

# 不同种驹形氏杆菌合成纤维素最适碳源

## Study on optimal carbon sources of *Komagataeibacter* spp. for bacterial cellulose synthesis

陈华美<sup>1</sup> 李从发<sup>1</sup> 毕继才<sup>1</sup> 章 翠<sup>1</sup>

CHEN Hua-mei<sup>1</sup> LI Cong-fa<sup>1</sup> BI Ji-cai<sup>1</sup> ZHANG Cui<sup>1</sup>

胡淇淞<sup>1</sup> 王艳梅<sup>1</sup> 刘四新<sup>1,2</sup>

HU Qi-song<sup>1</sup> WANG Yan-mei<sup>1</sup> LIU Si-xin<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学食品学院, 海南海口 570228; 2. 海南大学材料与化工学院, 海南海口 570228)

(1. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**摘要:**研究不同碳源对驹形氏杆菌的几个不同菌种(*Komagataeibacter nataicola*、*K. hansenii* 和 *K. europaeus*) 在细胞生长、代谢及纤维素(Bacterial cellulose, BC)合成方面的影响,旨在揭示不同纤维素产生菌对碳源的偏好和适应性。结果表明:*K. europaeus* 以果糖为碳源合成 BC 的产量最大,*K. nataicola* 和 *K. hansenii* 利用葡萄糖时产 BC 的能力最佳。不同菌种合成 BC 时与其细胞生物量、碳源的消耗量及副产物葡萄糖酸等的积累之间未呈一致的相关性,说明每种菌的碳源消耗与产物合成并非必然与生物量呈正相关,而只需三者间达到合适平衡。该研究可为针对具体原料(碳源)选择合适菌种进行 BC 生产、提高原料利用效益提供有益借鉴。

**关键词:**驹形氏杆菌;细菌纤维素;碳源适应性;菌种差异

**Abstract:** In order to reveal the preference and adaptability of different cellulose-producing species for the carbon source, the influences of carbon sources on *Komagataeibacter* spp. (*K. nataicola*, *K. hansenii* and *K. europaeus*) for growth, metabolism and BC synthesis were studied. The main results were as follows: the BC production was the largest by *K. europaeus* with fructose as the carbon source, while *K. nataicola* and *K. hansenii* with glucose as the carbon source. In addition, the results showed that the ability to synthesize BC by different species was not consistent with the cell biomass, gluconic acid and carbon source consumption, and it indicated

that the carbon source consumption and the BC production were not necessary to be relevant to cell growth, but to be properly balanced. Therefore, it is not only very necessary to select the appropriate carbon source for different species, but also can provide a useful reference for the selection of suitable species and improving the utilization efficiency of the specific raw materials for BC production.

**Keywords:** *Komagataeibacter*; bacterial cellulose; carbon source adaptability; species characteristic

驹形氏杆菌(*Komagataeibacter*)是目前已知的纤维素合成能力最强的一属细菌,广泛应用于细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)和椰果(nata de coco)(即食品工业中应用的细菌纤维素)的生产。截止目前,已报道该属中有纤维素合成能力的菌种有 14 个<sup>[1]</sup>,如 *K. xylinus*、*K. nataicola*、*K. rhaeticus*、*K. europaeus*、*K. swingsii*、*K. hansenii* 等<sup>[2-4]</sup>。其中,*K. xylinus* 是最早被当作细菌纤维素合成机理、代谢调控等理论研究的模式菌种,也是商业化生产和应用开发最常用的菌种<sup>[5]</sup>。

