

# 巴氏醋杆菌高酸度醋发酵过程的能量代谢分析

亓正良 杨海麟 夏小乐 王武 余晓斌\*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】初步分析了 *Acetobacter pasteurianus* CICIM B7003-02 在醋酸发酵过程中的能量代谢状况, 通过强化细胞能量代谢水平以提升菌株高酸发酵的产酸强度。【方法】探明 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 在高酸度醋发酵的不同阶段中三羧酸循环底物含量、乙醇呼吸链酶活及能量代谢酶基因的转录水平等代谢特点, 分析用于醋酸发酵的产能代谢途径及其作用。【结果】发现 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 在醋酸发酵初期, 主要通过苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸途径产能。进入醋酸快速积累阶段, 乙醇呼吸链为主要供能代谢途径。发酵后期苹果酸/琥珀酸回补途径配合乙醇呼吸链供能。基于上述研究, 采取添加琥珀酸和苹果酸强化细胞产能, 促进高酸度醋发酵强度。【结论】能量供给影响醋杆菌耐酸能力和醋酸生产能力。确定乙醇呼吸链为醋酸发酵的主要供能系统。强化细胞产能手段可达到提高醋酸发酵强度的目的。

**关键词:** 巴氏醋杆菌, 高酸度醋发酵, 能量代谢调节

## Analysis of energetic metabolism of *Acetobacter pasteurianus* during high acidic vinegar fermentation

QI Zheng-Liang YANG Hai-Lin XIA Xiao-Le WANG Wu YU Xiao-Bin\*

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

**Abstract: [Objective]** We are aiming to analyze the energy metabolism of *A. pasteurianus* CICIM

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z314); 江苏省创新工程项目(No. JUDCF11009); 江南大学博士创新资助项目(No. JUSRP111A25); 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31301540)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918167; 信箱: xbyu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-08-15; 接受日期: 2013-10-09

B7003-02 during high acidic vinegar fermentation so that we can identify the targets to enhance the energy metabolism for vinegar productivity improvement. **[Methods]** Tricarboxylic acid cycle metabolism, alcohol respiratory chain enzyme activity and relative transcriptional level of enzyme-coding genes in energy metabolism pathways were investigated during the high acidic vinegar fermentation by B7003-02. **[Results]** We have characterized the bacterial energy metabolism during high acidic vinegar fermentation. Malic/succinic acid feedback pathway is the major route for energy supply at the beginning of fermentation, and alcohol respiratory chain plays the major role in providing energy to cells during the major acetification phase. Both malic/succinic acid feedback pathway and the alcohol respiratory chain supply energy when fermentation approaches its final stage. **[Conclusion]** Energy supply influences vinegar productivity, the supplementation of malic acid and succinic acid can strength the malic/succinic acid feedback pathway and improve vinegar productivity.

**Keywords:** *Acetobacter pasteurianus*, High acidic vinegar fermentation, Energy metabolism

高酸度食醋是指总酸含量大于 9% (*M/V*) 的发酵醋。当前, 因菌种、技术、设备等方面限制我国大部分厂家仅能生产总酸含量在 3.5%–6.0% 的发酵醋<sup>[1-2]</sup>。与普通醋相比, 高酸度醋具有杀菌力强、保鲜效果好、节约运输费用和降低成本等诸多优点, 市场优势日趋明显<sup>[3-4]</sup>。醋酸菌是食醋生产的主要用菌。大量研究证实醋酸菌把乙醇不完全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 3 种酶构成的乙醇呼吸链中传递, 最终与细胞质中的  $H^+$  反应生成  $H_2O$ <sup>[5-7]</sup>。醋酸菌这种乙醇代谢方式又被称为“乙醇呼吸”。醋酸菌可能通过这种特殊呼吸方式快速产生能量, 满足发酵过程中的能量需求。

食醋发酵中醋酸菌所面临的最大限制因素是醋酸。高浓度的醋酸很容易通过细胞膜渗透进入细胞质, 对菌体生长及代谢产生不利影响。目前, 醋酸菌耐酸机制还没彻底探明。已报道研究发现了 *Acetobacter* 和 *Gluconoacetobacter* 中的一些耐酸分子机制: (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<sup>[8-9]</sup>;

(2) 醋酸同化机制<sup>[10]</sup>; (3) 可能将醋酸泵出的 ABC 转运机制<sup>[11]</sup>; (4) 通用抗逆机制<sup>[12]</sup>。当前报道的耐酸机制大多需要消耗 ATP 以实现醋酸的耐受, 因此高效快速的能量供应是醋酸菌在高酸发酵环境中进行正常生理代谢的重要保障。

液态深层醋酸发酵采用纯种发酵, 周期短, 产酸高, 生产能力强, 因优势显著而逐渐被国内生产厂家所采用<sup>[13-14]</sup>。本文以实验室诱变得到的—株产高酸巴氏醋酸杆菌为基础进行液态高酸度醋发酵能量代谢研究。实验首先以 NCBI 数据库中已报道与实验用菌高度同源的 *A. pasteurianus* IFO 3283-01 (16S rRNA 基因相似度超过 99%) 基因为模板, 通过 KEGG 数据构建巴氏醋酸杆菌主要产能代谢途径模型。然后分析醋酸发酵过程中产能代谢特点寻找发酵中主要的产能途径, 通过强化产能提高醋酸发酵强度和菌株的耐酸能力。

## 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、

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、无水乙醇、冰醋酸等试剂, 购于国药集团; 葡萄糖、琥珀酸、苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、富马酸和醋酸等标准品、三磷酸腺苷二钠盐、Ubiquione 2 (Q<sub>2</sub>), 购于 Sigma 公司; 荧光定量 PCR 相关试剂, 购于上海生工生物公司; 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:** 实验用菌为 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02, 由生产菌 *A. pasteurianus* CICIM B7003 (恒顺万通酿造厂惠赠, 其 16S rRNA 基因在 GenBank 数据库的 Accession numbers 为 KC462438) 经紫外诱变获得。诱变菌可发酵终浓度达 100 g/L 的高酸度醋。

