signal factors (DSFs), 2 类自诱导物(AI-2)^[34] (图 3)。研究表明, 细菌群体感应与细胞毒力因子的产生、生物被膜的形成、游动性以及抗药性等生理特征密切相关^[35], 是细菌在种群水平上对环境因子的总体响应。目前, 细菌群体感应研究主要集中于条件致病细菌(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄菌、大肠杆菌)和食品腐败细菌方面(西瓦氏菌、沙雷氏菌等), 工业微生物报道

较少(主要在乳酸菌中)^[36-40]。变链球菌是重要的口腔致龋微生物, 其抗药能力的存在主要得益于生物膜的形成, 变链球菌中群体感应研究显示, QS 在变链球菌对外界氧化及酸压力的响应调节及生物膜形成中具有重要作用^[41-42]。在对致病菌幽门螺杆菌的研究中发现, 群体感应调节系统与幽门螺杆菌在宿主中的适应性生存特别是低 pH 环境的适应密切相关^[43-44]。在对乳酸菌的研究过程中发现, QS 调节系统与乳酸菌生长过程中细菌素的分泌以及抗菌肽的产生密切相关, 同时也在乳酸菌生长过程中特别是为应对外界不利环境所发生的细胞形态变化、粘附能力的改变方面扮演重要角色^[45-46]。而基因组分析表明, 某些醋酸菌的基因组上存在着类似 *luxI/luxR* 系统编码基因的同源序列。因此, 群体感应系统在醋酸菌的耐酸、产酸以及生长过程中可能发挥着重要调控作用。

首个被实证存在 QS 调控机制的醋酸菌是 *Ga. intermedius* (*K. intermedius*)。Iida 等^[47]首先报导了 *Ga. intermedius* (*K. intermedius*)的群体感应系统 *ginI/ginR*。基因 *ginI* 编码产生 AHLs 合成酶用于合成侧链长度为 C₁₀ 和 C₁₂ 的 3 种不同信号分子;

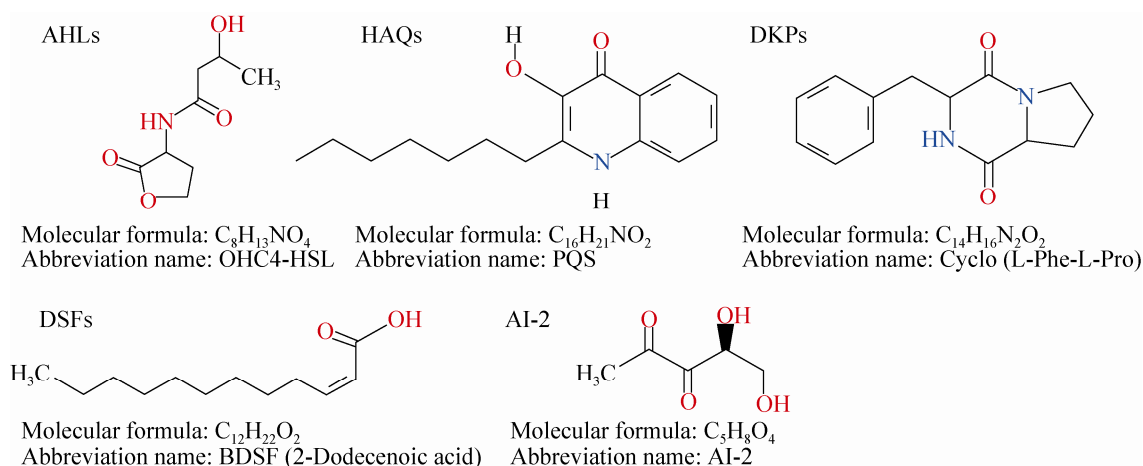


图 3. 信号分子结构示意图

Figure 3. Representatives of signal molecules involved in QS.

