

细菌纤维素产生菌选育与突变株发酵特性的研究

邓毛程¹, 李静¹, 王瑶¹, 陈维新¹, 吴永辉²

(1. 广东轻工职业技术学院, 广东广州 510300;

2. 广州倚德生物科技有限公司, 广东广州 511340)

摘要:为了获得细菌纤维素高产菌株, 采用紫外线和硫酸二乙酯对实验室保存的木葡糖酸醋杆菌BC13进行复合诱变。通过诱变、筛选和连续传代实验, 获得1株产量达15.6g/L的高产突变株Y19-11, 该菌株遗传稳定性良好, 比原出发菌株产量提高44.4%。同时, 通过比较不同温度、不同初始pH下的菌体量和细菌纤维素产量, 确定突变株Y19-11的最适温度和初始pH分别为30℃和5.5。

关键词:细菌纤维素, 紫外线诱变, 硫酸二乙酯诱变, 发酵特性

Study on breeding of bacterial cellulose producing strain and fermentation characteristics of mutation strain

DENG Mao-cheng¹, LI Jing¹, WANG Yao¹, CHEN Wei-xin¹, WU Yong-hui²

(1. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China;

2. Guangzhou Yide Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 511340, China)

Abstract: In order to obtain high bacterial cellulose (BC)-producing strain, composite mutagenesis of ultraviolet and diethyl sulfate was used to *Gluconacetobacter xylinus* BC13 which preserved in laboratory. A high-yield mutant strain Y19-11, BC yield reached 15.6g/L, was obtained by mutagenesis, screening and continuous passage. The mutant strain had excellent genetic stability and its BC yield increased by 44.4%, higher than the original strain. Meanwhile, through comparing the cell weight and yield of BC under different temperature and initial pH value, the optimal temperature and initial pH of mutant strain Y19-11 were determined as 30°C and 5.5, respectively.

Key words: bacterial cellulose; ultraviolet mutagenesis; diethyl sulfate mutagenesis; fermentation characteristics

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)04-0159-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.04.026

细菌纤维素(bacterial cellulose, 简称BC)最早由英国科学家Brown发现^[1], 是由微生物(主要是细菌)利用液态培养基发酵产生的细胞外纤维素, 与植物纤维素一样, 都是由葡萄糖基通过 β -1, 4-糖苷键连接起来的大分子^[2]。与植物纤维素相比, 细菌纤维素具有高结晶度、高化学纯度、高抗张强度、高弹性模量、吸水性强和生物相容性好等优点, 这些优点使其在食品、生物医药、组织工程支架材料、声学器材、化妆品、膜过滤材料、造纸等领域具有巨大的应用潜力^[3-5]。

迄今为止, 人们已经发现醋酸菌属(*Acetobacter*)、假单胞菌属(*Prudomonas*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、气杆

菌属(*Aerobacter*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和八叠球菌属(*Sarcina*)等九个属中某些微生物能够合成细菌纤维素, 其中, 木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)是目前最常用和产率最高的细菌纤维素生产菌^[3, 6]。多年来, 国内外研究人员一直致力于细菌纤维素高产菌的选育工作^[5, 7-8], 但现有菌种的细菌纤维素产率依然较低。为了提高细菌纤维素产生菌的产率, 本研究对实验室已获得的野生菌株进行复合诱变选育, 以期获得高产的突变株, 为细菌纤维素的研究和生产提供优良菌种。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)

收稿日期: 2014-04-24

作者简介: 邓毛程(1971-) 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程。

基金项目: 2010年广州市科技计划项目(2010Y1-C571), 2010年广东省科技计划项目(2010B011000008), 2011年广东省教育厅省级工程中心建设项目(GCZX-B1103)。

BC13 广东轻工职业技术学院食品与生物工程系筛选与保藏的菌种, 固体培养基 葡萄糖20g/L, 酵母膏10g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, 琼脂20g/L, pH5.5, 121℃灭菌20min, 液体培养基 葡萄糖50g/L, 酵母膏10g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, 新鲜椰子水 椰子破壳取水, 50%(v/v), pH5.5, 121℃灭菌20min。

SHZ-82A恒温水浴振荡器 江苏省太仓医疗器械厂, KDC-210HR高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司, A200基因扩增仪 杭州朗基科学仪器有限公司, RDY-SP1Z核酸电泳仪 北京荣阳经典科技有限公司, GI-1凝胶成像系统 通宝达成科技(北京)有限公司, S-3000N扫描电镜 日本日立公司, VERTEX70傅立叶红外光谱仪 德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 用适量的无菌生理盐水将斜面上的菌种洗下, 置于涡旋振荡器上振荡5min, 再用无菌生理盐水调节菌体浓度, 使浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