**1.1.3 培养基:** (1) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 10, 调 pH 6.5, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 后加无水乙醇至终浓度为 24。(2) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6, MgSO<sub>4</sub> 0.4, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后根据实验设计加无水乙醇及食品级冰醋酸至一定浓度。(3) 固体平板(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 10, 琼脂粉 20, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 冷却至 60 °C 左右, 加入无水乙醇至终浓度为 32, 摇匀后倒平板。

**1.1.4 荧光定量 PCR 引物:** 引物序列 (Primer 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:

*sdhA*-F: 5'-GCGAACTGGAGCACTTTGGT-3',  
*sdhA*-R: 5'-GCTTGAGGCACTGCTGATACA-3';  
*cyto*-F: 5'-GGGTCTGGCTTGTGGTATCTT-3',  
*cyto*-R: 5'-GTGCCATCAGTTTACGGGTGT-3';  
*nadh*-F: 5'-TTTCTTACCTTCCCTGTTACCC-3',  
*nadh*-R: 5'-ATAAATCAGCCCGATACCCAC-3';  
*aldh*-F: 5'-TTACCCGTTCTGATGATGTGCT-3',  
*aldh*-R: 5'-ATCGTATGGTTTGCCGTCTTC-3';

*mgo*-F: 5'-CCATTATTTCCCGCTTTCTC-3',  
*mgo*-R: 5'-ACGTCACCTTCTGGGTACTGTAGG-3';  
*adh*-F: 5'-CGGTGAATATGTCTGGCACTTC-3',  
*aldh*-R: 5'-ATCTGCTGAACCGAGGTGTAAT-3'。

## 1.2 培养方法

**1.2.1 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 (无乙醇添加), 在 170 r/min、30 °C 恒温条件下摇床培养 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, 可以进行种子制备使用。

**1.2.2 种子制备:** 活化好种子按 10% (V/V) 接种量接入种子培养基, 170 r/min、30 °C 恒温振荡培养 24 h 作为发酵用种子。

**1.2.3 摇瓶发酵:** 将制备好种子按 10% (V/V) 接种量接入 250 mL 三角瓶, 内含 45 mL 新鲜发酵培养基, 初始醋酸浓度分别为 0、10、20、30、40 和 50 g/L, 转速 170 r/min, 30 °C 恒温培养一定时间。

**1.2.4 平板培养:** 将涂布菌液的平板放入恒温培养箱 30 °C 培养 60 h。

## 1.3 荧光定量 PCR

取培养一定时间的发酵液收集约 0.1 g 湿菌体放入液氮中备用。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 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书迅速反转录第一链 cDNA 后稀释备用, 反应体系为: 5  $\mu$ L 总 RNA (0.2 g/L), 1  $\mu$ L Random Primer p(dN)<sub>6</sub> (0.2 g/L) 和 5  $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O。以 23S rRNA 基因为管家基因, 将稀释后的 cDNA (50 mg/L) 上机检测, 反应体系和反应条件如表 1 和表 2 所示。

表1 荧光定量 PCR 反应体系

反应体系组成 Reaction component	浓度 Concentration	添加体积 Volume ( $\mu\text{L}$ )
SYBR Green qPCR Master Mix	稀释 2 倍	10
Primer F	10 $\mu\text{mol/L}$	1
Primer R	10 $\mu\text{mol/L}$	1
ddH <sub>2</sub> O		7
Template (cDNA)	50 mg/L	1
Total		20

表2 荧光定量 PCR 条件

荧光定量 PCR 仪 Thermal cycler	维持 Initial steps	溶解 Melt	延伸 Anneal/Extend
时间 Time (s)	120	10	40
温度 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	95	95	60
循环次数 Cycles	0	40	40

相对转录水平计算公式如下:

$$\Delta C_t(\text{gene}) = C_t(\text{housekeeping gene}) - C_t(\text{gene}) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_t(g_s - g_c) = \Delta C_t(\text{sample}) - \Delta C_t(\text{control}) \quad (2)$$

$$\text{Relative transcriptional level} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3)$$

公式(1)中,  $C_t(\text{housekeeping gene})$ 和  $C_t(\text{gene})$ 分别表示管家基因和目的基因的  $C_t$ 值(Threshold cycle value),  $\Delta C_t(\text{gene})$ 表示目的基因对管家基因的  $C_t$ 校准值;公式(2)中,  $\Delta C_t(\text{sample})$ 和  $\Delta C_t(\text{control})$ 分别表示检测组和对照组中目的基因的  $C_t$ 校准值,  $\Delta\Delta C_t(g_s - g_c)$ 表示检测组与对照组目的基因  $C_t$ 校准值的差值(Comparative critical threshold value)。利用公式(1)–(3)可求出检测组相对于对照组目的基因的转录水平。

#### 1.4 细胞膜蛋白提取

取一定量醋酸发酵液  $8\,000\times g$  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 KPB 缓冲液重悬(每克湿细胞加 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

$8\,000\times g$  离心 10 min, 取上清于  $100\,000\times g$  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),  $-20\,^{\circ}\text{C}$  储存备用。整个提取过程在  $4\,^{\circ}\text{C}$  条件下进行。Brandford 法测蛋白浓度。

#### 1.5 分析方法

**1.5.1 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,  $10\,000\times g$  离心 10 min, 取上清用  $0.22\,\mu\text{m}$  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 mm $\times$ 7.8 mm; 示差遮光检测器; 流动相: 5 mmol/L 稀硫酸溶液; 柱温:  $60\,^{\circ}\text{C}$ ; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。根据峰面积计算发酵液中葡萄糖含量。