ginR 编码产生信号分子感知蛋白。*ginI* 或者 *ginR* 基因的敲除对菌株的生长和产酸能力具有明显的影响：*ginI* 或者 *ginR* 基因的敲除提高了醋酸菌在含有乙醇培养基中生长速度，而且和原始菌株相比敲除菌具有更高的醋酸产量及葡萄糖酸产量及更强的消泡能力^[47]。进一步分析还表明，一个属于 OmpA 家族的蛋白 GmpA 受到群体感应系统的调控，该蛋白在抑制醋酸氧化发酵中发挥着重要作用，同时 GmpA 又受 GinA 蛋白的直接调控^[48]。GinA 是一个含 89 个氨基酸序列的蛋白，其编码基因位于 *ginI* 基因下游，是醋酸菌中特有的蛋白，其表达受到群体感应系统调控。并且，GinA 蛋白还可调控许多其它基因的表达，如 *gltA* (a putative glycosyltransferase)，*pdeA* (cyclic-di-GMP phosphodiesterase)，*pdeB* (a putative phosphodiesterase/diguanylate cyclase) 和 *nagA* (putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase)^[49]。Nieto-Penalve 等在 *Ga. diazotrophicus* PAL5 培养基中检测到 8 种群体感应信号分子，确证了其 QS 调控机制。与葡糖醋杆菌属中用于醋酸发酵的菌株不同，该菌株是一种植物共生菌^[50]。菌株 PAL5 的全基因组测序表明，其中存在着众多的信号通路编码基因，包括 16 个 c-di-GMP 合成酶基因、14 个膜结合组氨酸激酶信号蛋白编码基因以及一套完整的 *luxI/luxR* 群体感应编码基因^[51-52]。群体感应系统的淬灭使得细胞内外的蛋白表达产生了明显的变化，表明这些群体感应系统可能在细菌的群体交流、宿主定居以及压力响应等方面发挥着重要作用(图 4)。

截至目前，关于醋酸菌 QS 调控制仅在 *Gluconacetobacter* 属中被发现确证，其它属种中有关群体感应的研究未见报导。这一方面由于醋酸菌非模式生物，有关醋酸菌的基因组数据相对

较少，且多为非完整基因组序列，这为醋酸菌中群体感应系统同源编码基因的发现和确定带来难度；另一方面，通过基因组学分析，我们发现醋酸菌基因组序列中虽然存在着 QS 编码基因的同源序列，但这些基因的功能多未注释或为假设蛋白，同时基因的相似度在不同属之间相似度较低；最后，醋酸菌基因组不稳定，具有较强的环境适应能力，不同的醋酸菌是否会产生特定的、不适合现有传统检测方法检测的信号分子用以群体交流，需要更多的实验进行验证和探索。总之葡萄糖醋杆菌 QS 的研究则为其它醋酸菌的研究提供了新的线索，随着醋酸菌基因组数据的不断完善和新基因功能的注释，醋酸菌耐酸性调控的信号通路将会得到阐明。

4 小结和展望

醋酸菌虽然被长期用作食醋发酵的生产菌种，但其不完全氧化特性在糖醇氧化生产及生物电池、生物传感器等领域也越来越受到广泛关注。对于食醋生产而言，醋酸菌耐酸机制的阐释对于高耐酸醋酸菌种选育以及醋酸发酵工艺的改进具有重要意义。但是，有关醋酸菌耐酸机制的研究依然存在较大的不确定性，尤其是目前已揭示的数据远不足以阐明其中的分子机制。(1) 蛋白组学研究鉴定的蛋白太少，不足以支持全局性的差异性轮廓分析，导致现有耐酸性机制认识的碎片化和概述化，难以形成完整的途径或过程；而大量未知蛋白需要进一步的功能注释。同时低丰度蛋白、膜蛋白、转录调控因子等检出甚少也限制了我们对醋酸菌响应调控高酸压力的认识。这有待于采用更有效如 iTRAQ 或 MRM 方法进行进一步的研究。(2) 群体感应系统为我们从信号通路角

