

文章编号 :1673-2383(2014)05-0088-05

网络出版网址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20141029.1723.018.html>

网络出版时间 2014-10-29 17:23:36

细菌纤维素产生菌的筛选、鉴定及其产物分析

邓毛程¹,王 瑶¹,李 静¹,吴永辉²,张远平³

(1. 广东轻工职业技术学院 食品与生物工程系,广东 广州 510300;

2. 广州倚德生物科技有限公司,广东 广州 510300;3. 广州甘蔗糖业研究所,广东 广州 510316)

摘要:以自然发酵的椰子水为材料进行筛选,获得细菌纤维素高产菌株.通过平板分离、静态发酵等方法,获得一株细菌纤维素产量为 10.8 g/L 的菌株 BC13.经过形态特征、生理生化特征以及 16S rDNA 等方面的分析,菌株 BC13 被鉴定为木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*);其发酵产物经蒽酮法显色分析、红外光谱分析和扫描电镜观察,被证实为细菌纤维素.

关键词:细菌纤维素;筛选;鉴定;产物分析

中图分类号:TS201.3

文献标志码:B

0 引言

细菌纤维素(Bacterial cellulose,简称 BC)是由微生物(主要是细菌)合成的细胞外纤维素,在结晶度、化学纯度、抗张强度、弹性模量、吸水性和生物相容性等方面均优于植物纤维素,被认为是一种性能优异的新型天然生物纳米材料^[1-2].近年来,细菌纤维素的研究成为当今微生物合成材料领域的热点之一,并在生物医药、组织工程支架材料、声学器材、食品、化妆品、造纸等领域展现出巨大的应用潜力^[3-4].但是,自从 1886 年英国科学家 Brown^[5]发现细菌纤维素以来,由于细菌纤维素生产一直处于发酵产率低、生产成本高的状况,使其应用受到很大的局限^[6].为了提高细菌纤维素的发酵产率,笔者从自然发酵的椰子水中筛选、鉴定细菌纤维素高产菌株,并对其发酵产物进行分析,期望能够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 材料与试剂

筛选材料:经自然发酵产膜的椰子水,采样于海南省;新鲜椰子水:成熟椰子破壳取水;DNA 提取试剂盒、16S rDNA 的扩增引物以及 PCR 扩增试剂等:深圳华大基因科技服务公司;其他试剂均为市售.

1.2 仪器与设备

SPX-100B-Z 型生化培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;TS-211C 型振荡培养箱:上海天呈实验仪器制造有限公司;SHZ-82A 型恒温水浴振荡器: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;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.

1.3 平板分离

固体培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母膏 10 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L,琼脂 20 g/L,新鲜椰子水 50%(V/V),调节 pH 至 5.5,121 °C 灭菌 20 min.按固体培养基配方制备平板,备用.在无菌条件下,将表面的菌膜从自然发酵椰子水中取出,剪取 2 g 放入无菌试管中,加入 10 mL 无菌水,置于涡旋振荡器上振荡 5 min,再将悬液进行梯度稀释,涂布于平板培养基上,于 30 °C 恒温培养 72 h,观察菌落形态,然后挑取颗粒饱满的单个菌落,接入斜面培养基进行培养和保藏.

收稿日期 2014-04-23

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

作者简介 邓毛程(1971-),男,广东徐闻人,教授,研究方向为生物工程.

1.4 发酵筛选

液体培养基:葡萄糖 50 g/L,酵母膏 10 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L,新鲜椰子水 50%(V/V),调节 pH 至 5.5,121 °C 灭菌 20 min. 将液体培养基分装至 250 mL 三角瓶中,每瓶装液 100 mL,121 °C 灭菌 20 min,冷却后,将挑取菌落的斜面菌种接入液体培养基,每瓶接入 1 环,恒温 30 °C 静置培养 240 h,观察各菌株的产膜情况,并测定各瓶的细菌纤维素产量,根据测定结果优选出目标菌株.

