DOI:10.12441/spyswjs.20250409002 [文章编号] 1673-1689(2026)03-0023-10

多诱变技术强化木醋杆菌木糖代谢及细菌纤维素生物合成

阮 菁[1] 杨 杰[2] 刘庆国[1,3] 彭 欢[2] 张仁旭[2] 孙文俊[1*] 陈 勇[1,3]

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院,江苏 南京 211816; 2. 北方化学工业股份有限公司,四川 泸州 646605; 3. 南京高新工大生物技术研究院有限公司,江苏 南京 211800)

摘要:【目的】针对木醋杆菌在木糖代谢效率低、细菌纤维素(bacterial cellulose,BC)合成能力受限的问题,探索多种物理诱变技术提升其木糖利用与BC合成性能。**【方法】**分别采用紫外(ultraviolet,UV)诱变、等离子体(atmospheric and room temperature plasma,ARTP)诱变及UV-ARTP复合诱变对木醋杆菌进行改良,并构建纯木糖与混合碳源两类发酵体系评估诱变菌株性能。通过比较诱变菌株的BC产量与木糖消耗量,筛选出高效稳定的突变菌株。**【结果】**ARTP诱变菌株ARTP-Mix-1的BC产量达5.07 g/L,木糖消耗量达4.06 g/L,较混合碳源培养基中的野生型菌株WT-Mix分别提高了73.04%及13.50倍,且均优于UV诱变菌株。而UV-ARTP复合诱变菌株CM-Mix-20的BC产量达6.00 g/L,木糖消耗量达4.70 g/L,较WT-Mix分别提高了104.78%和15.79倍。**【结论】**该研究为细菌纤维素工业化生产及木糖资源高效利用提供了新策略。

关键词:木醋杆菌;细菌纤维素;紫外诱变;等离子体诱变;木糖代谢

Enhancement of Xylose Metabolism and Bacterial Cellulose Biosynthesis in *Komagataeibacter xylinus* Through Multiple Mutagenesis Techniques

RUAN Jing[1] *YANG Jie*[2] *LIU Qingguo*[1,3] *PENG Huan*[2] *ZHANG Renxu*[2] *SUN Wenjun*[1*] *CHEN Yong*[1,3]

(1. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. North Chemical Industry Co., Ltd., Luzhou 646605, China; 3. Nanjing High-tech Industrial Biotechnology Research Institute Co., Ltd., Nanjing 211800, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to address the low xylose metabolic efficiency and limited bacterial cellulose (BC) biosynthesis capacity of *Komagataeibacter xylinus* (*K. xylinus*) by exploring the use of multiple physical mutagenesis techniques to enhance xylose utilization and BC biosynthesis. [**Method**] Ultraviolet (UV) mutagenesis, atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, and UV-ARTP combined mutagenesis were employed to improve *K. xylinus*. Pure xylose and mixed carbon-source fermentation systems were established to evaluate the fermentation performance of the mutant strains. Efficient and genetically stable mutants were screened by comparing BC yield and xylose consumption. [**Result**] The ARTP-mutagenized strain ARTP-Mix-1 achieved a BC yield of 5.07 g/L and xylose consumption of 4.06 g/L, which represented increases of 73.04% and 13.50 folds compared with those of the wild-type strain WT-Mix, respectively, and both values were higher than those of the UV-mutagenized strains. Furthermore, the mutant strain CM-Mix-20 produced by

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFC2105400)。

通信作者:孙文俊(1993—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事生物催化、生物发酵研究。E-mail:sunwenjun@njtech.edu.cn

收稿日期:2025-04-09 **修回日期:**2025-05-26

UV-ARTP achieved a BC yield of 6.00 g/L and xylose consumption of 4.70 g/L, which represented increases of 104.78% and 15.79 folds compared with those of WT-Mix, respectively. [**Conclusion**] This study provides a new strategy for the industrial production of BC and the efficient utilization of xylose resources.

Keywords: *Komagataeibacter xylinus*; bacterial cellulose; ultraviolet mutagenesis; atmospheric and room temperature plasma mutagenesis; xylose metabolism

细菌纤维素（bacterial cellulose，BC）作为一种高分子天然材料，凭借其优异的力学性能、稳定性和生物相容性，在生物医学、环保和食品等领域的应用广泛[1-3]。木醋杆菌（*Komagataeibacter xylinus*）作为生产BC的主要菌株，其木糖利用效率较低，导致其在木糖代谢过程中的能量和碳源供给不足，限制了BC的高效合成[2,4]。木糖作为一种低成本且易得的生物质资源[5]，可来源于农业废弃物（如玉米芯、甘蔗渣、木质纤维素[6]等），是BC发酵的经济可行碳源[7]。因此，提高木醋杆菌的木糖利用效率，进而提高BC产量，是木醋杆菌产业化生产的重要方向[8-9]。

为提高BC的产量，研究人员尝试通过培养条件优化、基因改造及诱变技术等策略对菌株进行改良[10-11]。通过定向进化、基因编辑等技术对木醋杆菌的代谢途径进行改造，可有效提高其对木糖的利用率[12]。但基因改造技术通常具有较高的成本和技术难度，且其长期稳定性和适应性问题仍需解决。相比之下，物理诱变技术（如UV诱变和ARTP诱变[13-15]）可通过改变菌株的基因结构来提高其对木糖的利用率和BC的生产性能。UV诱变和ARTP诱变具有简单、低成本的优势，且不依赖于复杂的基因工程，因此在工业生产中具有较大的应用潜力。ARTP诱变可在常温常压下产生等离子体射流，诱导质粒DNA和寡核苷酸发生错义突变、缺失及移码突变等多种遗传变异[16]。相较于传统的UV诱变，ARTP诱变具有更高的突变率、更广的诱变谱及更强的可控性，且操作简便、环保，是一种高效的随机突变工具。ARTP诱变通过自由基、离子等高能粒子作用于细胞，可在减少细胞损伤的同时显著提升遗传多样性，更易获得代谢活性强且遗传稳定的突变菌株[17]。因此，ARTP诱变在提升木醋杆菌碳源代谢能力及BC合成水平方面表现更优。然而，单独使用这些诱变方法时，木醋杆菌的代谢效率提升有限，且菌株的遗传稳定性和生产能力存在不确定性。