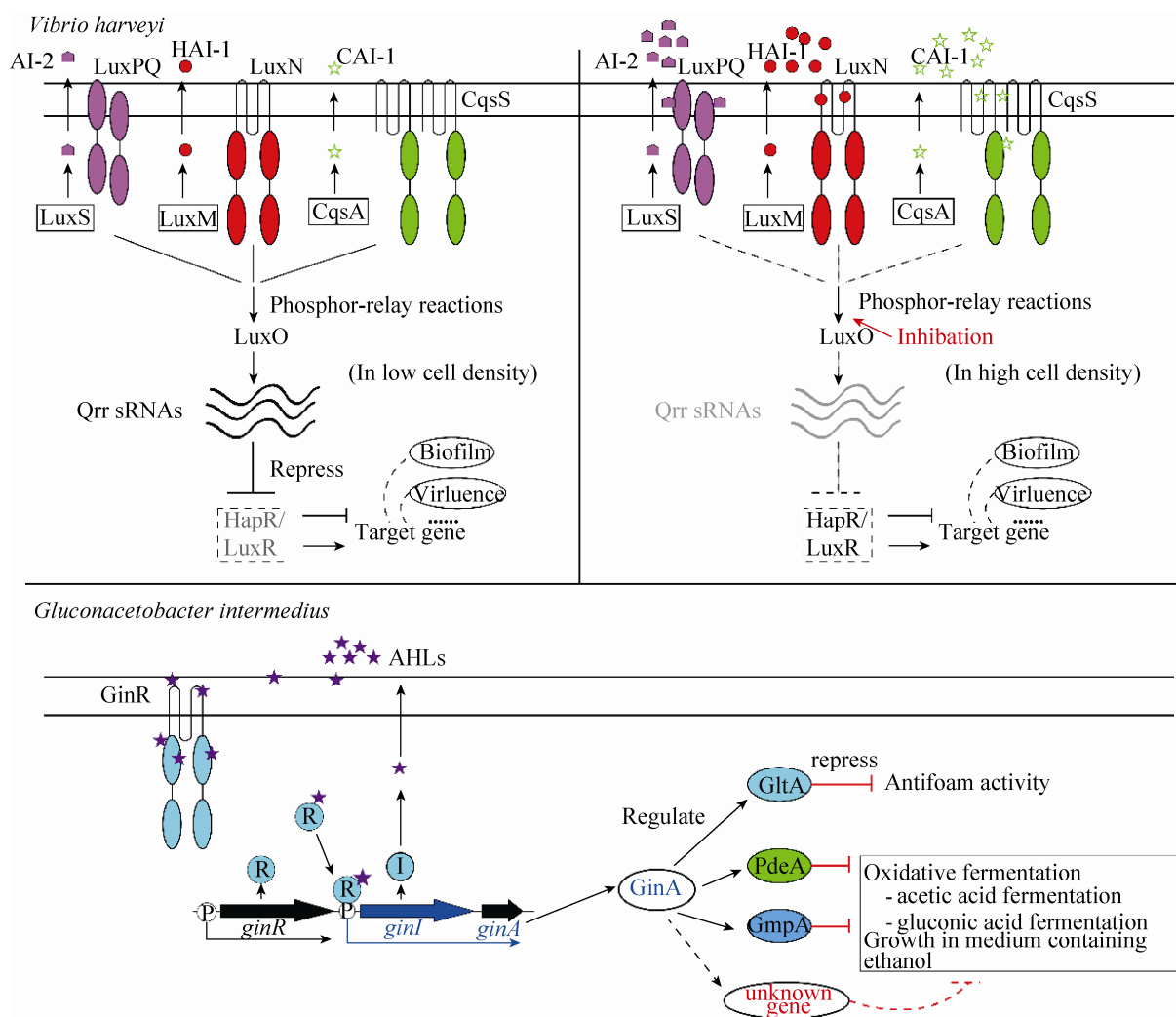


图 4. 醋酸菌中群体感应系统调控图

Figure 4. A putative schematic representation of quorum sensing regulating modules in the cell membrane of *Gluconacetobacter intermedius*, compared to that elucidated in *Vibrio harveyi*^[53–55]. In *Vibrio harveyi*, the LuxPQ, LuxN, CqsS represent three receptors, involved in different quorum sensing systems. In low cell density, the phosphate flows from receptors to LuxO, the Qrr sRNAs are transcribed and inhibit translation of LuxR (HapR) transcripts. At high cell density, in the presence of autoinducers, phosphate flow in the signal transduction pathway is reversed, the Qrr genes are not transcribed, *luxR* (*hapR*) mRNA is translated, and LuxR (HapR) protein is produced, and it initiates the quorum-sensing response. The analogous quorum sensing regulating systems are revealed in *Gluconacetobacter*, dotted line represent the process or pathway have not identified or discovered, signal pathways are supposed to play an important role in acetic acid adaptation and tolerance in acetic acid bacteria.

度研究醋酸菌的耐酸机制提供了思路，然而醋酸菌 QS 的研究主要集中在葡萄糖醋杆菌属中，且其内在的分子调控机制并未完全研究清楚。醋酸菌其它属种的群体感应分布情况、调控通路尚无新的研究实证。QS 对醋酸菌生理性状的调控还存在

较大疑问，需要从基因组和代谢组方面细致的研究(图 5)。(3) 与 QS 系统相类似的其它信号通路系统如双组份系统、毒素 - 抗毒素系统等已在其它细菌中被广泛阐述，其组成细菌主要的信号调控网络。其对醋酸菌醋酸发酵及高耐酸机制的关