1.2.2 出发株的紫外诱变 将出发株BC13的菌悬液放入无菌的培养皿中, 置于紫外灯(30W, 254nm)下方20cm处进行照射处理, 照射期间采用磁力搅拌器进行搅拌, 每隔10s取样进行适当稀释, 涂布平板培养基, 于30℃下避光培养72h, 观测菌落数, 以未经照射的平板为参照, 计算紫外诱变的致死率, 选择适宜的诱变剂量。然后, 在优选剂量下对菌悬液进行处理, 经平板分离、液体发酵筛选, 筛选出高产的UV突变株。

1.2.3 UV突变株的化学诱变 采用硫酸二乙酯进行化学诱变, 操作参照文献[9]的方法。在UV突变株的菌悬液中, 加入硫酸二乙酯, 使其浓度为1%(v/v), 于30℃下振荡处理, 每隔5min取出1mL的菌悬液, 用0.5mL硫代硫酸钠终止反应, 再进行适当稀释, 涂布平板培养基, 于30℃下避光培养72h, 观测菌落数, 以未经处理的平板为参照, 选择适宜的诱变剂量。然后, 在优选剂量下对菌悬液进行处理, 经平板分离、液体发酵筛选, 筛选出高产的硫酸二乙酯突变株。

1.2.4 突变株的分离与筛选 将优选剂量下处理的菌悬液进行适当稀释, 涂布平板培养基, 于30℃下避光培养72h, 挑取颗粒圆润, 外形完整饱满的菌落, 接入斜面培养基进行培养24h, 然后将斜面菌种接入装有100mL液体培养基的三角瓶, 置于30℃、150r/min的条件下振荡培养12h, 再静止发酵10d, 测定细菌纤维素产量, 筛选出高产的突变株。

1.2.5 传代稳定性的分析 将上述优选突变株的斜面菌种转接斜面10次, 每次的斜面培养24h, 然后将各次的斜面菌种接入装有100mL液体培养基的三角瓶中, 按1.2.4中的方法进行发酵, 测定发酵液中细菌纤维素产量, 分析突变株的传代稳定性。

1.2.6 突变株发酵温度的分析 将上述选突变株的斜面菌种接入装有100mL液体培养基的三角瓶中, 分别在不同温度下, 振荡(150r/min)培养12h, 再静止发酵72h, 测定发酵液中的菌体量。同时, 以相同条件和方式进行发酵, 静止发酵10d后, 测定发酵液中的

细菌纤维素产量。根据测定结果, 分析突变株的适宜发酵温度。

1.2.7 突变株发酵pH的分析 将液体培养基调节至不同pH, 按1.2.6中方法, 在30℃下进行发酵, 分别测定发酵液中的菌体量和细菌纤维素产量, 分析适宜的初始发酵pH。

1.2.8 指标的测定

1.2.8.1 细菌纤维素产量(干重)的测定 采用称重法测定发酵液中细菌纤维素产量^[10]。将发酵液中的凝胶膜状产物取出, 用纯净水漂洗干净, 放入0.1mol/L的NaOH溶液中煮沸30min, 用蒸馏水漂洗至中性, 于105℃的条件下干燥, 直至恒重, 然后准确称量干燥物的质量, 即可计算细菌纤维素产量(干重)。计算公式如下:

$$\text{细菌纤维素产量(g/L)} = \frac{\text{纤维素质量(g)}}{\text{培养基体积(L)}}$$

1.2.8.2 菌体量(干重)的测定 改进文献[11]提供的方法, 将发酵液pH调节至5.0, 加入3g纤维素酶粉(10000U/g), 置于40℃下振荡酶解2h, 然后离心分离(12000r/min, 15min), 收集沉淀物, 于80℃下干燥, 恒重后称量干燥物质量, 菌体量的计算公式如下:

$$\text{菌体干重(g)} = \text{离心沉淀物干燥质量(g)} - 3$$

1.2.8.3 紫外诱变的致死率的计算 致死率的计算如下式:

$$\text{致死率(\%)} = \frac{(\text{参照平板上的菌落数} - \text{诱变平板上的菌落数})}{\text{参照平板上的菌落数}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 紫外线诱变与筛选