为克服这些问题，作者采用UV诱变、ARTP诱变及UV-ARTP复合诱变方法，探讨其在提高木醋杆菌木糖利用效率和BC生产性能中的应用。通过结合UV和ARTP诱变的优势有效提高木醋杆菌对木糖的代谢能力，并增强其对不同碳源环境的适应性。采用纯木糖培养基（20 g/L木糖）和混合碳源培养基（10 g/L葡萄糖和10 g/L木糖）进行发酵试验，以评估突变菌株对木糖的代谢能力及BC产量的提升效果。在纯木糖培养基中测定BC产量，可直接反映菌株对木糖的代谢效率，而在混合碳源培养基中测定BC产量，则可模拟实际工业生产环境，评估菌株的适应性及BC的合成能力。通过对比不同培养基条件下的BC产量，筛选出既能高效利用木糖，又能在混合碳源环境中保持高产的优良突变菌株。

1 材料与方法

1.1 试剂

葡萄糖、木糖、酵母粉、蛋白胨、琼脂粉、磷酸氢二钠、硫酸铵、一水合柠檬酸、柠檬酸三钠、无水乙醇：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

等离子体诱变仪：ARTP-M型，无锡源清天木生物科技有限公司；分析天平：BSA224S型，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；精密天平：BSA3202S型，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；超净工作台：MDF-382E（N）型，日本三洋集团；振荡培养箱：ZQZY-CT型，上海知楚仪器有限公司；数显恒温水浴锅：HH-2型，常州国华电器有限公司；离心机：5424R型，德国Eppendorf公司；制冰机：725型，青岛奥科玛集团；振荡仪：Vortex-5型，海门其林贝尔仪器制造有限公司；微量移液器：P10-P1000型，德国Eppendorf公司；高压蒸汽灭菌锅：HVE-50型，日本HIRAYAMA公司。

1.3 培养基

本研究所用各类培养基的组分如下，所有培养基均使用蒸馏水定容至100 mL，经高压蒸汽灭

菌（115 ℃、20 min）后备用。

1）固体培养基[17]：葡萄糖2.0 g、酵母粉1.0 g、蛋白胨2.0 g、琼脂粉2.0 g，用于菌株活化与常规培养。

2）筛选固体培养基[18]：木糖2.0 g、酵母粉1.0 g、蛋白胨0.5 g、琼脂粉2.0 g，用于突变菌株筛选与透明圈观察。

3）种子培养基[8]：葡萄糖2.0 g、酵母粉1.0 g、蛋白胨2.0 g，用于种子液制备。

4）纯木糖培养基[19]：木糖2.0 g、酵母粉0.5 g、蛋白胨0.5 g、磷酸氢二钠0.2 g、无水硫酸镁0.5 g、硫酸铵0.2 g、一水合柠檬酸0.1 g、柠檬酸三钠2.0 g、无水乙醇1.0 g，用于评估菌株在纯木糖条件下的代谢与产物合成能力。

5）混合碳源培养基：木糖1.0 g、葡萄糖1.0 g、酵母粉0.5 g、蛋白胨0.5 g、磷酸氢二钠0.2 g、无水硫酸镁0.5 g、硫酸铵0.2 g、一水合柠檬酸0.1 g、柠檬酸三钠2.0 g、无水乙醇1.0 g，用于模拟复杂碳源环境下的代谢响应。

1.4　方法

1.4.1　木醋杆菌的培养

1）木醋杆菌的优化培养：对超净工作台紫外灭菌20~30 min，将冷冻保存的菌种转接到平板培养基上划线分离，在30 ℃恒温培养箱中培养至单菌落长出，将得到的单菌落挑选至新的平板培养基上，于30 ℃恒温培养箱中培养至菌落长出，如此反复转接几次，最后将得到的优化木醋杆菌转至新的平板培养基中培养2~3 d，并将得到的含木醋杆菌的平板培养基保存于4 ℃冰箱。

2）木醋杆菌的活化培养：将4 ℃保存的木醋杆菌取出并转接至新的固体培养基中，于30 ℃恒温培养箱中培养2~3 d使其充分活化。

3）木醋杆菌的发酵培养：在无菌条件下取一环活化后的木醋杆菌，置于含100 mL种子培养基的500 mL锥形瓶中，在30 ℃、150 r/min条件下培养18~22 h。将得到的种子液充分混匀，按照接种体积分数10%接种于含100 mL发酵培养基的500 mL培养基中，30 ℃静置发酵8 d。

4）BC产量的测定：由于在木醋杆菌发酵过程中，BC中含有大量杂质，需先用清水去除部分杂质，将得到的BC在0.1 mol/L的NaOH溶液中煮沸30 min，再于纯水中煮沸以去除杂质，最后用纯水冲洗除去剩余的杂质。将纯化得到的BC置于65 ℃烘箱中烘干至恒质量，称重得到BC的干质量。