在 BC 研究领域,较多的工作是从各个角度提高菌种的 BC 合成能力,增加产率、降低成本。众所周知,BC 合成是一个受多种酶共同调控的复杂代谢过程,受碳源、氮源、无机盐、生长因子等多种因素的影响。其中,碳源是最基本也是最重要的影响因素之一,而葡萄糖、蔗糖等通常是许多细菌的速效碳源。Chao 等<sup>[6]</sup>考察了 *K. xylinus* BPR2001 在不同浓度果糖中合成 BC 的能力,指出果糖浓度为 60 g/L 时,合成 BC 的产量最大。Mikkelsen 等<sup>[7]</sup>研究了 *K. xylinus* ATCC 53524 对 HS 培养基中的葡萄糖、甘露醇、甘油、果糖、蔗糖、半乳糖等碳源的偏好,发现其较偏爱蔗糖和甘油。Santos 等<sup>[8]</sup>为考察 *K. sucrofermentans* CECT 7291 合成 BC

**基金项目:**海南省自然科学基金项目资助(编号:314048);海口市热带农产品深加工重点实验室项目(编号:2013-45)

**作者简介:**陈华美,女,海南大学在读硕士研究生。

**通讯作者:**刘四新(1967-),女,海南大学教授,博士。

E-mail: sixin0808@126.com

**收稿日期:**2016-02-01

的能力,研究蔗糖、葡萄糖、丙三醇不同碳源对其合成能力的影响,发现果糖是其最适碳源,产量达 2.74 g/L。此外,Mohammadkazemi 等<sup>[9-11]</sup>也对培养基的组成进行了优化。说明针对某一具体菌种,优化培养基组成是最重要的研究,也是最受关注的、提高 BC 产率的首选措施之一。

本课题组一直从事 BC 的研究,保藏有多个驹形氏杆菌属的菌种。为探明不同菌种在碳源利用方面的适应性和偏好差异,本试验拟从不同碳源对几种驹形氏杆菌(*K. nataicola*、*K. hansenii* 和 *K. europaeus*)在其生长、代谢及 BC 合成方面的影响进行研究,旨在广泛了解不同菌种合成 BC 的营养特性,为 BC 和椰纤果的发酵生产在原料和菌种的匹配选择方面提供有益借鉴。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌种和菌株

*K. nataicola* Y19、*K. hansenii* NQ5、*K. europaeus* 1.1812:本实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基(RAE)<sup>[12]</sup>:葡萄糖 40 g/L,酵母提取物 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.38 g/L,Citric acid·1H<sub>2</sub>O 1.50 g/L,用盐酸调 pH 值至 6.0,于 121 °C 下灭菌 20 min,冷却备用;

斜面固体培养基:用 RAE 种子培养基添加 2%的琼脂;  
发酵培养基:碳源 20 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g/L;

碳源分别是葡萄糖、果糖和半乳糖,于 121 °C 下灭菌 20 min,冷却备用。

#### 1.2 主要仪器设备

自动压力蒸汽灭菌锅:G154DW 型,致微仪器有限公司;  
立式双层恒温培养箱:SKY-2112B 型,金坛市盛蓝仪器有限公司制造公司;

高速冷冻离心机:Biofuge Stratos 型,德国 Thermo 公司;

电热鼓风干燥箱:101-1-BS 型,上海跃进医疗器械厂;  
液相色谱仪:Agilent 1260 型,安捷伦科技有限公司等。

### 1.3 方 法

1.3.1 不同菌种的发酵 分别取一环活化好的斜面种子接种至 20 mL RAE 培养基中,于 30 °C 静置培养 48 h 制备种子液。再以 2%(V/V)接种至装有 60 mL 不同碳源发酵培养基的 100 mL 三角瓶中,混匀后于 30 °C 下静置培养,定时各取一瓶检测发酵液中各指标,每个处理设 3 个重复。

1.3.2 BC 产量测定 取发酵液中的 BC 膜,用蒸馏水反复冲洗。再置于 0.1 mol/L NaOH 中,经 80 °C 水浴一定时间,直到膜呈白色或乳白色,接着用去离子水多次浸泡至溶液呈中性,然后于 80 °C 烘箱中干燥至恒重,即为 BC 干重(g/L)。