紫外线对菌种BC13的致死率曲线如图1所示。随着紫外线照射时间的增大, 菌种BC13的致死率呈上升的趋势, 照射时间超过60s以后的致死率十分接近100%。根据文献报道^[12], 致死率较高时, 存活的菌株出现正突变概率较小, 但正突变菌株的产量提高幅度有可能很大, 因而较多研究者选择致死率在80%~90%之间的剂量为最佳诱变剂量^[13-15]。从图1可看出, 紫外线照射30s时的致死率为88.2%, 故被选为最佳诱变剂量。

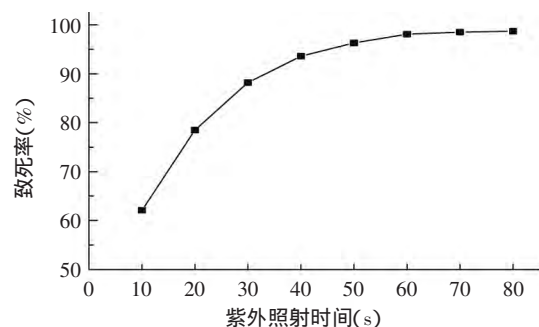


图1 紫外线诱变的致死率曲线

Fig.1 Mortality curve of UV mutagenesis

菌种BC13在此剂量下进行诱变, 经平板分离, 挑取96株菌株, 再经发酵筛选, 获得产量提高幅度达10%以上的菌株有8株, 它们和出发菌株BC13的细菌

纤维素产量如图2所示。由图2可知,这8株菌的产量在11.9~12.7g/L之间,产量增加幅度的范围为10.2%~17.6%,其中突变株Y26的产量最高,达12.7g/L,优于近年来汤卫华^[9]、万中义、Mohite等^[16-17]的研究成果。

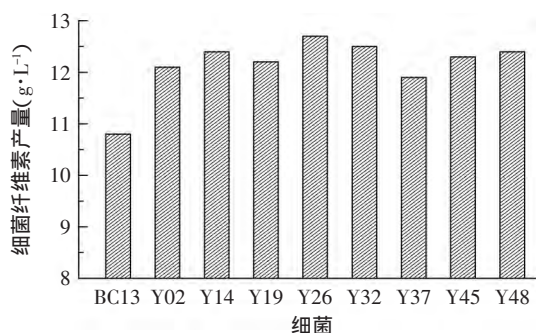


图2 紫外线突变株的细菌纤维素产量

Fig.2 Bacterial cellulose(BC) yield data of strains treated by UV mutation

2.2 硫酸二乙酯诱变与筛选

利用硫酸二乙酯对8株紫外线突变株进行处理,致死率的数据分布如表1所示。8株菌的致死率随硫酸二乙酯作用时间延长而增大,在30min时的致死率都在80%~90%之间,在40min及以后的致死率均超过90%,故优选30min作为硫酸二乙酯对这8株菌的最佳诱变剂量。

表1 硫酸二乙酯诱变的致死率(%)

Table 1 Mortality of diethyl sulfate mutagenesis(%)

菌株	10min	20min	30min	40min	50min	60min
Y02	44.7	74.8	86.0	93.9	98.9	100
Y14	49.5	76.3	87.4	95.2	99.3	100
Y19	42.4	73.9	87.8	94.8	98.5	100
Y26	41.4	71.6	85.9	93.7	98.0	100
Y32	40.5	71.1	81.6	90.4	96.7	99.9
Y37	45.3	74.7	86.6	94.5	98.6	100
Y45	47.6	75.2	88.5	95.3	99.5	100
Y48	41.8	70.9	82.5	90.8	97.1	99.8

在最佳诱变剂量下,利用硫酸二乙酯分别对紫外线照射的突变株Y02、Y14、Y19、Y26、Y32、Y37、Y45和Y48进行化学诱变,经平板分离、发酵筛选,选出产量比出发菌株BC13增加30%的菌株15株,它们的产量在14.1~15.6g/L之间,产量增加幅度的范围为30.6%~44.4%,如表2所示。经硫酸二乙酯诱变处理,有一部分产量较高的紫外线突变株发生了负突变,从突变株Y32和Y48的处理液中没有获得正突变幅度较大的菌株,产量最大的突变株Y26的正突变概率也相对减小,在此次诱变处理中,由突变株Y19诱变得到的菌株Y19-11的产量最大,达到15.6g/L,比突变株Y19的产量增加27.9%,比出发菌株BC13的产量增加44.4%。本结果较汤卫华^[9]文献报道的细菌纤维素产量9.91g/L有较大幅度提高,因此,将突变株Y19-11优选为进一步研究的对象。

表2 硫酸二乙酯突变株的细菌纤维素产量

Table 2 Bacterial cellulose(BC) yield data of strains treated by diethyl sulfate mutagenesis