1.5 菌种鉴定

采用革兰氏染色显微镜观察法和扫描电镜观察法^[7]鉴定菌种形态特征;按照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)的方法^[8-9],鉴定菌种的生理生化特征;参照文献^[10]的方法,对菌种的 16S rDNA 进行鉴定.在 16S rDNA 鉴定过程中,采用 1 对通用引物(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'和 5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')对菌种的 16S rDNA 进行扩增,PCR 产物送至深圳华大基因科技服务公司测序,然后在 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行同源性检索,并采用 MEGA5.1 软件以 Neighbor-joining 法构建系统发育树.

1.6 产物定性分析

用清水将目标菌株的凝胶膜状产物洗净,浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中煮沸 30 min,用蒸馏水漂洗至中性,再置于 105 °C 下进行干燥.产物的初步定性分析采用蒽酮显色法^[11],即称取干燥后的产物 0.1 g,加入 2~4 °C 60% 硫酸溶液 100 mL,于冰浴中消化 2 h,然后在比色管中分别加入消化液 4 mL 和 2% 蒽酮 1 mL,观察显色结果.另外,产物特征官能团的分析采用傅里叶红外光谱(FTIR)法^[12-13],即将干燥后的产物与 KBr 混合,研磨成粉末,经压片,通过傅里叶红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 区间内进行扫描,测定产物的红外吸收光谱,分析产物的官能团特征.

1.7 产物结构分析

参照文献^[14]的扫描电镜法,利用扫描电镜观察产物的微结构.

1.8 细菌纤维素产量的测定

采用称重法^[15]测定细菌纤维素的产量,即用清水将凝胶膜状产物洗干净,放入 0.1 mol/L NaOH 溶液中煮沸 30 min,用蒸馏水漂洗至中性,于 105 °C 的条件下干燥至恒重,然后准确称量干燥物的质量.

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选

从分离平板上挑取颗粒饱满的菌落 52 个,经过发酵复筛试验,其中凝胶膜产量居于前 9 位菌株的发酵结果如图 1 所示.可以看出,这 9 种菌株的细菌纤维素产量分布在 4.52~10.80 g/L 的范围内,产量排序为:BC13>BC07>BC19>BC26>BC10>BC28>BC02>BC37>BC41.菌种 BC13 的细菌纤维素产量最大,故被确定为进一步研究的优选菌种.

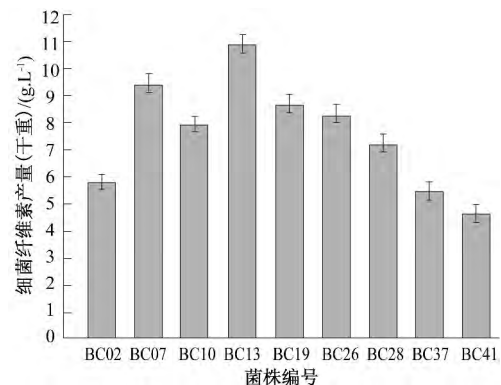


图 1 9 种菌株的细菌纤维素产量

2.2 菌种形态与生理生化特性的鉴定

经革兰氏染色和显微镜观察,菌种 BC13 呈阴性.如图 2 和图 3 所示,在透射电镜($\times 7\ 000$)和扫描电镜($\times 10\ 000$)下观察,菌体呈椭圆的杆状,大小为(0.4~0.6) $\mu\text{m} \times$ (1.3~2.8) μm ,周生鞭毛.菌种 BC13 的生理生化特征试验结果见表 1,根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《常见细菌系统鉴定手册》的描述,初步鉴定菌种 BC13 为醋杆菌属.