1.3.3 生物量的测定 参照文献<sup>[13]</sup>。发酵培养物(含 BC 膜的发酵液)经 4 °C 12 000×g 离心 10 min,将上清液合并于一 20 °C 保存备用,沉淀用去离子水离心清洗 2 次,接着置

于含 1%(m/V)纤维素酶(10 000 U/g, Yakult, Japan)的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 5.0)中于 50 °C 水浴 2 h。待 BC 膜完全溶解,将酶解液于 4 °C 12 000×g 离心 10 min,所得沉淀再用去离子水洗涤离心 2 次。最后,将离心沉淀物于 80 °C 烘箱干燥至恒重,即为以干重计的细胞生物量(g/L)。

1.3.4 碳源消耗量的测定 采用 DNS 法测定发酵液中的残糖,用不含碳源的发酵培养基作空白对照,碳源消耗量(g/L)以起始糖含量扣除发酵液中的残糖量来计算。

1.3.5 其他指标的测定 采用高效液相色谱法<sup>[14]</sup>对发酵液中主要副产物葡萄糖酸和乙酸的浓度进行测定。测定条件:色谱柱为 ZORBAX-SB-Aq (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为水溶液(用高氯酸调 pH 值至 2.5),流速为 0.6 mL/min;柱温 30 °C;进样量 10 μL。样品处理:取适量离心保存的发酵液用去离子水稀释一定倍数,0.22 μm 滤膜过滤。采用内标法和外标法对其进行定性和定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌种的 BC 产量与其生物量的关系

对菌种在不同碳源中细胞的生长情况和 BC 产量进行了动态监测。不同菌种产 BC 的量与其生物量间的关系见图 1,发现 *K. europaeus*、*K. hansenii* 和 *K. nataicola* 的 BC 合成与其细胞生长之间的相关性并非一致。当以半乳糖为碳源时,3 种菌的生物量都最低且增长较为平缓,未呈现对数生长的典型特点;*K. europaeus* 以葡萄糖作碳源时生物量最高,呈现较明显的对数生长特点,而 *K. hansenii* 和 *K. nataicola* 以果糖作碳源时生物量最高,其对数增长特点也不典型。

由图 1 可知,*K. europaeus* 对 3 种糖的适应性差异较大,合成 BC 以果糖为最适碳源;*K. hansenii* 和 *K. nataicola* 的最适碳源为葡萄糖,且 *K. hansenii* 以 3 种糖为碳源时,生物量都不高,而 BC 产量却都较高。在生物量达到最高的葡萄糖为碳源时,*K. europaeus* 的 BC 产量未达到最高;在生物量最高的果糖培养基中,*K. hansenii* 和 *K. nataicola* 的 BC 产量也未达到最高。*K. hansenii*、*K. nataicola* 在果糖和半乳糖培养基中生物量相差 2~3 倍,而 BC 产量却差异不大;在半乳糖培养基中三菌种的生物量虽然最低,但 *K. nataicola*、*K. hansenii* 的 BC 产量并未达最低。由此说明,在所考察的 3 种菌中,并未呈现细胞生物量高其 BC 产量也高的特点。这种 BC 产物并不与细胞生物量间呈正相关的原因可能与 BC 产物形成的特殊性有关,菌体在分泌纤维素的同时又被包裹于纤维素凝胶之中,其增殖情况与在溶液中状态并不相同。而且结合长期研究的经验发现,产纤维素的这类细菌的细胞增长呈现一种特殊规律,即由于菌体不直接处于溶液中,其细胞增殖并不会出现衰亡期,而能一直随着纤维素凝胶膜的增厚持续增殖。

### 2.2 不同菌种的 BC 产量与 pH 变化的关系

培养基的 pH 值既影响菌体生长也影响代谢产物的合成。由图 2 可知,3 种菌都在葡萄糖培养基中 pH 变化最剧烈且降幅最大,在果糖培养基中下降不多、变化相对平缓,在

