

发酵条件对木醋杆菌合成细菌纤维素影响的研究进展*

马霞¹,王瑞明¹,关凤梅¹,贾士儒²

(1.山东轻工业学院食品与生物工程系,山东 济南 250100;2.天津科技大学食品与生物工程学院,天津 300222)

摘要: 产细菌纤维素能力较强的微生物是木醋杆菌。影响较大的发酵条件有:①培养基中含有乳酸盐或甲硫氨酸,能加速细胞生长,提高纤维素产量。②当氧分压为大气压的 10%~15%时,纤维素的产量最高。提高溶氧会使气相的 CO₂ 分压同时加大,而降低纤维素的生成速率。③在发酵培养基中加入醋酸作为能源,能保持培养基中 pH 的稳定,有利于纤维素的生成。④在培养基中添加少量纤维素酶可提高纤维素的产量。分别添加 1.5% 的乙醇,0.1% 的醋酸,0.2% 的柠檬酸,纤维素的产量可分别提高 59.5%,44.4% 和 40.5%。(陶然)

关键词: 微生物; 细菌纤维素; 发酵条件; 生物合成; 木醋杆菌

中图分类号:Q93-33; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号:1001-9286(2005)01-0031-03

Effects of Fermentation Conditions on Biosynthesis of Bacteria Cellulose by *Acetobacter xylinum*

MA Xia¹, WANG Rui-ming¹, GUAN Feng-mei¹ and JIA Shi-ru²

(1.Food & Bioengineering Department of Shandong Light Industry College, Ji'nan, Shandong 250010; 2. Food & Bioengineering College of Tianjin Science & Technology University, Tianjin 300222, China)

Abstract: *Acetobacter xylinum* has strong bacteria cellulose-producing capability. And the following fermentation conditions are the key influential factors: ①culture medium containing lactate or methionine could accelerate cell growth and further increase cellulose output; ②when oxygen partial pressure 10%~15% of barometric pressure, cellulose output reached the highest. And increase of dissolved oxygen percentage would also increase gas phase CO₂ partial pressure, as a result, production rate of cellulose reduced; ③addition of acetic acid in fermented culture medium as energy source could maintain pH stability in culture medium helpful for cellulose generation; ④addition of small quantity of cellulase in culture medium could increase cellulose output. Addition of 1.5% alcohol or 0.1% acetic acid or 0.2% citric acid could increase cellulose output by 59.5% and 44.4% and 40.5% respectively. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; bacteria cellulose; fermentation conditions; biosynthesis; *Acetobacter xylinum*

纤维素是由葡萄糖基通过 β -1,4-糖苷键连接起来的大分子。自然界中有许多不同来源的纤维素,如植物纤维素、海藻纤维素和细菌纤维素等。其中细菌纤维素是由纯的 D-葡萄糖聚合而成,纯度极高,不掺杂其他多糖。近几年随着分子生物学的进步和人们对细菌纤维素本质和合成机理的认识深化,细菌纤维素在食品、医药、化工和精纺等方面已成功应用^[1]。已有研究表明产细菌

纤维素能力较强的微生物是木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)。微生物次生代谢产物的生成除取决于菌种本身的代谢特征外,还取决于发酵条件。前者是通过遗传因子决定代谢方式,决定了产物生成的可能性,后者是通过激活或调节各代谢途径中的物质、能量的分配而决定产物的生成与否、生成量的多少和生成速率的快慢等^[2]。影响微生物合成目的代谢产物的因素除培养基成分

* 天津市自然科学基金项目(编号:983606811)

