产细菌纤维素菌株中间葡糖醋杆菌的分离与发酵条件优化

苏俊霞[1,2]，陆震鸣[*2]，王宗敏[1,2]，史劲松[2]，陆茂林[3]，许正宏[1,2]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122；
3. 江苏省微生物研究所，江苏 无锡 214063）

摘要：从中国传统固态发酵食醋醋醅中分离出5株产细菌纤维素(BC)的菌株，经生理生化特征及16S rDNA序列分析，它们均属于中间葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter intermedius*)，其中编号为1-17的菌株初始产量较高。应用扫描电镜技术(SEM)和傅里叶红外光谱技术(FT-IR)分析了BC结构特征。采用单因素研究了温度、培养时间、碳源、初始pH对BC合成的影响。确定菌株1-17最适温度为35 ℃，发酵时间为7 d，甘油和葡萄糖为最适碳源，最适初始pH为6.0，乳酸根离子和钙离子能够促进BC的合成。通过培养条件优化使得细菌纤维素产量从初始的(3.90±0.08) g/L增加到(7.90±0.19) g/L。

关键词：细菌纤维素；中间葡糖醋杆菌；鉴定；发酵条件；优化
中图分类号：TQ 920.1　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)02—0145—06

Isolation and Culture Optimization of Bacterial Cellulose Producing Strain *Gluconacetobacter intermedius*

SU Junxia[1,2]，*LU Zhenming*[*2]，*WANG Zongmin*[1,2]，*SHI Jinsong*[2]，*LU Maolin*[3]，*XU Zhenghong*[1,2]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Institute of Microbiology Co.Ltd., Wuxi 214063, China）

Abstract: Five bacterial cellulose (BC) producing strains were isolated from solid-state fermentation cultures of traditional Chinese vinegar, and identified as *Gluconacetobacter intermedius* based on their physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA sequence analysis. Strain 1-17 could produce more BC then the others. Furthermore, surface features and chemical structure of BC were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, respectively. Effects of temperature, time, carbon sources and initial pH on BC production were tested. The optimal temperature for strain 1-17 was 35 ℃, and the fermentation time was 7 d. Glucose and glycerol were the optimal carbon sources, and the

收稿日期：2014-01-18
基金项目：国家863计划项目(2012AA021301, 2013AA102106)；国家自然科学基金项目(31271922)；国家固态酿造工程技术中心开放课题(2011B2211, GCKF201109)。
* **通信作者**：陆震鸣(1981—)，男，江苏无锡人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事传统酿造工艺方面的研究。
E-mail: zmlu@jiangnan.edu.cn

optimal initial pH was 6.0. Both lactate and calcium could promote the synthesis of BC. The yield of BC was improved from (3.90±0.08) g/L to (7.90±0.19) g/L under the optimal conditions.
Keywords: bacterial cellulose, *Gluconacetobacter intermedius*, identification, fermentation condition, optimization

细菌纤维素(Bacterial Cellulose,简称 BC)与植物纤维素具有相同的化学组成,由葡萄糖基通过 β-1,4-D 葡萄糖苷键连接。但 BC 的形态和超分子结构与植物纤维素不同,属于生物纳米纤维材料[1]。BC 与植物纤维素相比有以下几个优点:高化学纯度,纤维超细,良好的持水性和透气性,高结晶度,极佳的形状维持能力和抗撕力,良好的生物适应性,可利用广泛的原料进行合成[2]。BC 在食品[3],医用材料如人造皮肤、血管[4],造纸,高级音响设备振动膜,纳米复合材料等领域具有广泛的应用前景[5-6]。

能合成 BC 的微生物有葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter* (*G.*)),假单孢杆菌属(*Pseudomonas*),土壤杆菌属(*Agrobacterium*),无色杆菌属(*Achromobacter*),气杆菌属(*Aerobacter*),产碱杆菌属(*Alcaligcncs*),固氮菌属(*Azotobacter*),八叠球菌(*Sarcina*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)等。目前产量较高的主要为葡糖醋杆菌属,包括 7 个种,即 *G. xylinus*、*G. medellensis*、*G. hansenii*、*G. sacchari*、*G. intermedius*、*G. kombuchae*,和 *G. swingsii*[7-9],BC 产量从 1.33~7.2 g/L 不等,多数低于 5 g/L[8]。