**1.5.2 有机酸含量:** 取待测发酵液与 10% (M/V) 三氯乙酸按 1:1 (V/V)比例混合,  $10\,000\times g$  离心 10 min, 取上清用  $0.22\,\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 滤液用日立 L-2000 高效液相色谱仪测定滤液中的多种有机酸含量。色谱条件: AMINEX HPX-87H (300 mm $\times$ 7.8 mm, Bio-Rad 公司); 紫外检测器, 245 nm; 流动相: 5 mmol/L 稀硫酸溶液; 柱温:  $60\,^{\circ}\text{C}$ ; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。把琥珀酸、苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、富马酸和醋酸标准品混合后作外标(混标), 根据峰面积计算发酵液中有有机酸含量。

**1.5.3 总酸含量:** 取 1 mL 发酵液于 50 mL 去离子水中, 加 3 滴 1% (M/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) =  $C_{\text{NaOH}} \times V \times 60$ 。其中  $C_{\text{NaOH}}$  为 NaOH 标准溶液浓度 (mol/L),  $V$  为滴定所用 NaOH 标准溶液体积 (mL)。

**1.5.4 乙醇(乙醛)脱氢酶活性:** 参照 Wood 氏法<sup>[15]</sup>, 取 0.5 mL McIlvaine 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,

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 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 °C 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 光密度。在 25 °C、pH 4.0 条件下, 1 min 氧化 1  $\mu\text{mol}$  乙醇(乙醛)的酶量为一个酶活力单位。

**1.5.5 ATP 水解酶活性:** 透性细胞制备参考 Matsumoto 等<sup>[16]</sup>的方法。0.1 mL ATP (30 mmol/L)+ 0.4 mL 反应液 (3.75 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、100 mmol/L KCl、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)置于试管中, 30 °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%, *M/V*)终止反应, 6 000 $\times$ 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<sup>[17]</sup>。根据磷( $P_i$ )标准曲线求出其含量, 酶的活性单位为  $\mu\text{mol} (P_i)/[\text{g} (\text{cells})\cdot\text{min}]$ 。

**1.5.6 细胞色素 *o* 末端氧化酶活性:** 末端氧化酶活性以酶对  $\text{Q}_2\text{H}_2$  的氧化能力表示。总反应体系 (1 mL): 50 mmol/L KPB (pH 6.5), 30  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Q}_2\text{H}_2$ , 0.02% (*V/V*) Tween 20, 细胞膜蛋白。反应在 25 °C、275 nm 波长下进行测定。吸光值对  $\text{Q}_2\text{H}_2$  的毫摩尔消光系数为 15.25。

本研究中, 所有实验都重复测定了 3 次。数据统计用 SAS 8.01 统计分析软件分析(SAS Institute, USA), 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 巴氏醋杆菌主要产能相关途径的模型

利用 16S rRNA 基因寻找 NCBI 数据库中与

*A. pasteurianus* CICIM B7003-02 同源的菌株<sup>[17]</sup>。选择 *A. pasteurianus* IFO 3283-01 作为参考菌株, 参考该菌代谢途径信息构建实验菌产能有关的主要代谢途径。如图 1 所示, CICIM B7003-02 菌株存在 3 条主要的产能途径(虚线方框部分): (1) 乙醇呼吸链产能途径——由细胞膜上乙醇脱氢酶(Adh)、乙醛脱氢酶(Aldh)和细胞色素 *o* 末端氧化酶(Cyt *o*) 3 种酶调控, 通过不完全氧化乙醇产乙酸同时与呼吸链偶联释放能量; (2) 三羧酸循环(TCA)偶联有氧呼吸产能途径——巴氏醋酸杆菌 TCA 循环其琥珀酰辅酶 A 到琥珀酸和苹果酸到草酰乙酸的代谢通路的酶不存在, 要通过其它途径的回补来运行并释放能量; (3) 苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸产能途径——通过某些氨基酸回补途径(天冬氨酸、脯氨酸)产生苹果酸和琥珀酸, 后经细胞膜上苹果酸:辅酶 Q 脱氢酶(Mqo)和琥珀酸脱氢酶(Sdh)作用产能。这 3 种途径在醋酸发酵中可能不是同时起作用, 研究醋酸菌醋酸发酵中所用的产能途径具有生理研究和生产应用双重意义。

### 2.2 巴氏醋杆菌醋酸发酵中两种主要底物的产能分析

巴氏醋酸杆菌可利用葡萄糖和乙醇来提供生长和维持代谢所需能量, 为了研究 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 醋酸发酵中能量代谢特点, 本文首先研究不同初始酸度条件下(分别含 10、30 和 50 g/L 醋酸)该菌株对葡萄糖和乙醇代谢的情况(为了保证研究所得结论在不同初始酸度发酵条件下的普遍适用性, 不需要把 pH 调整至相同)。组(1)中无乙醇和乙酸添加, 其它组中初始乙醇浓度均为 40 g/L, 结果如表 3、4 所示。组(1)的细菌生长迅速, 培养 48 h 时已达到  $0.95 \pm 0.04$  g/L 干菌体, 葡萄糖平均消耗速率( $r_{\text{glucose}}$ )为  $0.143 \pm 0.007$  g/(L·h), 菌体干重对葡萄糖得率系数( $Y_{X/g}$ )为  $0.138 \pm 0.020$  g/g。组(2)–(5)菌体量生成偏