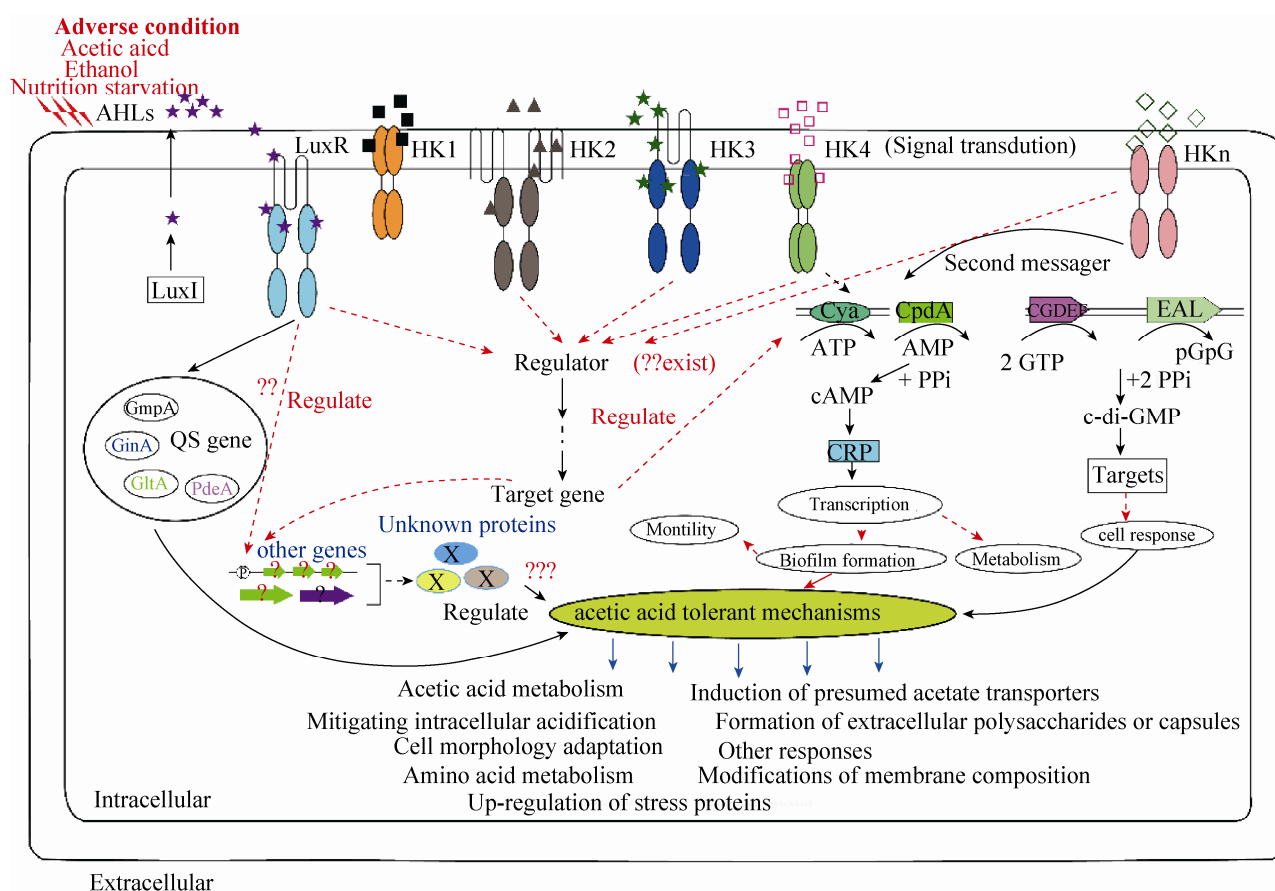


图 5. 醋酸菌中可能的群体感应系统模式及其与其它耐酸机制的潜在关联图

Figure 5. The possible model for the quorum sensing system in *G. intermedius* and other acetic acid bacteria. Potential relationship between QS system and other acetic acid tolerance mechanisms is presented. The red dotted line represent the potential relationship or the process have not been elucidated, the question mark means the process have not been identified. Histidine kinase receptors (HK) in cell membrane are involved in signal transduction.

联调控或许是除 QS 之外的新的研究思路。(4) 最后, 质膜是细胞内外交流的屏障和场所, 而其中的脂质轮廓也响应环境压力而适应赋予细胞膜生物功能。此前醋酸菌耐酸性机制主要集中于核酸、蛋白水平, 我们正在开展的醋杆菌脂质组学研究将是十分有益的补充。

参考文献

- [1] Illegheems K, De Vuyst L, Weckx S. Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. *BMC Genomics*, 2013, 14: 526.
- [2] Yamada Y, Yukphan P. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(1): 15–24.
- [3] Trček J, Barja F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 196: 137–144.
- [4] Sainz F, Navarro D, Mateo E, Torija MJ, Mas A. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 222: 40–47.
- [5] Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *Journal of Bioscience*, 2012, 37(2): 313–325.
- [6] Valera MJ, Torija MJ, Mas A, Mateo E. Cellulose production