BC 的微生物合成与菌株及其培养条件有关[10],目前已从水果、蔬菜、饮料等不同来源分离获得 BC 生产菌株[11]。作者拟从中国传统发酵食醋醋醅中分离获得高产 BC 的菌株,并采用单因素试验方法对发酵条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 发酵醋醅:取自于镇江香醋酿造车间;基因组提取试剂盒:购自上海捷瑞生物工程有限公司;用于扩增及克隆所用试剂:均购自 Takara 公司;引物:由上海生物工程有限公司合成。

1.1.2 培养基

1) 富集培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 3,D-甘露醇 25,121 ℃灭菌 20 min。

2) 分离培养基(g/L):D-葡萄糖 20,蛋白胨 8,酵母粉 5,轻质碳酸钙 7,琼脂粉 12;pH 6.8,121 ℃灭菌 20 min,冷却到 50 ℃后加乙醇 5 mL/L[12]。

3) HS 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 5,酵母粉 5,柠檬酸 1.15,磷酸氢二钠 4;pH 6.0、121 ℃灭菌 20 min,冷却后加无水乙醇 20 mL/L[13]。

4) 生理生化基础培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 3,轻质碳酸钙 10,琼脂粉 15;pH 6.8、121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器 生化培养箱:上海博讯医疗仪器有限公司;显微镜:上海光学仪器厂;水浴锅:上海精宏实验设备有限公司;PCR 仪:美国 Bio-Rad 公司;电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;精密 pH 计:上海 Mettler-Toledo;日立 S-4800 冷场发射扫面电镜:日本日立公司;Nicoleft Nexus 470 FT-IR 红外光谱仪:美国热电尼高力公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选 取 10 g 醋醅装入混有玻璃珠和 90 mL 富集培养基的 500 mL 三角瓶中,30 ℃、200 r/min 过夜,菌悬液用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释(10^{-1},10^{-2},10^{-3},10^{-4},10^{-5})。取 200 μL 合适梯度稀释液涂布在分离培养基上,30 ℃培养 3~5 d。挑取具有透明圈的单菌落划线培养,得到纯菌。挑取单菌落在 HS 培养基中 30 ℃、180 r/min 培养 2 d,对能够产生凝胶状物质的菌株进行进一步研究鉴定。纯菌株用终体积分数 20%的甘油于-80 ℃保藏。

1.2.2 生理生化特性研究 革兰氏染色,过氧化氢酶实验,氧化酶实验,耐乙醇性(体积分数 5%、10%、15%),耐乙酸性(体积分数 3%、5%),惟一碳源(20 g/L)(乙醇,葡萄糖,果糖,麦芽糖,山梨醇,甘露醇,甘油),耐 30 g/dL 葡萄糖,耐温性(40、45 ℃)。

1.2.3 分子鉴定 分离纯化后的菌株在 HS 培养基中 30 ℃、200 r/min 培养 2 d,用基因组提取试剂盒提取细菌基因组,并进行 16S rDNA 扩增,引物为 P_0(5′-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 P_6(5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′)[14]。将 PCR 产物纯化后与 PMD-19-T 载体连接,转化大肠杆菌(JM109)感受态,阳性克隆交由上海生工测序,测序结果在 NCBI 中(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)进行

比对,并将序列提交至 GeneBank。

1.3 BC 结构分析

1.3.1 BC 膜处理 发酵结束后,将 BC 膜用自来水冲洗,之后用 0.1 mol/L NaOH 溶液于 80 ℃水浴 1 h,再用蒸馏水浸泡冲洗至 pH 中性,以除去 BC 膜中的菌体及残留的培养基。BC 膜处理后 80 ℃烘干,称质量。

1.3.2 BC 化学结构分析 菌株在 HS 培养基中于 30 ℃静置培养 5 d,BC 膜处理后冷冻干燥,进行红外测量。测量波数范围为 600~4 000 cm^{-1}。

1.3.3 BC 扫描电镜观察 菌株在 HS 培养基中于 30 ℃静置培养 5 d,将新鲜培养的 BC 膜切块,用 2.5%的戊二醛溶液固定,冷冻干燥,喷金,进行扫描电镜观察。

1.4 发酵条件优化

BC 的合成是一个好氧过程,其产量与发酵液体积和空气接触面积都有关系,本实验统一采用 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL,接种体积分数为 7%,每组实验做 3 个平行。

1.4.1 温度及发酵时间对 BC 合成的影响 将菌株接种于 HS 培养基中,在 25、28、30、33、35、37、40 ℃下分别培养 3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d。BC 处理后于 80 ℃烘干,称质量。选取最适温度和发酵时间作为以后实验的培养温度和培养时间。