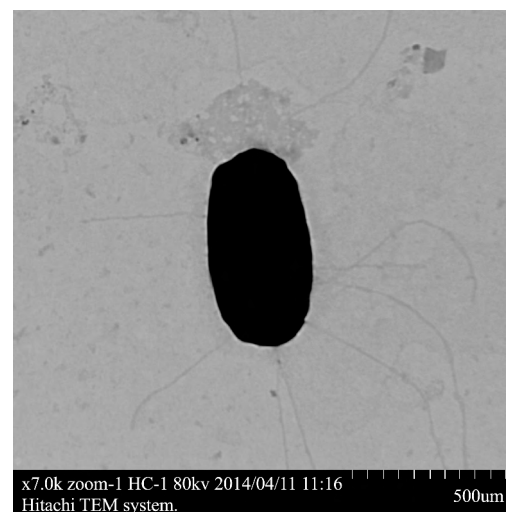


图 2 菌种 BC13 在透射电镜下的菌体形态 ($\times 7\ 000$)

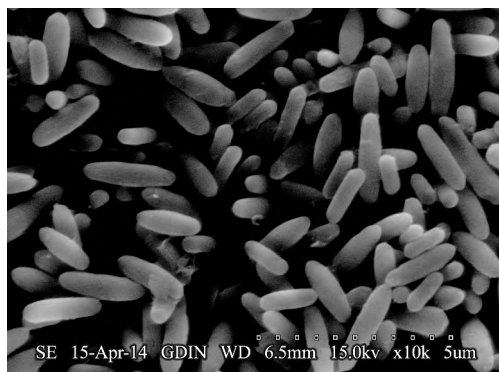


图 3 菌种 BC13 在扫描电镜下的菌体形态 ($\times 10\ 000$)

2.3 菌种 16S rDNA 的鉴定

菌种 BC13 的 16S rDNA 的 PCR 扩增产物大小为 1 453 bp, 将此序列在 NCBI 中进行 Blast 比较后, 发现菌种 BC13 与葡糖酸醋杆菌属 (*Gluconacetobacter*) 许多菌种的同源性达 99% 以上, 与其同源性达到 100% 的葡糖酸醋杆菌有 *Gluconacetobacter xylinus* 1-18 (登录号 KF030731.1)

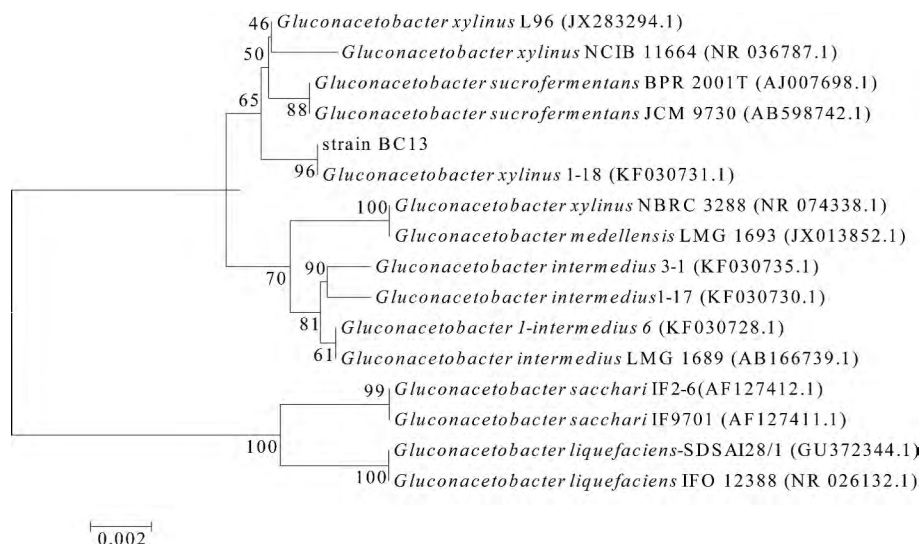


图 4 菌种 BC13 序列系统发育分析

2.4 产物的定性分析

菌种 BC13 的凝胶膜状产物在 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中煮沸 30 min, 没有发生溶解; 其干燥物经 60% 硫酸消化和蒽酮试剂显色, 呈绿色, 这与蒽酮显色法鉴定纤维素的原理吻合, 可以初步判断凝胶膜状产物的主要成分为纤维素. 发酵产物的红外光谱见图 5. 由图 5 可见, $3\ 584\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由 O—H 伸缩振动所致, $2\ 896\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是大分子中 C—H 伸缩振动所致, $1\ 664\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由纤维素 4' 端的半缩醛基的伸缩振动所致, $1\ 555\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 427\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$ 处的