收稿日期:2004-07-12

作者简介:马霞(1971-),女,山东人,博士,副教授,主要从事工业微生物发酵的教学与科研工作。

外,还包括 pH 值、温度、溶氧(DO)、种子状态(种龄、接种量等)、装液量和发酵周期等条件,可变因子较多^[3]。

1 培养基的组成对细菌纤维素生物合成的影响

1996 年日本的 Maanobu^[4]等人研究了搅拌培养条件下 *Acetobacter xylinum* 获得高产纤维素所需的培养条件,并且提出了一种适合纤维素生产的化学组成型培养基。他们在研究了几种不同的有机氮源如酵母膏、蛋白胨、玉米浸出液后,发现玉米浸出液对提高纤维素产量的影响最大。进一步研究化学组成后发现玉米浸出液中含有乳酸盐,而其他两种氮源中未含有此成分,而且将乳酸盐加入牛肉膏和蛋白胨中,同样可提高纤维素的产量,因此认为乳酸盐对纤维素的产生有很大影响。其作用机制可能是乳酸盐参与 TCA 循环,在生长早期,乳酸盐可促进代谢流从纤维素合成转向 TCA 循环,产生更多能量,加速了细胞生长,从而提高了整体的纤维素产量。他们还研究了添加氨基酸对纤维素产生的影响,发现甲硫氨酸是高产纤维素所必要的,其主要作用在于它可以缩短延迟期,提高纤维素产量。

Young Kook Yang 等人^[5]从自然界中分离出一株性状稳定的纤维素产生菌 *A.xylinum* BPR5。BPR5 不能将果糖氧化成葡萄糖酸,以葡萄糖和果糖为混合碳源能显著提高纤维素产量。

Hiroshi Toyosaki 等人^[6]从水果中分离得到一个在动态培养时细菌纤维素产量高的菌株,经鉴定是 *A.xylinum* 的新亚种,命名为 *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans* BPR2001,简称为 *Acetobacter* sp. BPR2001。以果糖和玉米浆作为培养基培养,在带有倾斜挡板的摇瓶和 3 L 发酵罐中,细菌纤维素产量分别为 4.4 g/L 和 7.7 g/L。

纤维素的合成和细胞生长之间有一定联系,因此,可通过增强细菌的生长能力来提高纤维素的生成。Atsushi Ishikawa^[7]研究发现,在促使细胞生长和纤维素合成的诸多因素中,添加对氨基苯甲酸(PABA)对 *Acetobacter* sp. BPR2001 的生长有明显的促进作用。从 BPR2001 选育得到一株 PABA 结构类似物磺胺胍的抗性突变株 BPR3001E,能利用 44 g/L 果糖生产出 9.7 g/L 纤维素,这比原菌株产量高出 40 %。

2 氧分压和 CO₂ 对发酵的影响

1995 年日本的 Kunikiko 等人^[8]发现氧分压对纤维素的产量以及纤维素膜的物理特性均有很大影响。实验结果表明,当氧分压为大气压的 10 %~15 %时,纤维素的产量最大,而随氧分压的提高,细胞的生长变化不大。为揭示其作用机制,他们测定了不同的氧分压下二氧化碳的浓度,发现氧分压越大,二氧化碳的浓度越高。说明

氧分压增大时,细胞呼吸作用加强,从而使 TCA 循环加速,促使葡萄糖转向 TCA 循环,而产生的纤维素相对减少。还发现当氧分压增大时,纤维素膜的韧性增强,而在 10 %~15 %时通常得到较为柔软的膜,而且电镜显示微纤的宽度在氧分压不同时无太大的变化,而微纤两个分支点之间的距离则有所不同,因此,这可解释纤维素膜的韧性为何在不同氧分压下有所不同。

细菌纤维素的发酵是一种非牛顿型高粘度性质的发酵,采用增加罐压的办法提高溶氧会使气相的 CO₂ 分压(P CO₂)也同时加大,从而降低细菌纤维素的生產速率。这可能是由于生长或呼吸受到抑制,而细菌纤维素的生產速率又取决于氧耗速率,细菌纤维素的生產需消耗 ATP,而 ATP 在胞内的含量也会受高 P CO₂ 的抑制。T. Kouda 等^[9]在 50 L 发酵罐中研究通入含 10% CO₂ 的空气对细菌纤维素生产的摄氧率、细胞生长速率、ATP 浓度的影响。实验结果表明,高 P CO₂(15.2~20.3 kPa)会减少细胞浓度、细菌纤维素生產速率与得率。当提高摄氧率与活细胞的 ATP 含量时,则细菌纤维素的比生长速率提高。这说明高 P CO₂ 引起细菌纤维素的生產速率降低是由于减少细胞生长而不是抑制细菌纤维素的生物合成,这可能是基质过多地消耗在 ATP 的生成上。