1.4.2 碳源对 BC 合成的影响

1)葡萄糖质量浓度(10、20、30、40、50 g/L)对 BC 合成的影响。35 ℃下静置培养 7 d,选取 BC 产量最高的作为研究其它碳源的质量浓度。

2)碳源对 BC 生产的影响:单一碳源(30 g/L)分别是葡萄糖,蔗糖,果糖,甘露醇,甘油。复合碳源组合为葡萄糖(20 g/L)和蔗糖(10 g/L),葡萄糖(20 g/L)和果糖(10 g/L),葡萄糖(20 g/L)和甘露醇(10 g/L),葡萄糖(20 g/L)和甘油(10 g/L)。35 ℃静置培养 7 d,选取 BC 产量最高的碳源组合作为研究初始 pH 对 BC 合成的影响。

1.4.3 初始 pH 对 BC 生成的影响 培养基灭菌后,分别用盐酸、乙酸、乳酸调 pH 至 5.5、5.0、4.5、4.0、3.5、3.0。用氢氧化钠调 pH 6.5,6.0 作为对照。另外,培养基的初始 pH 6.0 时,向培养基中分别加入乳酸钙 4 g/L、乙酸钙 4 g/L 和乙酸钠 4 g/L 做为研究乳酸根离子、醋酸根离子和钙离子对 BC 合成的影响。

2 结果与讨论

2.1 BC 产生菌的分离筛选与鉴定

2.1.1 高产 BC 菌株的筛选 共有 5 株微生物能够合成 BC,它们在 HS 培养基中 30 ℃静置培养 14 d,BC 产量见图 1。其中菌株 1–17 合成 BC 的能力较强,BC 产量为(3.9±0.08) g/L,因此,将菌株 1–17 作为出发菌株对其进一步研究。

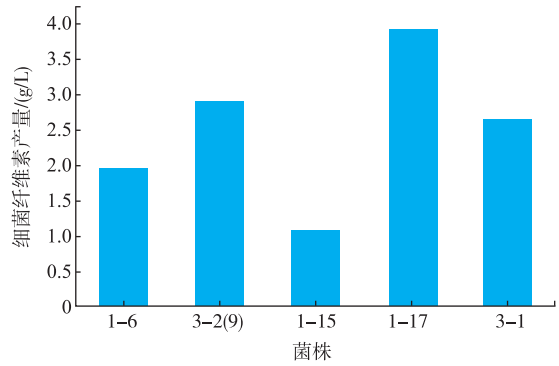


图 1 5 株产 BC 菌株在 HS 培养基中 30 ℃静置培养 14 d

Fig. 1 Five strains were cultured in HS medium 30 ℃ for 14 days

2.1.2 微生物生理生化特性 菌株 1–17 生理生化特性见表 1。

表 1 *G. intermedius* 1–17 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of *G. intermedius* 1–17

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏染色	–	体积分数 10%乙醇	+
H_2O_2 酶	+	体积分数 15%乙醇	–
氧化酶实验	+	体积分数 3%乙酸	+
能否产芽孢	否	体积分数 5%乙酸	–
菌落形态/颜色	边缘不规则/白色	乙醇	+
菌体形状	短杆状	葡萄糖	+
V–P	+	果糖	+
40 ℃	+	麦芽糖	+
45 ℃	–	山梨醇	+
30 g/dL 葡萄糖	–	甘露醇	+
体积分数 5%乙醇	+	甘油	+

注:“+”表示阳性或能够利用;“–”表示阴性或不能利用。

2.1.3 分子鉴定 经测序,5 株微生物的 16S rDNA 长 1 455 bp 左右,在 NCBI 中进行核酸同源性比对,发现与 *G. intermedius* 相似度达到 99%,用

Bioedit7.0 和 Maga5.0 软件构建系统发育树和 GeneBank 登录号见图 2。

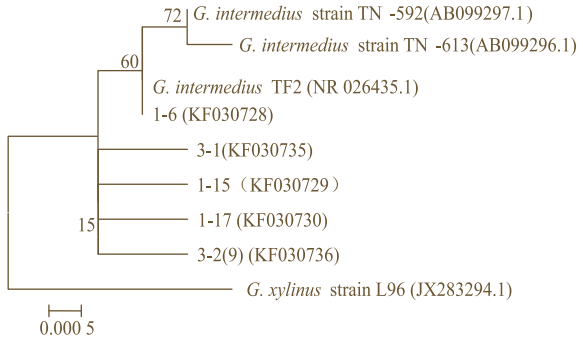


图 2　依据菌株 16S rDNA 基因序列用 neighbor–joining 方法构建的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of the strains according to 16S rDNA sequences based on the neighbor –joining method