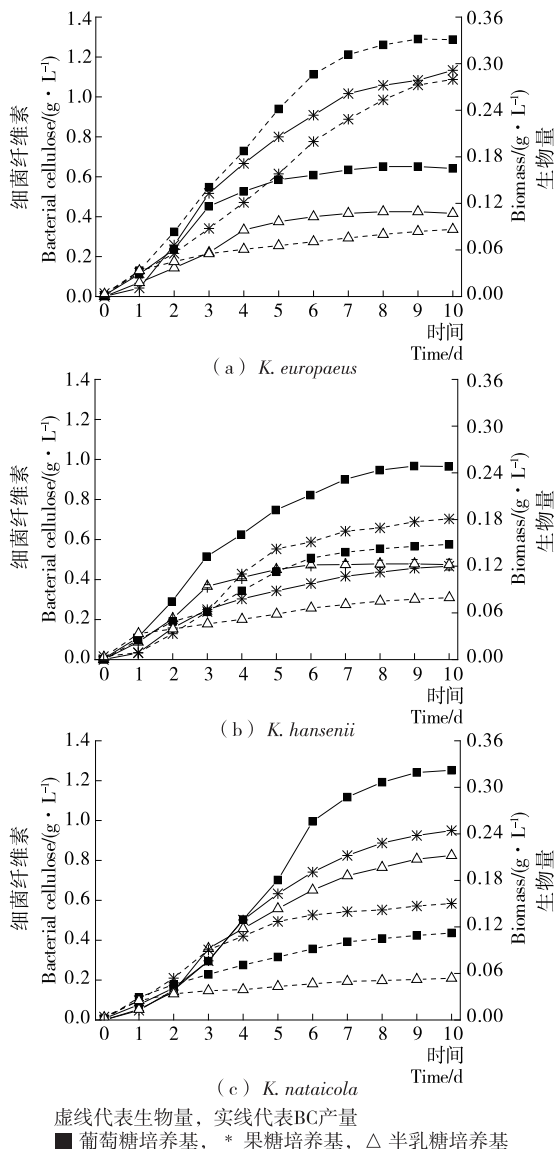


Figure 1 Relationship between BC production by different species and biomass

半乳糖中变化居中。但 3 种菌在果糖培养基中的 BC 产量, 仅 *K. europaeus* 的达到最高, *K. hansenii* 和 *K. nataicola* 的都是在葡萄糖培养基中最高, 说明不同菌种的 pH 变化并非同向地影响 BC 的产量水平, 这可能是所采用的菌种对 pH 值耐受的范围较大<sup>[15]</sup>, 不足以影响其产物 BC 的合成水平, 而碳源种类通过直接影响合成途径的起始端、影响 BC 合成的前体物 (UDPGlc) 的供应水平, 成为最主导的影响因素。

### 2.3 不同菌种的 BC 产量与碳源消耗的关系

一般地, 菌种消耗的碳源一方面用于菌体细胞增殖, 另一方面用于产物合成。由图 3 可知, *K. europaeus* 在葡萄糖培养基中碳源的消耗最大, 但 BC 产量并未达最高, 因其生物量最大 (见图 1); *K. hansenii*、*K. nataicola* 在葡萄糖作碳源时消耗也非常大, 其 BC 合成产量却达到最高水平, 因为其生物量不大 (见图 1)。说明碳源消耗与细胞生物量和产物合成