表 1 生理生化试验结果

生理生化特征	属性	生理生化特征	属性
吲哚试验	-	乙醇氧化	+
V-P 试验	+	乙酸盐氧化	-
接触酶	+	乳酸盐氧化	-
H ₂ S 试验	-	葡萄糖生酸	+
淀粉水解	-	蔗糖生酸	+
明胶液化	-	葡萄糖生酮	-
硝酸盐还原	-	甘油生酮	+
辅酶 Q 类型	Q10	柠檬酸盐利用	+

注: + 表示阳性, - 表示阴性.

和 *Gluconacetobacter xylinus* G7-3 (登录号: KF030791.1). 如图 4 所示, 采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 也可以发现菌种 BC13 与 *Gluconacetobacter xylinus* 1-18 的亲缘关系最接近. 将菌种 BC13 的形态、生理生化等特征与 16S rDNA 鉴定结果结合起来, 可最终确定菌种 BC13 为木葡糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*).

吸收谱带是 C—H 的弯曲振动所产生, $1\ 205\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 061\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收谱带是由 C—O 的伸缩振动所产生. 图 5 表明, 发酵产物可能含有与纤维素结构相符合的基团, 其红外光谱的特征与相关文献中细菌纤维素的红外光谱基本一致^[1, 6], 因而可进一步推断发酵产物是细菌纤维素.

2.5 产物的结构分析

在扫描电镜 ($\times 8\ 000$) 下观察产物的超微结构如图 6 所示. 由于经过碱水煮沸处理, 几乎没有发现菌体残留在产物中. 产物呈现出由微纤维相互缠绕形成的致密网状结构, 纤维丝直径不足 100

nm. 图6的超微结构与相关文献中细菌纤维素的扫描电镜照片^[6,17]十分相似。

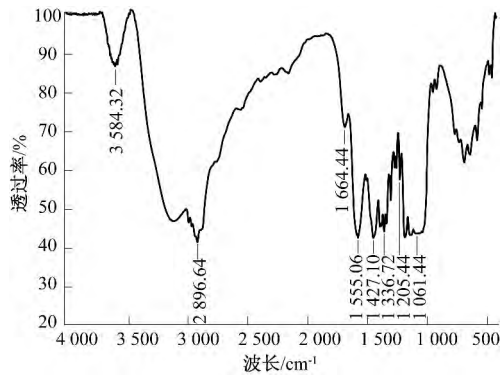


图5 菌种BC13产物的傅里叶红外光谱

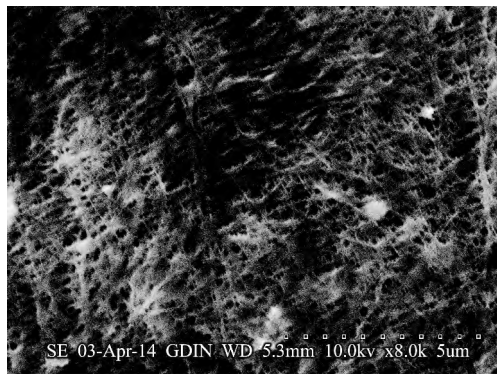


图6 菌种BC13产物的超微结构

3 结论

以自然发酵的椰子水为筛选材料,采用平板分离、静态发酵等方法筛选获得细菌纤维素产量为10.8 g/L的菌株BC13.经过形态特征、生理生化特征以及16S rDNA等方面的分析,鉴定菌株BC13为木醋杆菌.采用蒽酮显色法、红外光谱法对菌株BC13的发酵产物进行定性分析,同时采用扫描电镜对其超微结构进行观察,可推断菌株BC13的发酵产物为细菌纤维素.菌株BC13产纤维素能力较高,是一株具有应用潜力的菌株,为了使其更好地应用于细菌纤维素的研究和生产,其发酵工艺仍需进一步优化.