2.2　BC 结构分析

2.2.1　BC 化学结构分析　图 3 为 *G. intermedius* 1–17 在 HS 培养基中所产 BC 的红外光谱图。3 342 cm^{-1} 处吸收峰为 O–H 的伸缩振动引起的，2 896、1 645 cm^{-1} 处的吸收峰分别由 C—H 和 C═O 键的伸缩振动引起[15]。1 500~1 200 cm^{-1} 处的多个吸收峰由 C—H 面内弯曲振动引起的，1 427、1 361 cm^{-1} 处吸收峰分别是由 CH_2 和 C—H 弯曲振动引起。其他一些峰如 1 336、1 315、1 280 cm^{-1} 处吸收峰分别由 O—H 键平面弯曲，CH_2 键摇摆振动和 C—H 弯曲引起的[7]。1 200~1 000 cm^{-1} 附近的峰主要是纤维素间的糖苷键和分子内的缩醛的 C—O 键的伸缩振动以及伯醇、仲醇 C—O 键的伸缩振动[8]，由此可见基本符合纤维素的特征性吸收。

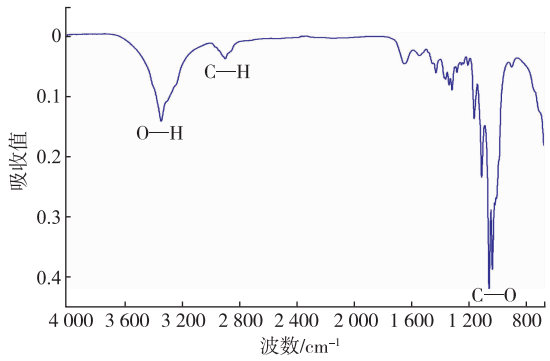


图 3　*G. intermedius* 1–17 所产 BC 膜红外光谱图

Fig. 3　FT–IR of BC film produced by *G. intermedius* 1–17

2.2.2　BC 膜扫描电镜观察　*G. intermedius* 1–17 所产 BC 电镜扫描见图 4。纤维丝交叉成不规则的网状，杆状的细胞包围在里面（图 4a），纤维素丝直接从菌体表面分泌出来（图 4b）。BC 膜表面（空气面）生长着大量的菌体（图 4c），静置培养时，新的菌体在 BC 表面生成，膜厚度的增加是因为在膜/气质界面产生新的纤维素层[16]。在 BC 膜内部靠液体面中也有菌体（图 4d），但菌体的两端或一端变得长而尖，有文献认为这些菌体并没有死亡而是处于休眠状态，在接种于新的培养基中它们能够继续生长[1]。

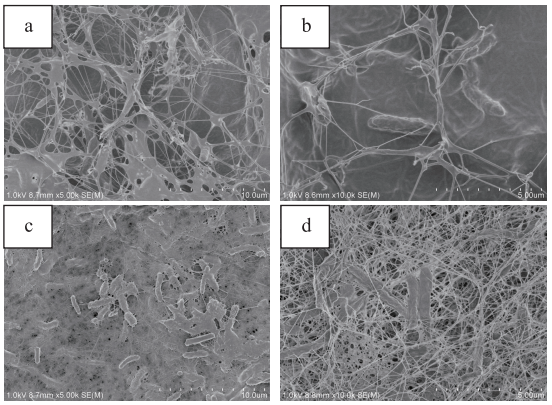


图 4　*G. intermedius* 1–17 所产 BC 膜扫描电镜观察

Fig. 4　SEM images of BC film produced by *G. Intermedius* 1–17

2.3　发酵条件的优化

2.3.1　温度及发酵时间对 BC 合成的影响　不同温度及发酵时间 BC 的产量见图 5。*G. intermedius* 1–17 能够在 25~40 ℃合成 BC，35 ℃时合成速率最高，其次是 37 ℃和 33 ℃，在 40 ℃下也能少量的合成 BC，由此可见该菌株是一株耐温菌株。BC 合成最适温度一般在 25~30 ℃之间，多数是 28 ℃和 30 ℃[1]。发酵前 5 天，BC 在 35 ℃下快速合成，之后合成速率下降，原因可能是 *G. intermedius* 1–17 在生长及合成 BC 的过程中会产生乙酸，使得培养基 pH 下降，以及培养基中营养物质的消耗引起的。*G. intermedius* 1–17 在 35 ℃发酵 7 d 就能达到最大值，为（4.18±0.05）g/L。