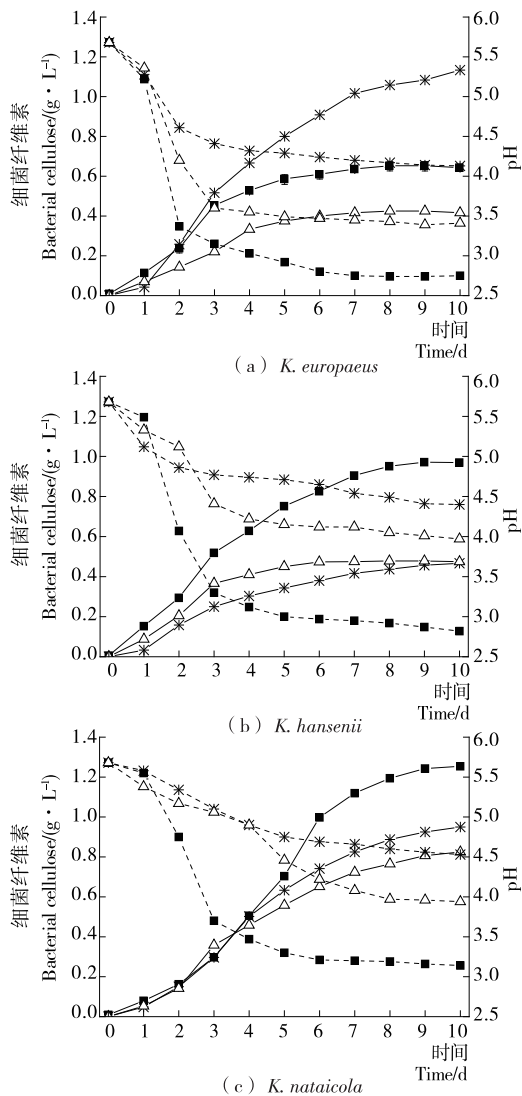


Figure 2 Relationship between BC production by different species and pH change

之间需达到恰当的平衡, 并与 pH 变化相匹配, 才能获得最佳的产物收获。

### 2.4 不同菌种的 BC 产量与代谢副产物的关系

BC 合成途径的起始阶段, 葡萄糖-6-磷酸在变位酶催化下生成葡萄糖-1-磷酸, 也可被脱氢氧化生成葡萄糖酸-6-磷酸, 后者将经过磷酸戊糖 (HMP) 途径供应细胞所需的戊糖和还原力等<sup>[16]</sup>, 但若葡萄糖酸过多, 将直接影响纤维素合成的前体物 (UDPGlc) 的供应水平而影响 BC 的产量<sup>[13]</sup>。因此, 筛选葡萄糖酸合成水平适中的菌种有利于提高目标产物 BC 的合成水平。

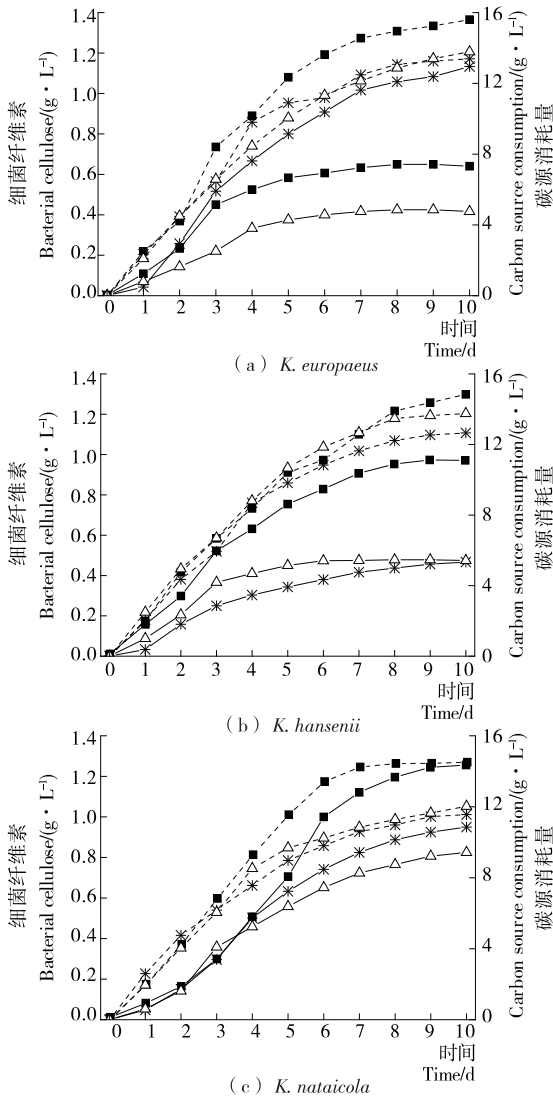
由表 1 可知, *K. europaeus* 在葡萄糖培养基中副产物葡萄糖酸产量很高, 乙酸也较高, 因此其 pH 值降幅较大 (见图 2), 同时还可解释其细胞生物量大 (见图 1), 碳源消耗也大 (见图 3), 但 BC 产量却不高的原因; 而其利用果糖时由于葡萄糖酸副产物很少 (未检出), 生物量也不太大, 故其 BC 产