- and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1349–1361.
- [7] Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst L. Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 10): 2277–2283.
- [8] Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, Muramatsu Y, Ochaikul D, Tanasupawat S, Nakagawa Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2012, 58(5): 397–404.
- [9] Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, Furuya N, Horikawa H, Harada T, Hirakawa H, Kuhara S, Matsushita K, Fujita N, Shirai M. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(17): 5768–5783.
- [10] Jojima Y, Mihara Y, Suzuki S, Yokozeki K, Yamanaka S, Fudou R. *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 6): 2263–2267.
- [11] Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, Uchimura T, Komagata K. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50 Pt 2: 823–829.
- [12] Trček J, Mira NP, Jarboe LR. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(15): 6215–6229.
- [13] 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.
- [14] 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. *Extremophiles*, 2007, 11(4): 627–635.
- [15] Andrés-Barrao C, Saad MM, Ferrete EC, Bravo D, Chappuis ML, Pérez RO, Junier P, Perret X, Barja F. Metaproteomics and ultrastructure characterization of *Komagataeibacter* spp. involved in high-acid spirit vinegar production. *Food Microbiology*, 2016, 55: 112–122.
- [16] Wang Z, Zang N, Shi JY, Feng W, Liu Y, Liang XL. Comparative proteome of *Acetobacter pasteurianus* Ab3 during the high acidity rice vinegar fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(8): 1573–1580.
- [17] 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.
- [18] Lasko DR, Schwerdel C, Bailey JE, Sauer U. Acetate-specific stress response in acetate-resistant bacteria: an analysis of protein patterns. *Biotechnology Progress*, 1997, 13(5): 519–523.
- [19] Steiner P, Sauer U. Proteins induced during adaptation of *Acetobacter aceti* to high acetate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5474–5481.
- [20] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 235(2): 315–322.
- [21] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Putative ABC transporter responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 497–505.
- [22] Wang B, Shao YC, Chen T, Chen WP, Chen FS. Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18330.
- [23] Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(11): 898–907.
- [24] Kanjee U, Houry WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 65–81.
- [25] Lu PL, Ma D, Chen YL, Guo YY, Chen GQ, Deng HT, Shi YG. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Research*, 2013, 23(5): 635–644.
- [26] Xiong LF, Teng JLL, Watt RM, Liu CH, Lau SKP, Woo PCY. Molecular characterization of arginine deiminase pathway in *Laribacter hongkongensis* and unique regulation of arginine catabolism and anabolism by multiple environmental stresses. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4469–4483.
- [27] Trček 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(3): 366–373.
- [28] Chang YY, Eichel J, Cronan JE Jr. Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(15): 4288–4294.

- [29] Broadbent JR, Oberg TS, Hughes JE, Ward RE, Brighton C, Welker DL, Steele JL. Influence of polysorbate 80 and cyclopropane fatty acid synthase activity on lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 334 at low pH. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(3): 545–553.