出发菌株→硫酸二乙酯突变株	产量 (g·L ⁻¹)	出发菌株→硫酸二乙酯突变株	产量 (g·L ⁻¹)
BC13(对照)	10.8	Y19→Y19-23	15.3
Y02→Y02-07	14.6	Y26→Y26-03	14.3
Y14→Y14-05	14.1	Y37→Y37-01	14.9
Y14→Y14-08	14.9	Y37→Y37-06	14.4
Y14→Y14-12	14.4	Y45→Y45-09	14.2
Y19→Y19-02	14.8	Y45→Y45-10	14.9
Y19→Y19-06	15.0	Y45→Y45-18	14.7
Y19→Y19-11	15.6	Y45→Y45-20	15.1

2.3 传代稳定性分析

将突变株Y19-11的斜面菌种进行转接斜面10次,各次斜面菌种的液体发酵结果如图3所示。从图3看出,细菌纤维素产量在14.9~15.8g/L的范围内波动,波动幅度很小,其中8次的产量均在15.4g/L以上,表明突变株Y19-11具有良好的传代稳定性,其高产细菌纤维素的性能可以比较稳定地保持,较出发菌株产量增加37.9%~46.2%。

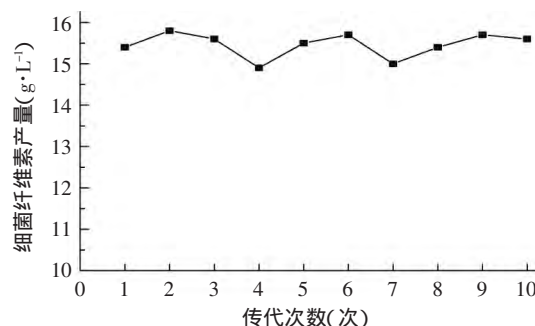


图3 传代10次的细菌纤维素产量

Fig.3 Bacterial cellulose(BC) yield data of strain Y19-11 during 10 times passaged

2.4 突变株的适宜温度

将突变株Y19-11分别在不同温度下进行液体发酵,静止发酵3d的菌体量和静止发酵10d的细菌纤维素产量如图4所示。可以看出,菌体量和细菌纤维素

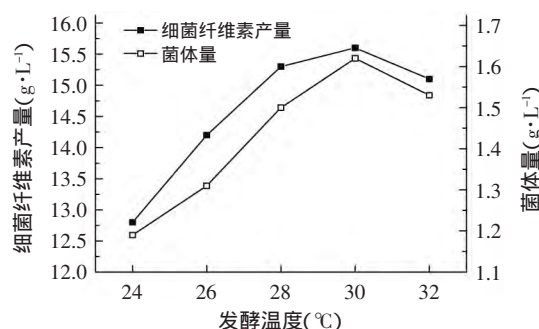


图4 不同温度下的细菌纤维素产量和菌体重量

Fig.4 Bacterial cellulose(BC) yield and cell weight under different temperature

产量的关系大致为正相关,这与先前文献报道的结论基本一致^[18-20]。菌体量和细菌纤维素产量在28~32℃之间处于较大,其中30℃的菌体量和细菌纤维素产量均为最大,分别为1.62g/L和15.6g/L。实验表明,突变株Y19-11的最适发酵温度为30℃。

2.5 突变株的适宜初始pH

在不同的初始pH下,突变株Y19-11静止发酵3d的菌体量和静止发酵10d的细菌纤维素产量如图5所示。在初始pH为5.0~6.0的范围内,菌体量和细菌纤维素产量较大,两者在初始pH为5.5时均达到最大。在细菌纤维素产生的同时,会伴随产生酸类代谢产物,发酵液的pH下降幅度较大,不利于菌种生长和发酵,但浅层静态发酵(目前细菌纤维素发酵的主要工艺)过程难以调解pH,因而初始pH的控制十分重要。从图5看出,突变株Y19-11的最适初始pH宜选择为5.5。

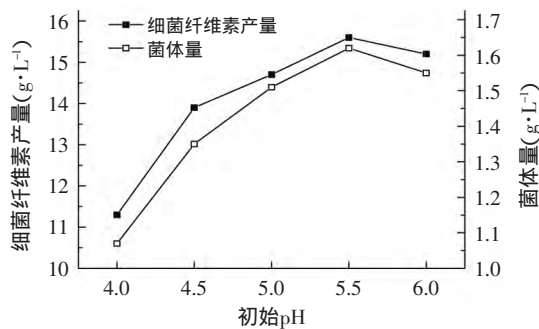


图5 不同初始pH下的细菌纤维素产量和菌体量

Fig.5 Bacterial cellulose(BC) yield and cell weight under different initial pH value