表1 发酵结束后不同菌种BC产量与葡萄糖酸、乙酸的关系<sup>†</sup>

Table 1 Relationship between BC yield and glucose acid, acetic acid production by different species after fermentation

菌种	葡萄糖培养基			果糖培养基			半乳糖培养基		
	BC	乙酸	葡萄糖酸	BC	乙酸	葡萄糖酸	BC	乙酸	葡萄糖酸
<i>K. europaeus</i>	0.64	0.33	11.73	1.13	0.96	ND	0.42	0.17	3.98
<i>K. hansenii</i>	0.97	0.22	9.98	0.46	0.67	ND	0.47	0.11	1.83
<i>K. nataicola</i>	1.25	0.27	7.40	0.95	0.75	ND	0.83	0.20	1.54

† ND. 表示未检出。



虚线代表碳源消耗, 实线代表BC产量  
 ■ 葡萄糖培养基, \* 果糖培养基, △ 半乳糖培养基

图3 不同菌种的BC产量与碳源消耗的关系

Figure 3 Relationship between BC production by different species and carbon source consumption

量在果糖培养基中达到最高水平(1.13 g/L); *K. hansenii* 和 *K. nataicola* 由于在葡萄糖培养基中生物量不大, 副产物葡萄糖酸也不太高, 故较大的碳源消耗(见图3)可以获得最高的BC产量; 在果糖培养基中, 各菌种由于细胞生物量最大,

尽管副产物葡萄糖酸很少, 但其主产物BC产量仍处于居中水平。因此综合分析, *K. europaeus* 以果糖为最适碳源, *K. hansenii* 和 *K. nataicola* 以葡萄糖为最适碳源。从碳源利用的角度来看, 半乳糖培养基中适宜以 *K. nataicola* 为菌种进行BC生产, 果糖培养基中适宜以 *K. europaeus* 为菌种进行BC生产, 葡萄糖培养基中宜以 *K. nataicola* 为菌种进行BC生产。

### 3 结论

本研究利用合成培养基成分明确且稳定的特点, 通过驹形氏杆菌属的几个常见菌种考察了它们在不同碳源中合成BC能力的情况。结果表明: *K. europaeus* 以果糖为碳源时细胞增殖量适中, 葡萄糖酸等副产物量少, pH值下降幅度不大, 因此合成BC的产量最高, 为1.13 g/L; 而 *K. hansenii* 和 *K. nataicola* 以果糖为碳源时因细胞生物量太大, 导致BC产量(0.98 g/L)不高, 而以葡萄糖为碳源时其代谢能力更强, 且细胞生物量适中, 从而合成BC的产量最大(1.25 g/L); 3种菌以半乳糖为碳源合成BC的水平都最低, 而当需要利用原料中半乳糖碳源时, 选择 *K. nataicola* 进行BC生产才是较合适的。同时发现不同菌种合成BC时与其细胞生物量、碳源的消耗量及副产物葡萄糖酸等积累之间并未呈一致的相关性, 说明每种菌的碳源消耗与产物合成并非必然与生物量呈正相关, 而只需三者间达到合适平衡。可见, 研究菌种对碳源的适应性和偏好性, 可针对具体菌种来筛选最有利于BC合成的合适碳源, 而且可为针对具体原料(碳源)选择合适菌种进行BC生产、提高原料利用效益提供试验依据。

### 参考文献

[1] Yamada Y. Transfer of *Gluconacetobacter kakaiceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakaiceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. [J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2014, 64(5): 1 670-1 672.