- [30] Budin-Verneuil A, Maguin E, Auffray Y, Ehrlich SD, Pichereau V. Transcriptional analysis of the cyclopropane fatty acid synthase gene of *Lactococcus lactis* MG1363 at low pH. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(2): 189–194.
- [31] Shabala L, Ross T. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H^+ and enhanced ability to extrude H^+ . *Research in Microbiology*, 2008, 159(6): 458–461.
- [32] Nunes-Alves C. Microbiome: taking advantage of quorum sensing. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 252.
- [33] Wang MZ, Schaefer AL, Dandekar AA, Greenberg EP. Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2187–2191.
- [34] Rajput A, Kaur K, Kumar M. SigMol: repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D634–D639.
- [35] Nickzad A, Lépine F, Déziel E. Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128509.
- [36] Ge JP, Fang BZ, Yuan TT, Ping WX. Quorum-sensing behavior of *Lactobacillus paracasei* HD1.7. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(11): 1561–1567. (in Chinese)
葛菁萍, 房保柱, 苑婷婷, 平文祥. 副干酪乳杆菌 HD1.7 群体感应行为. *微生物学报*, 2011, 51(11): 1561–1567.
- [37] Liu L, Tan XJ, Jia AQ. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 271–278. (in Chinese)
刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系. *微生物学报*, 2012, 52(3): 271–278.
- [38] Rizzello CG, Filannino P, Di Cagno R, Calasso M, Gobbetti M. Quorum-sensing regulation of constitutive plantaricin by *Lactobacillus plantarum* strains under a model system for vegetables and fruits. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(2): 777–787.
- [39] Yin H, Deng YF, Wang HF, Liu WG, Zhuang XY, Chu WH. Tea polyphenols as an antivirulence compound disrupt quorum-sensing regulated pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16158.
- [40] Zhao AF, Zhu JL, Ye XF, Ge YY, Li JR. Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 230: 73–80.
- [41] Wen ZT, Burne RA. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2682–2691.
- [42] Huang Z, Meric G, Liu Z, Ma R, Tang Z, Lejeune P. LuxS-based quorum-sensing signaling affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17(1): 12–19.
- [43] Rader BA, Campagna SR, Semmelhack MF, Bassler BL, Guillemin K. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6109–6117.
- [44] Rader BA, Wreden C, Hicks KG, Sweeney EG, Ottemann KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 9): 2445–2455.
- [45] Fujii T, Ingham C, Nakayama J, Beerthuyzen M, Kunuki R, Molenaar D, Sturme M, Vaughan E, Kleerebezem M, de Vos W. Two homologous Agr-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(23): 7655–7665.
- [46] Maldonado-Barragán A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 130(1): 35–42.
- [47] Iida A, Ohnishi Y, Horinouchi S. Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via *N*-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(7): 2546–2555.
- [48] Iida A, Ohnishi Y, Horinouchi S. An OmpA family protein, a target of the GinI/GinR quorum-sensing system in *Gluconacetobacter intermedius*, controls acetic acid fermentation. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(14): 5009–5019.
- [49] Iida A, Ohnishi Y, Horinouchi S. Identification and characterization of target genes of the GinI/GinR quorum-sensing system in *Gluconacetobacter intermedius*. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 9): 3021–3032.
- [50] Nieto-Peñalver CG, Bertini EV, de Figueroa LIC. Identification of *N*-acyl homoserine lactones produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultured in complex and synthetic media. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(7): 615–622.
- [51] Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L,