1.4.2　菌悬液的制备

将活化好的菌种取一环接入液体培养基中，在液体培养基中加入纤维素酶至终浓度为0.5~1.0 U/mL，以降解在培养过程中产生的BC，摇床转速为150 r/min，温度为30 ℃，培养18~24 h至OD值为0.6左右。取20 mL的培养液，4 000 r/min离心10 min，再用无菌生理盐水洗涤3次，最后用无菌生理盐水重悬，将菌株浓度稀释为10^6~10^8个/mL。

1.4.3　菌株的诱变

1）UV诱变：将5 mL上述处理好的菌悬液置于30 W的紫外灯下进行诱变，照射距离为40 cm，照射时间为60~300 s，梯度为30 s。诱变结束后，对处理后的菌悬液用生理盐水进行梯度稀释，稀释混匀后取100 μL稀释菌悬液涂布于筛选培养基上，于30 ℃培养箱中避光培养3~5 d。培养结束后进行菌落计数，按式（1）计算不同处理时间下菌株的致死率，并绘制处理时间-致死率曲线。

$$L=\frac{A-B}{A}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

L——致死率，%；

A——对照组菌落数，CFU；

B——诱变处理组菌落数，CFU。

2）ARTP诱变：在超净工作台上，将灭菌的载片放在灭菌的培养皿中，取10 μL稀释好的菌悬液于载片中央，待液体完全蒸发后，用灭菌的镊子将其放于ARTP育种机上并固定，设定离子体发生器射出口与载片距离2 mm，工作气体为99.9%的氦气，于室温室压下进行诱变，设定电源功率为160 W，气流量为10.000 SLM，诱变时间为0~300 s，梯度为30 s。诱变结束后将载片放入灭菌的EP管中，加入1 mL生理盐水，放在振荡器上，将载片上的菌体充分洗脱至生理盐水中，得到新的预混液。用生理盐水进行梯度稀释，每个梯度稀释液吸取100 μL分别涂布于筛选平板上，30 ℃培养3~5 d后进行计数，绘制处理时间-致死率曲线。

3）UV-ARTP复合诱变：先将菌株进行ARTP诱变，确定致死率达到90%以上的最佳处理时间，并筛选活性较高的突变菌株。随后，对筛选出的突

变菌株进行UV诱变，处理时间设置为60~300 s，梯度为30 s。通过优化照射时间和避光恢复过程来提高突变率。为了减少细胞损伤并提高筛选效率，ARTP诱变后的菌悬液需先在适宜条件下恢复生长6~12 h，再进行UV诱变，以确保细胞活性。此外，UV照射后需避光稳定20 min，以抑制DNA修复机制，提高突变积累概率。诱变后，菌悬液梯度稀释后涂布于筛选培养基平板上，在30 ℃恒温培养48 h后计数菌落数，并计算致死率。选择致死率在90%以上的照射时间，对菌悬液进行最终的UV诱变处理。诱变后的菌悬液再次进行筛选培养，并通过透明圈直径（D）与菌落直径（d）比值（D/d）进行初步筛选[20-22]。在液体发酵条件下，进一步测定筛选出的突变菌株的BC产量，以确保所获得的突变菌株在实际发酵条件下仍具有高产能力。

1.4.4 突变菌株的筛选

从筛选平板上挑选长势较好、颗粒饱满、形状较大的单菌落至96孔板上，培养5~6 d，观察各个单菌落的成膜情况，挑选成膜较快且较厚的菌株于24孔板进行复筛，将在24孔板中成膜较厚且较快的菌株挑选出来，再次复筛[23-24]。将24孔板复筛得到的菌株充分活化，接入装有100 mL发酵液的500 mL锥形瓶中，按接种体积分数10%接种，发酵时间为8 d，进行发酵验证。发酵结束后，收集处理所得的膜状BC，称量BC的干质量，筛选得到产BC较多的突变菌株。

1.5 相关参数的测定

采用高效液相色谱（HPLC）测定底物木糖和葡萄糖的质量浓度[25]，采用Aminex HPX-87H柱，流动相为5 mmol/L H_2SO_4溶液，流量0.4 mL/min，柱温55 ℃，进样体积5 μL。糖消耗量根据发酵前培养基中糖的初始质量浓度与发酵结束后剩余质量浓度的差值进行计算。其中，纯木糖培养基中木糖初始质量浓度为20.00 g/L，木糖消耗量为20.00 g/L与剩余木糖质量浓度的差值；混合碳源培养基中葡萄糖和木糖初始质量浓度均为10.00 g/L，葡萄糖消耗量和木糖消耗量分别为10.00 g/L与对应剩余糖质量浓度的差值。

1.6 数据处理

采用Excel进行数据整理，图中误差线表示标准差，采用GraphPad Prism 9软件制图。

2 结果与讨论

2.1 木醋杆菌的UV诱变

2.1.1 处理时间-致死率曲线

根据1.4.3所述方法对菌株进行诱变，得到处理时间与菌株致死率之间的变化关系，见图1。随着处理时间的延长，菌株的致死率不断增加。当处理时间大于150 s时，菌株的致死率在90%以上。