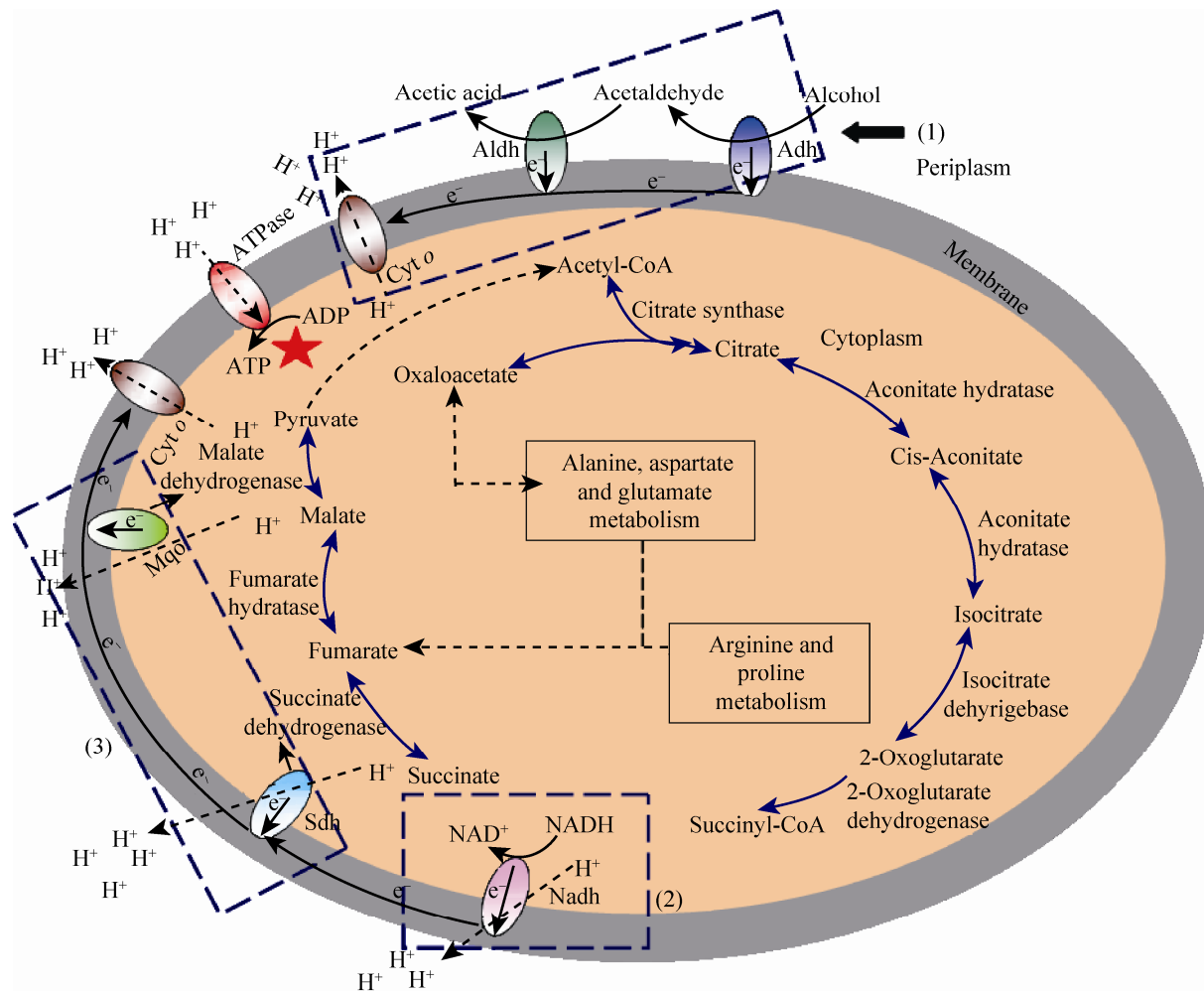


图 1 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 产能偶联代谢途径模型

Fig. 1 Proposed scheme for energy production coupled metabolic pathways of *A. pasteurianus* CICIM B7003-02

表 3 不同初始酸度下 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 对葡萄糖和乙醇的利用

Table 3 Metabolism of glucose and alcohol of *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 during vinegar fermentation with different initial acidity

组别 Group	时间 Time (h)	初始糖浓度 Initial glucose (g/L)	终了糖浓度 Final glucose (g/L)	初始醇浓度 Initial ethanol (g/L)	终了醇浓度 Final ethanol (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	$Y_{X/g}$ (g/g)
(1)0a/0e	48	10.35±0.09	3.47±0.03	0	0	0.95±0.04	0.138±0.012
(2)0a/4e	48	10.23±0.04	7.82±0.01	39.06±0.03	0.29±0.03	0.52±0.02	0.214±0.007
(3)1a/4e	48	10.37±0.04	7.87±0.02	39.42±0.04	0.57±0.02	0.54±0.06	0.216±0.006
(4)3a/4e	60	10.56±0.07	9.35±0.02	39.02±0.05	0.24±0.07	0.46±0.03	0.383±0.001
(5)5a/4e	120	10.49±0.03	10.03±0.03	42.38±0.03	0.06±0.02	0.19±0.02	0.413±0.002

注: 0a: 培养基中醋酸浓度为 0 g/L; 0e: 培养基中乙醇浓度为 0 g/L;  $Y_{X/g}$ : 菌体对葡萄糖得率系数。

Note: 0a: The initial acidity of medium is 0 g/L; 0e: The initial ethanol concentration of medium is 0 g/L;  $Y_{X/g}$ : Yield of biomass versus glucose.