参考文献:

- [1] 谭玉静,洪枫.细菌纤维素的静态发酵及物理性质研究[J].纤维素科学与技术,2007,15(4):1-8.
- [2] Wang Yan, Luo Qingping, Peng Bihui, et al. A novel thermotropic liquid crystalline: Benzoylated bacterial cellulose [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(4): 875-879.
- [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] Jae Yong Jung, Taous Khan, Joong Kon Park, et al. Production of bacterial cellulose by *Glucanacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2007, 24(2):265-271.
- [5] Brown A J. XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose [J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1886, 49:432-439.
- [6] 施庆珊,冯静,冯劲,等.产细菌纤维素Axy-I菌株的鉴定及产物分析[J].生物技术,2010,20(4):55-58.
- [7] 诸葛健.工业微生物实验与研究技术[M].北京:科学出版社,2007.
- [8] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [9] R.E布坎南,N.E.吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.8版.北京:科学出版社,1984.
- [10] 魏长庆,王海庆,张凌,等.葡萄果醋发酵用醋酸菌的分离及鉴定[J].中国酿造,2010,29(4):42-44.
- [11] 吴瑛,刘天志,袁守亮.和田玫瑰残渣纤维素及蛋白质含量分析[J].江苏农业科学,2011,39(5):430-431.
- [12] Mazhar Ul-Islam, Jung Hwan Ha, Taous Khan, et al. Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92:360-366.
- [13] Bhavna V Mohite, Satish V Patil. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529 [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106:132-141.
- [14] Yang Ying, Jia Jingjing, Xing Jianrong, et al. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Glucanacetobacter intermedius* Cls26 [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92:2012-2017.
- [15] 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.
- [16] 关晓辉, 尹宗杰, 鲁敏, 等. 细菌纤维素发酵条件的优化及结构分析[J]. 中国酿造, 2010, 223(10): 68-71.
- [17] 李静, 朱平. 木醋杆菌发酵生产细菌纤维素的研究[J]. 合成纤维, 2008(6): 28-31.

SCREENING, IDENTIFICATION AND PRODUCT ANALYSIS OF A BACTERIAL CELLULOSE-PRODUCING STRAIN

DENG Mao-cheng¹, WANG Yao¹, LI Jing¹, WU Yong-hui², ZHANG Yuan-ping³

(1. Department of Food and Biological Engineering, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China; 2. Guangzhou Yide Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 511340, China; 3. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316, China)

Abstract: A high-yield bacteria cellulose (BC) strain was obtained by screening from naturally-fermented coconut water. The strain BC13 with the BC yield of 10.8 g/L was obtained by plate isolation, static fermentation and so on. Based on analysis on the morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA, the strain B13 was identified as *Gluconacetobacter xylinus*; and the fermentation products of the strain B13 was confirmed as BC by anthrone chromatography, IR spectrometric analysis and scanning electron microscope (SEM).

Key words: bacterial cellulose; screening; identification; product analysis

(上接第 87 页)

OPTIMIZATION AND PRODUCTION PROCESS IMPROVEMENT OF GELLAN GUM FERMENTATION MEDIUM

NIU Yong-li, ZHANG Xin-sheng, LIANG Le, TANG Chao-zhi

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In this study, we selected cheap raw materials to optimize the carbon source and nitrogen source of gellan gum fermentation medium; we also improved the dissolved oxygen of fermented liquid by processing a two-hole air distribution circle at the bottom of the tank to a six-hole air distribution circle; and we optimized the fermentation process based on the yield of gellan gum to obtain a fermentation process with production advantages. The results of a 50-L tank fermentation test showed that a 4.0 g/100 mL initial reducing sugar concentration could meet the requirement of a producing strain for carbon source in a 45-hour fermentation period; the optimum fermentation temperature was 28 °C; and the dissolved oxygen was not less than 30%. Under the optimum conditions, no extra carbon sources was required in the fermentation process; the rotation speed of the entire fermentation process was reduced by 50 r/min; and the yield of gellan gum was 25 g/L.

Key words: gellan gum; fermentation medium; production process