镇江香醋为我国典型的固态酿造食醋，具有数百年的历史，醋酸发酵阶段温度为 38~43 ℃[17]。作者首次从中国传统固态发酵食醋中分离出产 BC 的微生物[18]，其耐温特性可能与长期存在于 40 ℃左右的醋醅环境有关。

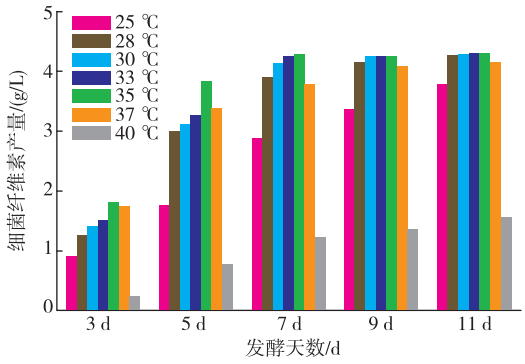


图 5　不同温度和发酵时间下 *G. intermedius* 1–17 的 BC 产量

Fig. 5　BC production by *G. intermedius* 1 –17 under different temperatures and culture time

2.3.2　碳源对 BC 合成的影响　培养基中不同葡萄糖质量浓度对 BC 合成影响见图 6。培养基葡萄糖质量浓度为 3 g/dL 时,BC 的产量最高,为(4.2±0.08) g/L。随着葡萄糖质量浓度的增加,培养基最终 pH 也不断降低。葡萄糖是合成 BC 常见的碳源,它不仅能为菌体生长代谢提供能量,也是 BC 合成的前体物质。葡萄糖质量浓度过低,不能为菌体生长以及 BC 的合成提供足够的能量,但葡萄糖质量浓度过高,菌体会将葡萄糖大量的氧化为乙酸,使培养基 pH 下降,从而不利于 BC 的合成。因此用 3 g/dL 糖质量浓度为基础研究其它碳源对 BC 合成的影响。

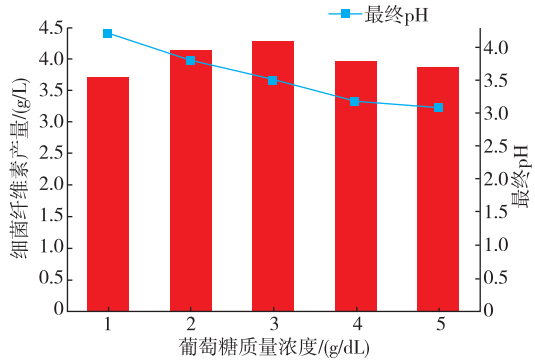


图 6　不同葡萄糖质量浓度对 BC 合成的影响及发酵液最终 pH

Fig. 6　Effect of different glucose concentrations on BC production and the final fermentation pH

G. intermedius 1–17 在含有不同碳源的培养基中合成 BC,结果见图 7。该菌能够很好的利用甘油(4.3±0.11) g/L 和葡萄糖(4.18±0.09) g/L 合成 BC。复合碳源更有利于 BC 的合成,其中葡萄糖和甘油组合产量最高,达到(5.04±0.06) g/L。本研究中,*G. intermedius* 1–17 不仅能够很好的利用葡萄糖而且能更好的利用甘油合成 BC,说明该菌利用廉价原料如粗甘油生产 BC 具有很好的应用前景。