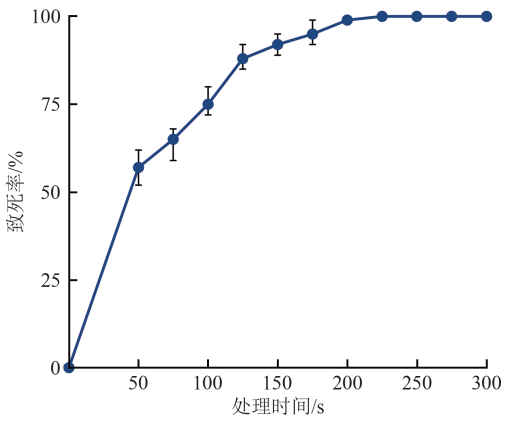


图1 UV诱变的处理时间-致死率曲线

Fig. 1 Processing time-lethality rate curve of ultraviolet mutagenesis

2.1.2 UV诱变所得菌株的BC产量比较

由于诱变的目的是筛选出高产且性能优良的突变菌株，故选择突变率较高（致死率在90%以上）的突变菌株。木醋杆菌经5次UV诱变后，在筛选固体培养基上挑选突变菌株，于96孔板进行初筛，再于24孔板进行复筛，共得到突变菌株41株，将24孔板筛选得到的突变菌株充分活化后分别在纯木糖和混合碳源培养基中进行发酵，测定BC产量。

如图2所示，经UV诱变后，在纯木糖培养基中的突变菌株UV-Xy-4、UV-Xy-5、UV-Xy-21的BC产量分别达1.13、1.15、1.20 g/L；在混合碳源培养基中的突变菌株UV-Mix-2、UV-Mix-8、UV-Mix-12的BC产量分别达3.48、3.29、3.50 g/L。

如表1所示，突变菌株UV-Mix-12的木糖消耗量最高（2.61 g/L），表明UV诱变有效提升了菌株在不同碳源条件下的BC产量。其中，诱变菌株UV-Mix-12在混合碳源培养基中的BC产量达3.50 g/L，较野生型菌株（WT-Mix）显著提高，同时

其木糖消耗量也最高，表明其对碳源的利用能力明显增强。推测该菌株经诱变筛选后，相关代谢通路得到优化，表现出更高的木糖转化率。相比之下，诱变菌株UV-Mix-8的BC产量虽然略低，但木糖消耗量较高，亦具备良好的木糖代谢能力。在纯木糖培养基中，诱变菌株UV-Xy-21的BC产量相对较高，说明其在单一碳源条件下具有较强的生产性能。结果表明，UV诱变所得菌株在混合碳源培养基中的优势更为显著，说明诱变不仅改善了菌株对木糖的代谢能力，同时增强了其对多碳源环境的适应性。

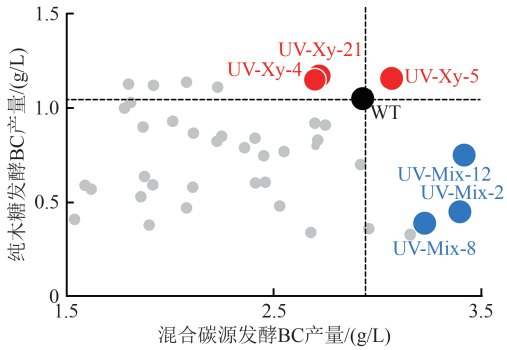


图2　UV诱变菌株在不同培养基中的BC产量

Fig. 2　BC yields of ultraviolet-induced mutants in different media

表1　诱变菌株的BC产量和剩余葡萄糖、木糖质量浓度

Table 1　BC yields and residual glucose and xylose mass concentrations of mutants

菌株编号	剩余葡萄糖质量浓度/(g/L)	剩余木糖质量浓度/(g/L)	BC产量/(g/L)
WT-Xy		19.85	1.05
UV-Xy-4		19.25	1.13
UV-Xy-5		18.19	1.15
UV-Xy-21		18.02	1.20
WT-Mix	—	9.72	2.93
UV-Mix-2	—	8.46	3.48
UV-Mix-8	—	8.09	3.29
UV-Mix-12	—	7.39	3.50

注：空白表示该培养基中未添加葡萄糖；“—”表示未检出。

将6株诱变菌株分别进行连续传代培养5次，传代5次后，突变菌株UV-Xy-4、UV-Xy-5的BC产量稳定在0.83~0.90 g/L，UV-Mix-8、UV-Mix-12的BC产量稳定在2.87~3.34 g/L。而UV-Xy-21与UV-Mix-2在传代过程中的BC产量逐代下降，未能维持稳定，表明其突变性状不稳定，见图3。UV诱变可引起DNA损伤及随机遗传变异，部分突变菌株的高产性状在传代过程中的遗传稳定性不足，从而使BC产量逐渐下降。高产菌株往往伴随着碳源代谢通量的增强和能量负荷的加重，若突变引发了代谢网络的失衡或资源调配紊乱，细胞则可能在连续培养中优先选择较低能耗的稳态模式，从而降低BC合成水平。此外，UV诱变的非定向性也可能使部分突变仅通过暂时性调控机制提升目标产量，在缺乏筛选压力的条件下，这类不稳定表达型突变易被削弱，甚至完全失活。

2.2　木醋杆菌的ARTP诱变

2.2.1　处理时间-致死率曲线

根据1.4.3的方法对菌株进行诱变，得到处理时间与菌株致死率之间的变化关系，见图4。随着处理时间的延长，菌株的致死率不断增加。当处理时间大于120 s时，菌株的致死率在90%以上。