3 pH 对细菌纤维素合成的影响

Satoshi Masaoka 等人^[10]研究了初始 pH2.5~7.7 对细菌纤维素产量的影响,培养 3 d,发现 pH 值在 4.0~6.0 时细菌纤维素的产量较高。在许多报道中都提到了对 *Acetobacter xylinum* 发酵产生细菌纤维素的初始 pH 需要在 7.0 以下。

Kiyoshi Toda^[11]从醋酸连续发酵(醋酸的浓度为 2 %)过程中分离出一株具有醋酸抗性的产粘胶状纤维素膜的细菌。经鉴定,它属于 *A.xylinum*。在葡萄糖培养基(葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 5 g/L,柠檬酸 1.15 g/L,NaH₂PO₄ 2.7 g/L)中加入醋酸 20 g/L,静态培养,纤维素的产量相对于不具醋酸抗性的菌株提高了 4 倍。实验发现纤维素产量的提高不是由于 pH 值的下降引起的,而是与加入的有机酸有关。有机酸主要不是作为生产细菌纤维素的底物,而是作为能量物质起作用。

E. J. Vandamme^[12]等人采取了菌种筛选、诱变、培养基成分的优化以及发酵过程中因子的控制,通过静态培养将细菌纤维素的产量提高到 28.2 g/L,而深层发酵的 L,而深层发酵的产量为 9 g/L。所采用的培养基中的葡萄糖和果糖是作为碳源,而醋酸更多是作为细菌生长所需的能源。由于在 *A.xylinum* 生长过程中本身会利用葡萄糖产酸,当发酵过程进行时,培养基的 pH 值也会随之降低,从而不利于菌体生成纤维素。而当发酵培养基中加入醋酸作为能源时,由于醋酸的不断被消耗而使培

培养基的 pH 值上升,因此醋酸的消耗与葡萄糖产酸双方面作用保持了培养基 pH 值的稳定,从而有利于纤维素的生成。他们还发现在通气搅拌培养的条件下,在培养基中加入一些不溶的微粒,有利于提高纤维素的产量。

4 纤维素酶及其他因子对细菌纤维素合成的影响

N. Tonouchi 等人^[13]发现,在 *A. xylinum* 发酵培养基中加入少量的纤维素酶可以提高纤维素的产量,减少副产物 acetan 的生成。纤维素酶是由内葡聚糖酶、胞外葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶构成的一种多酶复合体。但在纤维素合成中起重要作用的是内葡聚糖酶的酶活力。在 *A. xylinum* 生产纤维素的过程中加入从 *Bacillus subtilis* 中获得的内葡聚糖酶可以提高纤维素的产量,并且它降低了细菌纤维素生成过程中副产物乙酰的生成。而酶活性位点发生变异的内葡聚糖酶(没有酶活力)虽然仍有与纤维素连接的能力,但对纤维素的生物合成没有影响。由此可以推出,在纤维素合成中起重要作用的是内葡聚糖酶本身的酶活力而不是它与纤维素的连接能力。这种在酶影响下生成的纤维素与用原有的方法生成的纤维素无不同之处。

N. Tonouchi^[14]发现添加少量的纤维素酶(其中主要是葡萄糖苷酶),可以在早期提高纤维素的产量,能降低其他胞外多糖尤其是 acetan 的产量,但是对最终纤维素的产量提高不大。其可能的机制是纤维素酶可使细胞的增倍时间缩短一半。最近,R. Standal^[15]报道了在几株纤维素产生菌的培养基中存在着它自己产生的降解纤维素的酶活力,但是具体的机制仍然不清楚。

马霞、贾士儒等^[16]研究发现,在静止培养条件下,乙醇、醋酸和柠檬酸对木醋杆菌合成细菌纤维素的产量都有不同程度的增效作用。其中,添加 1.5 % 的乙醇,细菌纤维素产量提高了 59.5 %;添加 0.1 % 的醋酸,细菌纤维素的产量提高了 44.4 %;添加 0.2 % 的柠檬酸,细菌纤维素的产量提高了 40.5 %。