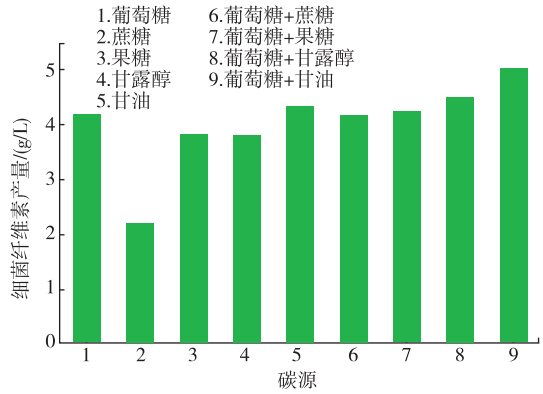


图 7　*G. intermedius* 1–17 利用不同的碳源合成 BC

Fig. 7　*G. intermedius* 1–17 cultured with different carbon sources

2.3.3　初始 pH 对 BC 合成的影响　*G. intermedius* 1–17 在不同的起始 pH 下合成 BC 结果见图 8。低 pH 能够抑制 BC 的合成,pH 越低,产量越低。BC 合成的最适 pH 与微生物本身的特性有关,一般为 pH 4~7。另外,用不同的酸调 pH,其 BC 产量是不同的。用乳酸调 pH,其产量比用盐酸和乙酸高,乙酸最低。培养基中含有乳酸根离子时该菌能耐低的 pH,在 pH 3.0 时,BC 的产量达到(4.1±0.09) g/L,乳酸根离子是作为能源物质而不是底物促进 BC 的合成[19]。乙酸根离子没有促进作用,用乙酸调 pH 以及培养基中加入乙酸钠,BC 的产量要比其他组低。钙离子也能促进 BC 的合成[5],培养基中加入乳酸钙 4 g/L,BC 产量达到(7.90±0.19) g/L;培养基中加入乙酸钙 4 g/L,BC 的产量为(6.50±0.11) g/L。

3　结　语

作者从中国传统发酵食醋醋醅中分离出 5 株产 BC 的菌株,经鉴定,5 株均为 *Gluconacetobacter intermedius*,其中 *G. intermedius* 1–17 具有较高的 BC 合成能力。*G. intermedius* 1–17 静置培养时产生的凝胶状物质经傅里叶红外光谱测定及扫描电镜观察,与已报道的 BC 相符;该菌能够在 25~40 ℃下合成 BC,最适温度为 35 ℃;该菌能够很好的利用甘

油和葡萄糖作为碳源来生产 BC，其中复合碳源比单一碳源更有利于 BC 的合成。低的 pH 能够抑制 BC 的合成，最适初始 pH 为 6.0。乳酸根离子和钙离子能够显著促进 BC 的合成。通过培养条件优化，*G. intermedius* 1-17 产 BC 能力从初始的（3.90±0.08）g/L 增加到（7.90±0.19）g/L。

参考文献：

[1] Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose—a masterpices of nature's arts [J]. **Journal of Materials Science**, 2000, 35: 261-270.

[2] Shoda M, Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production [J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2005, 10: 1-8.

[3] Shi Z, Zhang Y, Phillips G O, et al. Utilization of bacterial cellulose in food[J]. **Food Hydrocolloids**, 2014, 35: 539-545.

[4] Fontana J D, Souza A M D, Fontana C K, et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute [J]. **Journal Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1990, 24/25(1): 253-264.

[5] Hong F, Qiu K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2008, 72: 545-549.

[6] Orts W J, Shey J, Imam S H, et al. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites [J]. **Journal of Polymers and the Environment**, 2005, 13(4): 301-306.

[7] Castro C, Zuluaga R, Alvarez C, et al. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter genus*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2012, 89(4): 1033-1037.

[8] Yang Y, Jia J J, Xing J R, et al. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CIs26[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2013, 92: 2012-2017.

[9] Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2007, 57: 353-357.

[10] Dayal M S, Goswami N, Sahai A, et al. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter aceti* MTCC 2623[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2013, 94: 12-16.

[11] Aydin Y A, Aksoy N D. Utilization of vinegar for isolation of cellulose producing acetic acid bacteria [J]. **AIP Conference Proceedings**, 2010, 1247: 340-348.

[12] ller G S, Hertel C, Hammes W P. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2000, 50: 2013-2020.

[13] Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose[J]. **Cellulose Synthesis**, 1954, 58: 345-352.

[14] Cello F D, Bevivino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages[J]. **Applied and Environmental Microblology**, 1997, 63(11): 4485-4493.

[15] Sheykhnazari S, Tabarsa T, Ashori A, et al. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 86: 1187-1191.

[16] Borzani W, Souza S J D. Mechanism of the film thickness incerasing during the bacterial production cellulose on non-agitaded liquid media[J]. **Biotechnology Letters**, 1995, 17(11): 1271-1272.

[17] Xu W, Huang Z Y, Zhang X J, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. **Food Microbiology**, 2011, 28: 1175-1181.

[18] Wu J J, Gullo M, Chen F S, et al. Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars[J]. **Current Microbiology**, 2010, 60: 280-286.

[19] Naritomi T, Kouda T, Yano H, et al. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1998, 85(1): 89-95.