2.2.2　ARTP诱变菌株的BC产量比较

经过5次ARTP诱变后，从筛选平板中挑取诱变菌株于96孔板初筛，再于24孔板进行复筛，共得到突变菌株30株，将24孔板筛选得到的突变菌

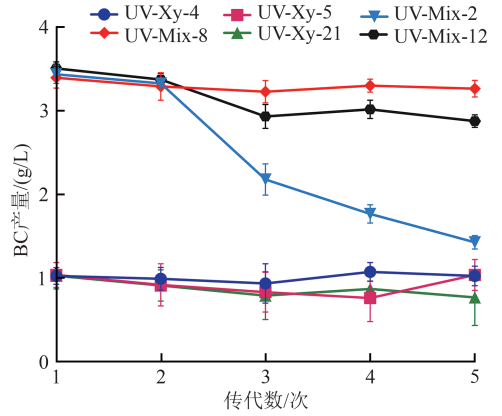


图3　UV诱变菌株的传代培养

Fig. 3　Subculture of ultraviolet-induced mutants

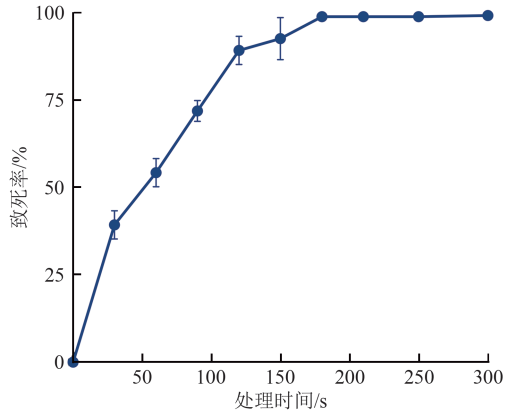


图 4　ARTP 诱变的处理时间-致死率曲线

Fig. 4　Processing time-lethality rate curve of ARTP mutagenesis

株充分活化，并分别在纯木糖培养基和混合碳源培养基中进行发酵，测定 BC 产量。如图 5 所示，经 ARTP 诱变后，在纯木糖培养基中的突变菌株 ARTP-Xy-2、ARTP-Xy-8、ARTP-Xy-12 的 BC 产量均达到 1.60 g/L 左右，在混合碳源培养基中的突变菌株 ARTP-Mix-1、ARTP-Mix-15、ARTP-Mix-16、ARTP-Mix-17 的 BC 产量分别为 5.07、4.74、4.65、4.68 g/L。如表 2 所示，ARTP-Mix-1 的木糖消耗量最高，达到 4.06 g/L。

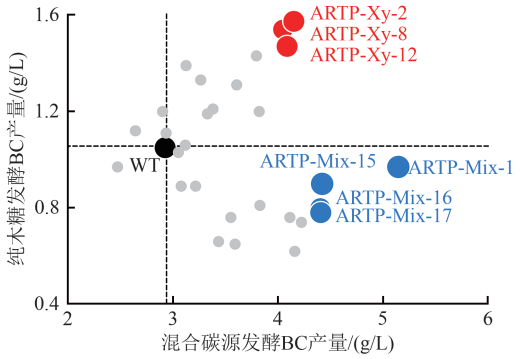


图 5　ARTP 诱变菌株在不同培养基中 BC 产量

Fig. 5　BC yields of ARTP mutants in different media

表 2　诱变菌株的 BC 产量、剩余葡萄糖、木糖质量浓度

Table 2　BC yields and residual glucose and xylose mass concentrations of mutants

菌株编号	剩余葡萄糖质量浓度/(g/L)	剩余木糖质量浓度/(g/L)	BC 产量/(g/L)
WT-Xy		19.85	1.05
ARTP-Xy-2		16.80	1.70
ARTP-Xy-8		17.90	1.53
ARTP-Xy-12		17.20	1.60
WT-Mix	—	9.72	2.93
ARTP-Mix-1	—	5.94	5.07
ARTP-Mix-15	—	6.21	4.74
ARTP-Mix-16	—	6.28	4.65
ARTP-Mix-17	—	7.02	4.68

注：空白表示该培养基中未添加葡萄糖；“—”表示未检出。

从上述结果可看出，ARTP 诱变与 UV 诱变均有效提升了菌株在不同碳源条件下的 BC 产量，但在产量提升幅度和碳源利用能力上存在一定差异。相较于 UV 诱变所得 UV-Mix 系列突变菌株，ARTP 诱变的突变菌株在混合碳源培养基中的 BC 产量普遍更高，其中，突变菌株 ARTP-Mix-1 的 BC 产量达 5.07 g/L，较 WT-Mix 提高了 73.04%；木糖消耗量为 4.06 g/L，较 WT-Mix 提高了 13.50 倍。说明 ARTP 诱变对碳源代谢能力的改善效果更为显著。此外，ARTP 诱变的突变菌株在纯木糖培养基中 BC 产量的提升效果也明显优于 UV 诱变的突变菌株，表明其在单一碳源和多碳源环境下均有较强的代谢适应能力。综合对比发现，2 种诱变手段均能有效筛选出高产 BC 菌株，但 ARTP 诱变在 BC 产量和糖耗效率上的优势更为突出。

将这 7 株高产菌株分别进行连续传代培养。如图 6 所示，突变菌株 ARTP-Mix-16、ARTP-Mix-17、ARTP-Xy-12 的 BC 产量自第 2 代后表现出遗传稳定性不足。高产性状诱变引起的代谢网络重构可能难以在长期培养中维持，细胞倾向回归低能耗的稳态通路，且在缺乏持续选择压力的培养条件下，相关高产性状可能逐渐减弱或被低代谢负担表型所取代，从而导致菌株在多代培养中表现出遗传稳定性不足。而突变菌株 ARTP-Xy-2、