Jose D. Fontana^[17]将咖啡因和黄嘌呤添加至培养基中,发现细菌纤维素的产量有所提高。咖啡因抑制了磷酸二酯酶(PDEA)的活性,使环状二鸟苷酸(C-di-GMP)的量增加,使纤维素合成酶保持较高活性,从而提高细菌纤维素的合成速度。实验发现,添加含有咖啡因和黄嘌呤的茶抽提物的纤维素产量是没有添加的 3~9 倍。

参考文献:

- [1] Membrane & Separation Technology News Group. Bacterial cellulose metallized for PEMs [J]. Membrane & Separation Technology News, 2002, 20(6):6.
- [2] Moat AG., Foster JW. Microbial Physiology(3rd ed.)[M]. New York:Wiley-liss, a John Wiley & Sons, inc., publication, 1995,305-403.
- [3] Cruz R., Arias ME., Soliveri J. Nutritional requirements for the production of pyrazoloisquinolinone antibiotics by *Strepto-*

- myces griseocarnus* NCIMB 40447[J]. Applied Microbiological biotechnology, 1999,53:115-119.
- [4] Maanobu Matsuoka, Takayasu Tsuchida, Kazunobu Matsushita, et al. A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucofermentans*[J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1996,60(4):575-579.
- [5] Young Kook Yang, Sang Hoon Park, Jung Wook Hwang, et al. Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under Agitated Condition[J]. J. of Fermentation and Bioengineering, 1998,85(3) :312-317.
- [6] Hiroshi Toyosaki, Takaaki Naritomi, Masanobu Matsuoka, et al. Screening of Bacterial Cellulose-producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture[J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1995,59(8):1498-1502.
- [7] Atsushi Ishikawa, Masanobu Matsuoka, Takayasu Tsuchida. Increase in Cellulose Production by Sulfaguanidine-resistant Mutants Derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucofermentans*[J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1995,59(12): 2259-2262.
- [8] Kunihiro Watanabe and Shigeru Yamanaka. Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1995,59(1):65-68.
- [9] Tohru Kouda, Takaaki Naritomi, Hisato Yano, et al. Effect of Oxygen and Carbon Dioxide Pressure on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Aerated and Agitated Culture [J]. J. of Fermentation and Bioengineering, 1997,84 (2):124-127.
- [10] Satoshi Masaoka, Tatsuhiko Ohe and Naokazu Sakota. Production of Cellulose from Glucose by *Acetobacter xylinum* [J]. J. of Fermentation and Bioengineering, 1993,75(1): 18-22.
- [11] Kiyoshi Toda, Tomoko Asakura, Masahiro Fukaya, et al. Cellulose Production by Acetic Acid-Resistant *Acetobacter xylinum*[J]. J. of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84 (3):228-231.
- [12] E. J. Vandamme. Improved production of bacterial cellulose and its application potential[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998,59:93-99.
- [13] Naoto Tonouchi, Sueharu Horinouchi, Takayasu Tsuchida, et al. Increased Cellulose Production from Sucrose by *Acetobacter* after Introducing the Sucrose Phosphorylase Gene [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1998,62(9):1778-1780.
- [14] Naoto Tonouchi, Takayasu Tsuchida, Fumihiro Yoshinaga, Teruhiko Beppu and Sueharu Horinouchi[J]. Bio. Bio., 1996, 60:1377-1379.
- [15] Claire Boisset, Henri Chanzy, Bernard Henrissat, et al. Digestion of Crystalline Cellulose Substrates by the *Clostridium Thermocellum* Cellulosome: Structural and Morphological Aspects [J]. Biochem. J. 1999, 340:829-835.
- [16] 马霞,王瑞明,贾士儒,等.非碳水化合物对木醋杆菌合成细菌纤维素影响规律的初探[J].中国酿造, 2003, (4):15-17.
- [17] Rune Standal, Tore-Geir Iversen, Dag H. Coucheron, et al. A New Gene Required for Cellulose Production and a Gene Encoding Cellulolytic Activity in *Acetobacter xylinum* Are Colocalized with the *bcs* Operon [J]. J. of Bacteriology, 1994,176(3):665-672.