少, 最大干菌体重由  $0.52\pm 0.02$  g/L 降到  $0.19\pm 0.02$  g/L。菌体消耗葡萄糖量明显减少, 组(2)  $r_{\text{glucose}}$  降为  $0.051\pm 0.003$  g/(L·h), 组(5)  $r_{\text{glucose}}$  仅为  $0.004\pm 0.001$  g/(L·h)。同时, 随初始醋酸浓度升高  $Y_{X/g}$  也逐渐增大, 由  $0.216\pm 0.006$  升到  $0.413\pm 0.002$ 。然而, 在醋酸菌耐受酸度范围内醋酸的存在并没有减少细胞对乙醇的利用, 发酵终了培养基中乙醇基本被消耗尽。

为进一步分析发酵中利用的主要产能底物, 对该菌利用乙醇和葡萄糖的产能速率进行计算。组(1)中利用葡萄糖产能的平均产能速率( $H_{\text{glucose}}$ )为  $2.32\pm 0.11$  kJ/(L·h)。而组(2)–(5)中  $H_{\text{glucose}}$  由  $0.81\pm 0.04$  降为  $0.06\pm 0.01$  kJ/(L·h), 乙醇氧化代谢成为主导的供能方式, 其中( $H_{\text{alcohol}}/H_{\text{total}}$ )值均大于 90%, 特别是组(5)中( $H_{\text{alcohol}}/H_{\text{total}}$ )已达到  $98.42\%\pm 0.10\%$ 。醋酸发酵中细胞利用乙醇氧化提供能量的比率明显高于葡萄糖, 综上分析可知乙醇是醋酸发酵中主要产能底物。

### 2.3 高酸度醋发酵过程中的能量代谢状况

**2.3.1 醋酸发酵过程主要有有机酸含量的变化:** 为了对苹果酸/琥珀酸回补途径进行分析, 实验对发酵中醋酸、苹果酸和琥珀酸浓度变化进行检测。如图 2 所示, 发酵初期(0–24 h), 平均产酸速

率( $r_{\text{acid}}$ )仅为  $0.31$  g/(L·h), 苹果酸和琥珀酸浓度都有所上升。发酵 24 h 后进入醋酸快速积累阶段, 24–48 h 之间  $r_{\text{acid}}$  达到  $0.87$  g/(L·h)。期间苹果酸和琥珀酸浓度先快速下降, 然后在  $0.7\text{--}1.0$  g/L 浓度范围内波动变化, 此时苹果酸和琥珀酸的生成与消耗维持在一个相对稳定的状态。发酵后期(72 h), 乙醇浓度降到  $9.4$  g/L, 细胞氧化乙醇的活力下降, 从而导致产酸速率降低。当发酵到 96 h 时, 苹果酸和琥珀酸又被快速消耗, 一方面可以辅助乙醇呼吸链供能维持细胞在高酸环境下的正常代谢, 另一方面还可以回补 TCA 和磷酸戊糖途径(HMP)等途径。

**2.3.2 高酸度醋发酵中乙醇呼吸链的酶活变化:** 乙醇呼吸链是醋酸菌氧化乙醇产醋酸的主要代谢途径<sup>[18–19]</sup>。图 3 显示了发酵中乙醇呼吸链酶的活性变化。发酵初期乙醇呼吸链酶活较低, Adh、Aldh 和 Cyt o 分别为  $0.93\pm 0.06$ 、 $0.71\pm 0.03$  和  $1.62\pm 0.11$  U/mg。随着发酵进行, 酶活性逐渐升高, 发酵 48 h 时 Adh 和 Aldh 活性分别达到  $4.37\pm 0.16$  和  $3.42\pm 0.09$  U/mg。发酵后期酶活性整体下降, 72 h 时, 3 种酶的比活分别降为  $3.05\pm 0.33$ 、 $2.01\pm 0.24$  和  $3.67\pm 0.18$  U/mg。其中 Cyt o 活性下降幅度相对较少, 分析可能因为 Cyt o 是乙醇呼吸链和苹果酸/

表 4 不同初始酸度下 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 利用葡萄糖和乙醇的产能分析  
Table 4 Analysis of bio-energy production through glucose and alcohol oxidation for *A. pasteurianus* CICIM B7003-02

	$r_{\text{alcohol}}$ [g/(L·h)]	$r_{\text{glucose}}$ [g/(L·h)]	$H_{\text{glucose}}$ [kJ/(L·h)]	$H_{\text{alcohol}}$ [kJ/(L·h)]	$(H_{\text{alcohol}}/H_{\text{total}})$ (%) <sup>5</sup>
(1)0a/0e	0	$0.143\pm 0.007$	$2.32\pm 0.11$	0	0
(2)0a/4e	$0.77\pm 0.11$	$0.051\pm 0.003$	$0.79\pm 0.07$	$8.25\pm 0.04$	$91.22\pm 0.05$
(3)1a/4e	$0.81\pm 0.02$	$0.052\pm 0.002$	$0.81\pm 0.04$	$8.68\pm 0.03$	$91.46\pm 0.14$
(4)3a/4e	$0.65\pm 0.07$	$0.021\pm 0.004$	$0.31\pm 0.01$	$6.96\pm 0.08$	$95.73\pm 0.09$
(5)5a/4e	$0.35\pm 0.04$	$0.004\pm 0.001$	$0.06\pm 0.01$	$3.75\pm 0.02$	$98.42\pm 0.10$

注:  $r_{\text{alcohol}}$ : 乙醇平均消耗速率;  $r_{\text{glucose}}$ : 葡萄糖平均消耗速率;  $H_{\text{glucose}}$ : 单位体积发酵液单位时间消耗葡萄糖平均释放的能量;  $H_{\text{alcohol}}$ : 单位体积发酵液单位时间消耗乙醇平均释放的能量; ( $H_{\text{alcohol}}/H_{\text{total}}$ ): 乙醇氧化释放能量占总能量释放的百分比。

Note:  $r_{\text{alcohol}}$ : Average ethanol consumption rate;  $r_{\text{glucose}}$ : Average glucose consumption rate;  $H_{\text{glucose}}$ : Average energy release rate with glucose consumption;  $H_{\text{alcohol}}$ : Average energy release rate with ethanol consumption; ( $H_{\text{alcohol}}/H_{\text{total}}$ ): Energy release ratio of ethanol versus glucose.