- Magalhães V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro MM, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simão T, Macedo J, Valadão A, Dreschel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, de Souza Filho G, Flores VMQ, Ferreira B, Branco A, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel L, Macedo J, Alves-Ferreira M, Sachetto-Martins G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco AB, Carvalho D, Lery L, Bisch P, Rössle SC, Ürményi T, Pereira AR, Silva R, Rondinelli E, von Krüger W, Martins O, Baldani JJ, Ferreir PCG. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 2009, 10: 450.
- [52] Bertini EV, Peñalver CGN, Leguina AC, Irazusta VP, de Figueroa LIC. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 possesses an active quorum sensing regulatory system. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(3): 497–506.
- [53] Ng WL, Perez LJ, Wei YZ, Kraml C, Semmelhack MF, Bassler BL. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(6): 1407–1417.
- [54] Yang Q, Defoirdt T. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(4): 960–968.
- [55] van Kessel JC, Ulrich LE, Zhulin IB, Bassler BL. Analysis of activator and repressor functions reveals the requirements for transcriptional control by LuxR, the master regulator of quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *MBio*, 2013, 4(4): e00378–13.

Advances in acid resistant mechanism of acetic acid bacteria and related quorum sensing system

Kai Xia, Junli Zhu, Xinle Liang*

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Abstract: Acetic acid bacteria (AAB) are obligately aerobic Gram-negative bacteria. Known for their ability to oxidize ethanol to acetic acid and robust tolerance to acetic acid, AAB have been widely used in industrial vinegar fermentation. Besides the incomplete oxidative ability, investigation of their resistance mechanisms to acetic acid is intriguing and crucial for high titer vinegar production. In this review, we evaluated a variety of resistant pathways involved in carbohydrate metabolism, protein metabolism, lipid metabolism, and stress response based on genomics and proteomics investigations in AAB. Specifically, the discovery in modules related to quorum sensing (QS) system in *Komagataeibacter* species and the emerging genome data of AAB opens a new window to screen acid resistance regulatory networks, which may promote industrial strain breeding and fermentation optimizing. We reviewed the latest research progress of quorum sensing in acetic acid bacteria based on the brief introduction of genomic and proteomic studies.

Keywords: acetic acid bacteria, quorum sensing, signal molecule, acetic acid tolerance mechanism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171745) and by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY15C200006)

*Corresponding author. Tel: +86-571-8807024; E-mail: dbiot@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 7 June 2016; Revised: 20 July 2016; Published online: 23 September 2016