ARTP-Xy-8的BC产量稳定在1.30~1.60 g/L，突变菌株ARTP-Mix-1、ARTP-Mix-15的BC产量稳定在4.55~4.87 g/L，具有良好的传代稳定性。与UV诱变相比，ARTP诱变通过更均匀和可控的物理方法诱导菌株突变，可导致更高的基因多样性和更强的适应能力，因此能够筛选出稳定性更好的菌株。

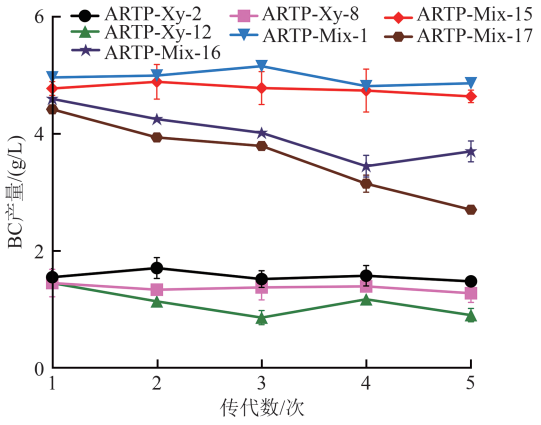


图6　高产菌株的传代培养

Fig. 6　Subculture of high-producing strains

2.3　木醋杆菌的UV-ARTP复合诱变

2.3.1　处理时间-致死率曲线

根据1.4.3所述方法对菌株进行UV-ARTP复合诱变，得到处理时间与菌株致死率之间的变化关系，见图7。随着处理时间的延长，菌株的致死率不断增加；当处理时间>90 s时，菌株的致死率在90%以上。

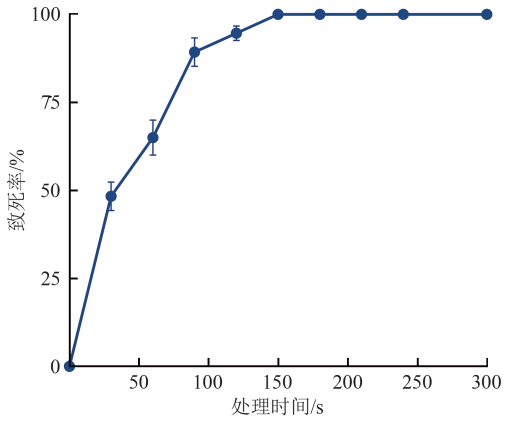


图7　UV-ARTP复合诱变的处理时间-致死率曲线

Fig. 7　Processing time-lethality rate curve of UV-ARTP mutagenesis

2.3.2　UV-ARTP复合诱变所得菌株的BC产量比较

经过UV-ARTP复合诱变后，从筛选平板上挑取诱变菌株于96孔板中进行初筛，再于24孔板进行复筛，最终得到28株突变菌株。将得到的突变菌株充分活化后发酵，测定BC产量。如图8所示，经UV-ARTP复合诱变后，在纯木糖培养基中的突变菌株CM-Xy-7、CM-Xy-11、CM-Xy-15的BC产量分别达到1.84、2.02、1.98 g/L，在混合碳源培养基中的突变菌株CM-Mix-9、CM-Mix-20、CM-Mix-28的BC产量分别达到5.97、6.00、5.60 g/L。如表3所示，CM-Mix-20的BC产量和木糖消耗量均最高，分别达6.00 g/L和4.70 g/L，较WT-Mix分别提高了104.78%和15.79倍。

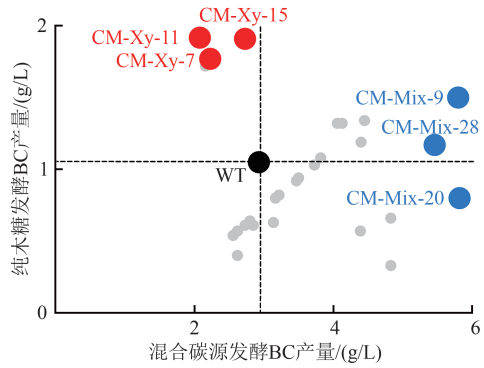


图8　诱变菌株的BC产量

Fig. 8　BC yields of mutants

从上述结果可以看出，UV-ARTP复合诱变对菌株产能提升效果显著，在混合碳源培养基中，CM-Mix系列菌株的BC产量均超过5.50 g/L，显著优于单一UV或ARTP诱变所得菌株，表明复合诱变通过协同作用提高了基因多样性，有助于筛选出更优突变体，提高碳源利用效率。CM-Mix-20的BC产量和木糖消耗量均最高，分别达到6.00 g/L和4.70 g/L，较WT-Mix分别提高了104.78%和15.79倍，表明UV-ARTP复合诱变进一步增强了菌株的碳源代谢能力和BC合成能力。此外，纯木糖培养基中的突变菌株CM-Xy-11产量达2.02 g/L，优于其他诱变菌株，说明复合诱变对单碳源利用同样有积极影响。整体来看，UV-ARTP复合诱变不仅提高了菌株的BC产量，也提高了木糖的代谢能力，同时增强了菌株对多碳源环境的适应性，在混合碳源培养基中表现出明显优势。

值得注意的是，部分诱变菌株在纯木糖培养

表 3　诱变菌株的 BC 产量、剩余葡萄糖和木糖质量浓度

Table 3　BC yields and residual glucose and xylose mass concentrations of mutants

菌株编号	剩余葡萄糖质量浓度/(g/L)	剩余木糖质量浓度/(g/L)	BC 产量/(g/L)
WT-Xy		19.85	1.05
CM-Xy-7		16.32	1.84
CM-Xy-11		15.94	2.02
CM-Xy-15		16.04	1.98
WT-Mix	—	9.72	2.93
CM-Mix-9	—	6.22	5.97
CM-Mix-20	—	5.30	6.00
CM-Mix-28	—	6.85	5.60