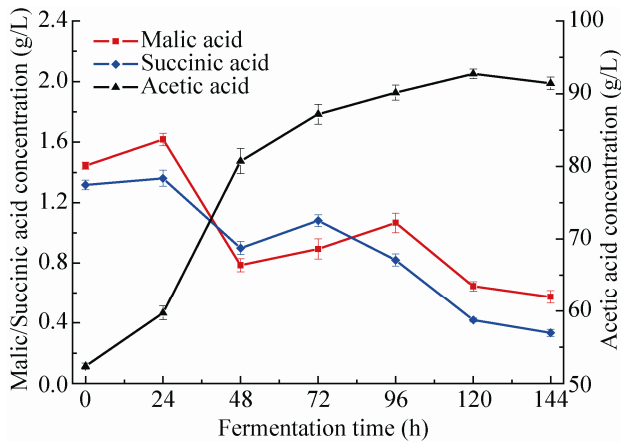


图2 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 摇瓶高酸发酵过程

Fig. 2 High acidic vinegar fermentation by *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 in the shaking flask

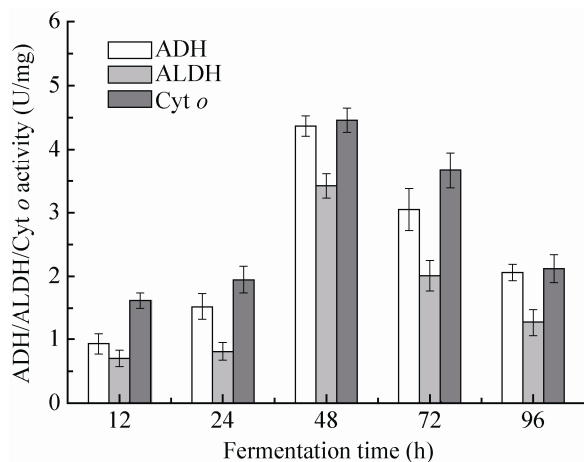


图3 高酸发酵中乙醇呼吸链酶活性

Fig. 3 Alcohol respiratory chain enzyme activity during high acidic vinegar fermentation

琥珀酸回补途径共用的末端氧化酶, 所以乙醇呼吸链酶活降低对其影响相对较小。发酵后期菌体需要消耗大量能量来耐受高浓度醋酸, 乙醇呼吸链供能速率降低, 为保证足够能量供应细胞加快氧化苹果酸和琥珀酸来辅助提供能量。

**2.3.3 高酸发酵中 ATP 酶的酶活变化:** ATP 酶可水解 ATP 释放能量, 其活性可反映细胞能量供给水平。实验对发酵中细胞 ATP 酶活性进行检测,

结果如图 4 所示。发酵初期 ATP 酶活水平较低, 仅为  $1.03 \pm 0.13 \mu\text{mol } (P_i)/[\text{g (cells)} \cdot \text{min}]$ 。进入醋酸快速积累阶段 ATP 酶活快速提升, 发酵 48 h 时, 酶活达到  $4.65 \pm 0.31 \mu\text{mol } (P_i)/[\text{g (cells)} \cdot \text{min}]$ 。发酵后期, 虽然乙醇呼吸链活性明显降低, 但是 ATP 酶仍维持相对较高的活性水平, 发酵 72 h 时的 ATP 酶活为  $4.47 \pm 0.22 \mu\text{mol } (P_i)/[\text{g (cells)} \cdot \text{min}]$ 。说明发酵过程中菌体细胞需要消耗大量能量以实现在不利环境中的生存。

**2.3.4 巴氏醋杆菌产能代谢途径酶合成基因转录水平分析:** 醋酸抑制醋酸菌许多基因的转录与表达<sup>[20-21]</sup>。为了验证醋酸发酵中起作用的供能代谢途径, 实验对 3 种产能代谢途径中主要酶合成基因的转录水平进行分析, 以发酵 12 h 基因转录水平为参照, 检测发酵 48 h 时对应基因的相对转录水平(图 5)。随着发酵进行乙醇呼吸链酶基因相对转录水平显著提高, *adh* 和 *aldh* 的转录水平均为发酵初期的 4 倍左右, *cyto* 转录水平是发酵初期的 5.38 倍; 苹果酸/琥珀酸氧化代谢基因 *sdh* 和 *mgo* 相对转录水平也显著升高, 分别为初始水平的 3.98 和 6.8 倍; 然而 *nadh* 的转录受到抑制, 相对转录水平仅为初始水平的 0.22。由以上结果可