3 结论

目前,国内外研究人员的研究热点主要还集中在低值碳源、能源的筛选^[21-23],包括各种食品加工废渣、酿造废水等,细菌纤维素产量基本在10g/L以下,对优良菌种开展诱变育种的研究较少,本文以木糖酸醋杆菌BC13为出发菌株,利用紫外线对其进行诱变,筛选获得细菌纤维素产量增加幅度为10%的突变株8株。然后,利用硫酸二乙酯对8株紫外线突变株进行复合诱变,筛选获得产量比菌株BC13增加30%以上的突变株15株。其中,突变株Y19-11的产量最大,其产量达15.6g/L,比菌株BC13的产量增加44.4%。经过10次转接斜面 and 发酵,突变株Y19-11的发酵产量波动极小,表现了良好的遗传稳定性。分别在不同温度、不同初始pH下进行发酵,通过比较菌体量和细菌纤维素产量,确定突变株Y19-11的最适温度和初始pH分别为30℃和5.5。该菌株具有生产应用的潜力,但仍需对发酵条件进行深入的研究。

参考文献

- [1] Brown A J. On an acetic ferment which forms cellulose[J]. Journal of Chemical Society, 1886, 49: 432-439.
- [2] 曹海鹏,袁帅,赵昆,等. 细菌纤维素高产菌株的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 32(5): 211-214.
- [3] 陆胜民,贾静静,杨颖. 细菌纤维素发酵工艺与应用研究进

展[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 27-31.

- [4] Wang Yan, Luo Qingping, Peng Bihui, et al. A novel thermotropic liquid crystalline: Benzoylated bacterial cellulose[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(4): 875-879.
- [5] 王银存,李利军,马英辉,等. 细菌纤维素生产及应用研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 229(4): 20-23.
- [6] Peggy O S, Cannon R E. Acetobacter xylinum: An Inquiry into Cellulose Biosynthesis[J]. The American Biology Teacher, 2000, 62(6): 442-444.
- [7] Bae S Q, 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 BPR2001[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(3): 315-322.
- [8] 张雯,齐香君,李彦军,等. 醋酸杆菌Acetobacter xylinum pde基因敲除研究[J]. 陕西科技大学学报, 2013(5): 121-125.
- [9] 汤卫华,李飞,贾原媛,等. 细菌纤维素高产菌株的诱变选育和发酵条件研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(9): 1016-1019.
- [10] 邓毛程,吴亚丽,梁世中. 超声波促进高纤椰果发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 62-64.
- [11] 汤卫华,马霞,贾原媛,等. 木醋杆菌流加静置培养生产细菌纤维素[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 21-24.
- [12] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 133-147.
- [13] 帖金鑫,林娟,李小平,等. 耐酸耐胆盐嗜酸乳杆菌的紫外诱变选育[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(17): 111-115.
- [14] 李严军,廖杰琼,青文哲,等. 产类黄酮链霉菌的紫外线诱变选育[J]. 农产品加工·学刊, 2013(9b): 1-3.
- [15] 古丽娜孜,库米拉,张晓燕,等. 低温淀粉酶高产菌株的诱变选育[J]. 新疆农业大学学报, 2013, 36(4): 288-292.
- [16] 万中义,吴顺清,朱海云,等. 细菌纤维素高产菌株的诱变育种[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(12): 3067-3068.
- [17] B V Mohite, K K Kamalja, S V Patil. Statistical optimization of culture conditions for enhanced bacterial cellulose production by gluconacetobacter hansenii ncim 2529[J]. Cellulose, 2012, 19(5): 1655-1666.
- [18] 邵伟,乐超银,熊泽,等. 醋酸杆菌合成细菌纤维素的发酵动力学研究[J]. 中国酿造, 2005, 151(10): 26-28.
- [19] 齐香君,张雯,韩戎瑁,等. 细菌纤维素生产菌株的动力学研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 65-67.
- [20] 马霞,蔡可文,王瑞明,等. 细菌纤维素静态发酵生产的动力学模型的确定[J]. 河南工业大学学报:自然科学版, 2005, 26(1): 36-38.
- [21] Dehui Lin, Patricia Lopez-Sanchez, Rui Li, 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.
- [22] Fa'bio P Gomes, Nuno HCS Silva, Eliane Trovatti, et al. Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sacchari using dry olive mill residue[J]. Biomass and Bioenergy, 2013, 55: 205-211.
- [23] Jyh-Ming Wu, Ren-Han Liu. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 116-121.