注：空白表示该培养基中未添加葡萄糖；“—”表示未检出。

基中发酵结束时仍残留较高质量浓度的木糖，且 BC 产量偏低，表明木糖未被充分利用。由于 BC 合成依赖于碳源的持续供给，可通过延长发酵周期或优化培养条件使这些菌株完成对木糖的进一步代谢，实现 BC 产量的提升。该现象也反映出部分突变菌株虽具备较强的合成能力，但其木糖吸收转运效率较低或代谢通路尚未被完全激活，存在底物未充分转化的代谢瓶颈。因此，针对这些底物残留型菌株，未来可通过二次诱变、代谢通量调控或过程优化等手段，进一步挖掘其产能潜力，从而获得兼具高产性与高转化率的工程菌株。

将这 6 株突变菌株进行连续传代培养，见图 9。在传代过程中，突变菌株 CM-Xy-7、CM-Mix-20、CM-Mix-28 在第 3 次传代后的 BC 产量明显下降，无法保持稳定。经 5 次传代后，突变菌株 CM-Xy-11、CM-Xy-15 的 BC 产量稳定在 1.69~1.96 g/L，CM-Mix-9 的 BC 产量为 5.91 g/L。

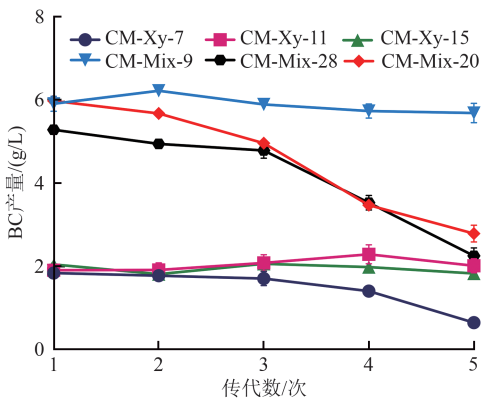


图 9　菌株的传代培养

Fig. 9　Subculture of strains

综上，UV-ARTP 复合诱变筛选所得的突变菌株中，部分突变菌株在连续传代过程中的 BC 产量出现波动，尤其是突变菌株 CM-Xy-7、CM-Mix-20、CM-Mix-28 在第 3 次传代后的 BC 产量下降，表明其高产性状的遗传稳定性不足。这可能与 UV-ARTP 复合诱变引入的多位点、广范围突变有关。尽管 UV-ARTP 复合诱变可在短期内增强表型优势，但也可能扰乱细胞稳态，造成代谢调控紊乱或加重适应性负担。此外，部分高产表型可能仅依赖于暂时性表达增强或局部通路激活，缺乏稳定的基因调控支撑，因而其优化性能在连续传代过程中逐步减弱。相比之下，突变菌株 CM-Xy-11、CM-Xy-15、CM-Mix-9 在传代过程中保持了较高且稳定的 BC 产量，具有良好的遗传稳定性。综上，UV-ARTP 复合诱变结合了 2 种物理诱变的优势，能够有效增加基因多样性，并提高菌株的碳源代谢能力，进而提升 BC 产量，但同时也增加了基因扰动风险，需通过进一步优化诱变策略，筛选出更适合工业生产的高产且遗传稳定的菌株。

3　结论

通过 3 种不同的诱变技术（UV、ARTP、UV-ARTP）对木醋杆菌进行改良，以提高其细菌纤维素（BC）产量并优化木糖的代谢利用率。其中 UV 诱变及 ARTP 诱变均可获得单向正突变菌株及双向正突变菌株，且 ARTP 诱变在提高 BC 合成能力方面优于 UV 诱变，ARTP 诱变获得的突变菌株 ARTP-Mix-1 在混合碳源培养基中的 BC 产量达 5.07 g/L，较 WT-Mix 提高了 73.04%；木糖消耗量为 4.06 g/L，较 WT-Mix 提高了 13.50 倍。UV-ARTP 复合诱变获得的突变菌株 CM-Mix-20 在混合碳源

培养基中的BC产量和木糖消耗量最高，分别达到6.00 g/L和4.70 g/L，较WT-Mix分别提高了104.78%和15.79倍，均优于单一诱变处理。本研究改善了有关木醋杆菌木糖利用率低的局限性，为BC的工业化生产提供了有效策略。但仍有部分菌株的BC产量在连续传代中的稳定性较差，且突变性状的遗传稳定性不足，未来可进一步探讨改善菌株诱变过程中的遗传稳定性，优化复合诱变策略以提升木醋杆菌在工业生产中的应用效果。

参考文献

[1] GIRARD V D，CHAUSSÉ J，VERMETTE P. Bacterial cellulose：a comprehensive review[J]. Journal of Applied Polymer Science，2024，141(15)：e55163.

[2] CHOI S M，RAO K M，ZO S M，et al. Bacterial cellulose and its applications[J]. Polymers，2022，14(6)：1080.

[3] STUMPF T R，YANG X Y，ZHANG J C，et al. *In situ* and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering[J]. Materials Science and Engineering：C，2018，82：372-383.

[4] SOEMPHOL W，HONGSACHART P，TANAMOOL V. Production and characterization of bacterial cellulose produced from agricultural by-product by *Gluconacetobacter* strains[J]. Materials Today：Proceedings，2018，5(5)：11159-11168.