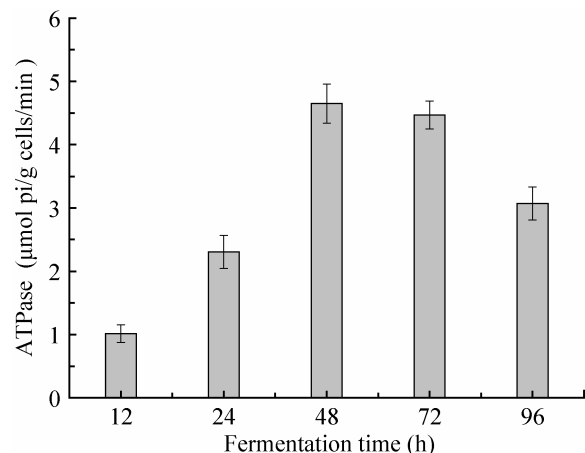


图4 高酸发酵中 ATP 酶活性

Fig. 4 ATPase activity during high acidic vinegar fermentation



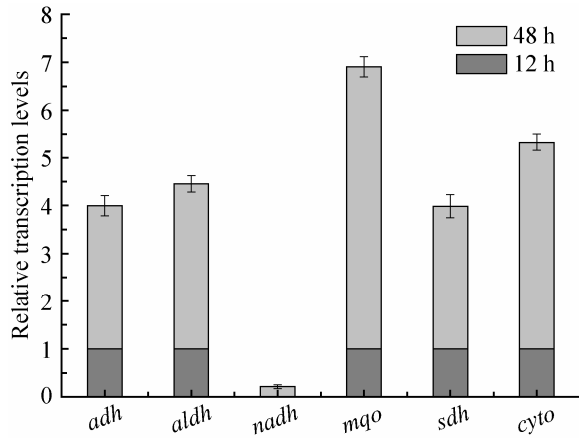


图5 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 产能代谢途径酶的相对转录水平

Fig. 5 Relative transcriptional level of enzyme-coding genes in energy pathways of *A. pasteurianus* CICIM B7003-02

知: 醋酸发酵中巴氏醋杆菌以乙醇呼吸链和苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸这两个代谢途径产能, 乙醇呼吸链是醋酸发酵阶段主要能量来源。因为该菌的 TCA 循环途径不完整, 无法循环运转, 只能产生少量中间代谢物, 所以在高酸环境中细胞不可能依靠此途径提供能量, 从而导致 *nadh* 转录水平降低。

### 2.4 产能代谢对细胞耐酸能力的影响

醋酸菌通过某些耐酸机制实现严峻环境下的生长和代谢。耐酸机制大多需要消耗能量, 因此保证能量供应是醋酸菌在不利环境中生存的保障。研究醋酸发酵中起作用的产能代谢途径有助于通过强化醋酸菌产能促进高酸度、高强度醋酸发酵。实验以含初始醋酸 50 g/L 发酵培养基为基础分别添加葡萄糖、乙醇、苹果酸和琥珀酸至 15、40、2、2 g/L, 接入生长良好的种子后恒温振荡培养, 分析活菌浓度变化(图 6)。添加葡萄糖的实验组活菌浓度迅速下降, 培养 24 h 时菌体量已经降到  $10^5$  CFU/mL, 30 h 时稀释  $10^5$  涂布平板没有单菌落形成。添加苹果酸和琥珀酸的组中醋酸菌较快适应高酸环境, 培养 12 h 菌浓度有所

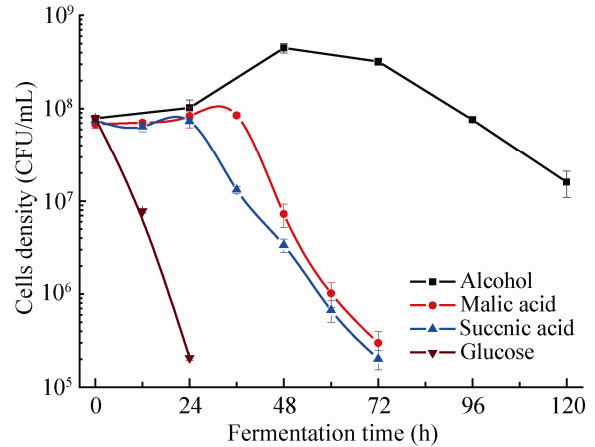


图6 不同培养条件下 *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 生长曲线

Fig. 6 Growth curves of *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 in different culture conditions

升高, 但 24 h 后活细胞数快速下降。添加乙醇的实验组有一个相对长的适应阶段, 24 h 后活菌浓度快速上升, 48 h 时活菌浓度达到最大(约  $4.47 \times 10^8$  CFU/mL), 此后活菌体量也开始下降。结果进一步说明了该菌株主要依赖乙醇呼吸链产能来保障细胞对醋酸的抗性, 苹果酸/琥珀酸回补产能途径在细胞耐酸耗能方面起辅助作用。

### 2.5 强化产能代谢以促进高酸发酵

**2.5.1 能量代谢中间物促进高酸发酵:** 实验尝试添加能量代谢中间产物来加强细胞供能水平提高发酵强度。选择苹果酸、琥珀酸、富马酸、柠檬酸和  $\alpha$ -酮戊二酸为添加物进行高酸发酵试验, 添加量均为 2 g/L。如图 7 所示, 添加苹果酸和琥珀酸对醋化作用有明显促进作用, 发酵 24 h 时已积累 65 g/L 醋酸, 发酵终了醋酸浓度超过 95 g/L。添加苹果酸和琥珀酸可能诱导 Mgo 和 Sdh 表达量提高, 促进苹果酸和琥珀酸代谢, 发酵初期为细胞提供更多的能量加快细菌对环境的适应。同时还可强化对 TCA 和 HMP 途径代谢回补促进生长。柠檬酸对醋化作用有一定促进作用, 发酵结束时醋酸积累量达到 94 g/L, 但在发酵初期添加对醋

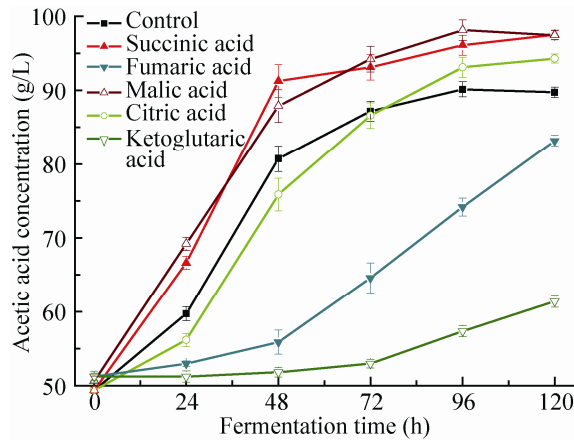


图7 不同产能偶联途径代谢中间物对高酸发酵影响  
Fig. 7 Influence of precursors of energy metabolic coupled pathways on high acidic vinegar fermentation