[2] Akasaka N, Ishii Y, Hidese R, et al. Enhanced production of branched-chain amino acids by *Gluconacetobacter europaeus* with a specific regional deletion in a leucine responsive regulator [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(6):

- 607-615.
- [3] Bi Ji-cai, Liu Si-xin, Li Cong-fa, et al. Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(5): 1 305-1 311.
- [4] Mohite B V, Patil S V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529 [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 106: 132-141.
- [5] Tanskul S, Amornthatree K, Jaturonlak N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2; Screening and optimization of culture conditions [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(1): 421-428.
- [6] Chao Y, Sugano Y, Shoda M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(6): 673-679.
- [7] Mikkelsen D, Flanagan B M, Dykes G A, et al. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(2): 576-583.
- [8] Santos S M, Carbajo J M, Villar J C. The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration [J]. *BioResources*, 2013, 8(3): 3 630-3 645.
- [9] Mohammadkazemi F, Azin M, Ashori A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117: 518-523.
- [10] Sarkar D, Yabusaki M, Hasebe Y, et al. Fermentation and metabolic characteristics of *Gluconacetobacter oboediens* for different carbon sources [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1): 127-136.
- [11] Zeng Xiao-bo, Small D P, Wan Wan-kei. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85(3): 506-513.
- [12] Andres-Barral C, Saad M M, Chappuis M L, et al. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(6): 1 701-1 717.
- [13] Zhong Cheng, Zhang Gui-cai, Liu Miao, et al. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6 189-6 199.
- [14] Keshk S M. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99: 98-100.
- [15] Trcek J, Jernejc K, Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression [J]. *Extremophiles*, 2007, 11(4): 627-635.
- [16] Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in Bacteria [J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(1): 35-58.

## 信息窗

# 研究发现牛奶的一种组分能够促进长双歧杆菌生长

对于新生儿来说,母乳是最佳食物。母乳中含有大量的有益成分,包括防止婴儿生病的抗体以及婴儿生长发育所需要的脂肪、蛋白以及必要维生素。

母乳中还含有低聚糖碳水化合物,近期研究发现这种物质的作用类似于益生菌,有利于婴儿肠道菌群生长。

让肠道微生物健康生长非常重要。研究认为,婴儿最初的肠道菌群会影响其他栖息在肠道内的微生物种类。让错误的微生物寄居在体内会造成各种紊乱,比如肥胖症,甚至是帕金森氏症。

婴儿肠道微生物比健康成年人的肠道微生物简单的多。通常,他们的肠道仅由单一微生物主宰,即新生儿长双歧杆菌。“婴儿肠胃内 90%以上是这种微生物。”美国加州大学戴维斯分校的 David Mills 说。

如果双歧杆菌达不到应有的数量,那些潜在的有害细菌可能会趁机介入。“例如一种拟杆菌属的微生物就会趁

机而入,占据主导地位,从而导致造成食物中毒的大肠杆菌的生长。”Mills 说。

现在,Mills 的团队发现,牛奶的一种组分能够促进长双歧杆菌生长。研究人员利用一种酶将牛奶中的低聚糖和蛋白质分开,尝试在不同的组分上生长这种细菌,长双歧杆菌不能在提取自牛奶的蛋白质中生长,但是在低聚糖组分中却产生了惊人的效果,可以促使这种细菌快速生长。

“这样的研究结果让我们有些吃惊,因为母乳和牛奶如此不同。”Mills 说。他表示,这意味着牛奶甚至是其他动物的乳汁也能够为婴儿食品配方提供类似的益生菌。

英国阿伯丁大学的 Karen Scott 对此表示赞同。“这样如果能用一种酶分解牛乳,就能获得难以通过人工合成的有益且廉价的低聚糖来源。”她说。

(来源:www.foodmate.net)