[5] ÁVILA P F，MARTINS M，DE ALMEIDA COSTA F A，et al. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre，2020，24：100234.

[6] MARIM A V C，GABARDO S. Xylooligosaccharides：prebiotic potential from agro-industrial residue，production strategies and prospects[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology，2021，37：102190.

[7] CHO C H，HATSU M，TAKAMIZAWA K. The production of *D*-xylose by enzymatic hydrolysis of agricultural wastes[J]. Water Science and Technology，2002，45(12)：97-102.

[8] WU S C，LI M H. Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2015，120(4)：444-449.

[9] LUO M T，ZHAO C，HUANG C，et al. Efficient using durian shell hydrolysate as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*[J]. Indian Journal of Microbiology，2017，57(4)：393-399.

[10] TEH M Y，OOI K H，DANNY TEO S X，et al. An expanded synthetic biology toolkit for gene expression control in Acetobacteraceae[J]. ACS Synthetic Biology，2019，8(4)：708-723.

[11] 黄龙辉，李雪晶，孙雪文，等. CRISPR/dCas9干扰*bcsD*基因表达调控细菌纤维素结构[J]. 生物工程学报，2022，38(2)：772-779.
HUANG L H，LI X J，SUN X W，et al. Regulating the structure of bacterial cellulose by altering the expression of *bcsD* using CRISPR/dCas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2022，38(2)：772-779.(in Chinese)

[12] 沈钰清. 木糖及纤维二糖代谢途径的构建及其对细菌纤维素合成的影响研究[D]. 天津：天津科技大学，2022.

[13] 陈润杰，李云飞，张妍，等. 多杀菌素生产菌的复合诱变选育及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：44-53.
CHEN R J，LI Y F，ZHANG Y，et al. Breeding of spinosad producing strains by combined mutation and optimization of fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：44-53.(in Chinese)

[14] 张桂才，贾士儒，闫林，等. 等离子体注入诱变选育细菌纤维素高产菌株[J]. 现代食品科技，2010，26(12)：1354-1357.
ZHANG G C，JIA S R，YAN L，et al. Mutation screening of a high bacterial cellulose-producing strain by plasma ion implantation[J]. Modern Food Science and Technology，2010，26(12)：1354-1357.(in Chinese)

[15] 沈淑琳，李会，张晓梅，等. 西索米星生产菌株的诱变选育及工艺优化[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(8)：11-20.
SHEN S L，LI H，ZHANG X M，et al. Mutation breeding of sisomicin producing strain and optimization of fermentation process[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(8)：11-20.(in Chinese)

[16] LIN D H，LOPEZ-SANCHEZ P，LI R，et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source[J]. Bioresource Technology，2014，151：113-119.

[17] 肖成建，陈楠，江慰，等. ARTP诱变及高效筛选高产葡萄糖氧化酶菌株[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(5)：525-530.
XIAO C J，CHEN N，JIANG W，et al. Screening mutation of high glucose oxidase activity using atmospheric

and room temperature plasmas[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2016,35(5):525-530.(in Chinese)

[18] MOHITE B V,KAMALJA K K,PATIL S V. Statistical optimization of culture conditions for enhanced bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* NCIM 2529[J]. Cellulose,2012,19(5):1655-1666.

[19] HU Y, CATCHMARK J M. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the production of bacterial cellulose biosynthesized by *Acetobacter xylinum* under the agitated culture [J]. Letters in Applied Microbiology,2010,51(1):109-113.

[20] BAE S O, SUGANO Y, OHI K, et al. Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,65(3):315-322.

[21] 陈芸芸,陆兆新,党丽娟,等. 复合诱变增强植物乳杆菌fmb10的抑菌性能研究[J]. 食品与机械,2016,32(5):58-62.
CHEN Y Y, LU Z X, DANG L J, et al. Study on enhancing antibacteial activity of *Lactobacillus plantarum* fmb10 through composite mutagenesis [J]. Food & Machinery,2016,32(5):58-62.(in Chinese)

[22] 潘俊潼,寇凤雨,刘瑞艳,等. 常压室温等离子体-紫外复合诱变选育β-法尼烯高产菌株[J]. 微生物学通报,2020,47(2):542-551.
PAN J T, KOU F Y, LIU R Y, et al. Breeding of high β-farnesene producing strain by ARTP-UV combined mutation[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 542-551.(in Chinese)

[23] 李豪,白光剑,吴静,等. 紫外-常压室温等离子体复合诱变高产纤维素酶真菌[J]. 食品与发酵工业,2019,45(15):81-86.
LI H, BAI G J, WU J, et al. High cellulase-producing fungi by UV and ARTP mutagenesis[J]. Food and Fermentation Industries,2019,45(15):81-86.(in Chinese)

[24] 李艳青,戴剑漉,蒋忠科,等. 常压室温等离子体-紫外复合诱变选育新硫肽类抗生素166A高产菌株[J]. 中国抗生素杂志,2022,47(5):514-520.
LI Y Q, DAI J L, JIANG Z K, et al. Breeding of new thiopeptide antibiotic 166A high-yield producing strain by MPMS composite mutagenesis with plasma and UV[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(5): 514-520.(in Chinese)

[25] 孙轶男,李源,王娟,等. 葡萄糖/木糖混合发酵产乳酸过程调控研究[J]. 内蒙古工业大学学报(自然科学版),2024,43(3):219-223.
SUN Y N, LI Y, WANG J, et al. Regulation of mixed glucose/xylose fermentation for *L*-lactic acid production [J]. Journal of Inner Mongolia University of Technology (Natural Science Edition), 2024, 43(3): 219-223.(in Chinese)