酸发酵有抑制作用。因为发酵液中柠檬酸含量较少, 实验中添加柠檬酸浓度过量, 可能对细胞代谢产生抑制作用, 随着细胞代谢的进行, 柠檬酸被消耗, 从而使抑制解除细胞得以进行正常代谢。添加富马酸的实验组经过一个较长的延滞期后进入快速醋化阶段, 可能因为过量富马酸存在不利于苹果酸/琥珀酸回补代谢进行, 当胞内含量回复正常水平, 细胞开始正常代谢。然而, 添加 $\alpha$ -酮戊二酸明显抑制了醋化作用的进行, 说明细胞对 $\alpha$ -酮戊二酸需求量非常少, 过量添加严重抑制巴氏醋酸杆菌代谢。

**2.5.2 中间代谢产物对产能相关酶基因转录水平的影响:** 为验证添加苹果酸和琥珀酸可促进苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸产能途径运行, 以不添加任何中间产物的高酸发酵 24 h 和 48 h 细胞的 *mco* 和 *sdh* 转录水平为参照, 分别对添加苹果酸和琥珀酸发酵 24 h 和 48 h 的细胞对应基因的转录水平进行研究。如图 8 所示, 添加苹果酸的实验组发酵 24 h 和 48 h 的 *mco* 转录水平分别为参照组的 1.82 和 1.11 倍, 添加琥珀酸的实验组 *sdh* 转录水平分别是参照组的 1.64 和 1.18 倍。说明添加这两种中间产物在发酵初期(0-24 h) 明显促进相应基因的转录, 以加快细胞能量供

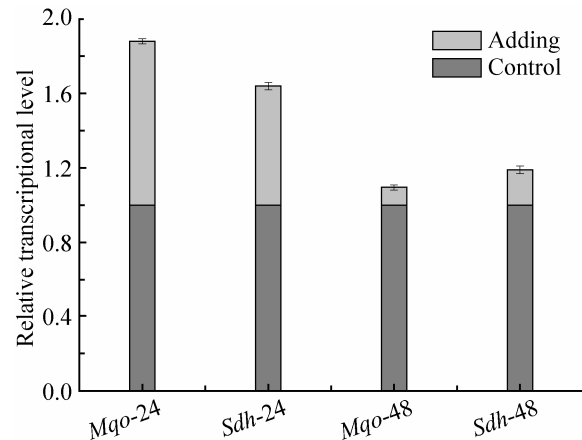


图8 添加能量代谢途径前体对代谢途径酶的转录水平影响

Fig. 8 Relative transcription level of enzymes in energy metabolism pathways of *A. pasteurianus* CICIM B7003-02

给。进入醋酸快速积累阶段, 乙醇呼吸链作为主要产能途径, 导致 *mco* 和 *sdh* 基因的转录水平下降, 但相比对照组仍有一定提高。

### 3 结论

*A. pasteurianus* CICIM B7003-02 在醋酸发酵初期主要利用苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸途径产能, 乙醇呼吸链在此阶段起辅助供能作用。醋酸快速积累阶段以乙醇呼吸链氧化乙醇作为主要供能途径, 苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸途径起辅助作用。发酵后期细胞氧化乙醇的活力下降, 苹果酸/琥珀酸回补偶联有氧呼吸途径产能效应有所回升。通过添加苹果酸和琥珀酸人为强化产能途径可有效提高巴氏醋杆菌醋酸发酵强度和酸度: 醋酸积累明显快速促进, 发酵 24 h 时已积累 65 g/L 醋酸, 醋酸发酵终浓度超过 95 g/L。

### 参考文献

- [1] 林森, 蒋予箭, 国建娜, 等. 醋酸发酵工艺条件优

- 化的研究[J]. 中国酿造, 2008, 26(1): 39-40.
- [2] 赵春燕, 王鹏, 王淑琴, 等. 食醋液态快速发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2008, 26(1): 35-38.
- [3] 周秉辰. 论高酸度食醋的生产[J]. 中国酿造, 1991, 9(4): 26-28.
- [4] 王琳, 胡平, 杨立苹. 浅谈高浓度醋的应用及市场前景[J]. 江苏调味品, 2004, 21(5): 5-8.
- [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*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177: 5048-5055.
- [6] Thurner C, Vela C, Thony-Meyer L, et al. Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*[J]. 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[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86: 1257-1265.
- [8] Okumura H, Uozumi T, Beppu T. Biochemical characteristics of spontaneous mutants of *Acetobacter acetii* deficient in ethanol oxidation[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49: 2485-2487.
- [9] 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*[J]. 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[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(1): 54-59.
- [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: 4346-4352.
- [12] Okamoto-Kainuma A, Yan W, Kadono S, et al. Cloning and characterization of *groESL* operon in *Acetobacter acetii*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94: 140-147.
- [13] 宫名字. 对液态深层发酵制醋工艺过程中问题的研究[J]. 中国调味品, 1997, 8: 7-11.
- [14] 解欣伟. 产高醋酸菌的筛选及小型醋酸发酵实验[J]. 中国调味品, 2002, 7: 24-25.
- [15] Wood WA, Fetting RA, Hertlein BC. Gluconic dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*[J]. Methods in Enzymology, 1962, 5: 287-291.
- [16] Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93(1): 109-113.
- [17] 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.
- [18] 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: 1257-1265.
- [19] Treek J, Toyama H, Czuba J, et al. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ dependent ADH in acetic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70: 366-373.
- [20] Andrés-Barrao C, Saad MM, Chappuis ML, et al. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(6): 1701-1717.
- [21] 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.