

文章编号: 1674-7054(2018)02-0198-05

# 乙醇对不同菌种合成纤维素的影响及 高产菌株对乙醇的敏感性和耐受性

贾佳<sup>1</sup>, 陈华美<sup>1</sup>, 王艳梅<sup>1</sup>, 邵璐滢<sup>1</sup>, 刘晓兰<sup>1</sup>, 李从发<sup>1</sup>, 刘四新<sup>1,2</sup>

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

**摘要:**为研究细菌纤维素(BC)的高效合成,并探讨影响高效合成稳定性的因素,笔者在 Asai 合成培养基中添加乙醇,分析其对 8 个不同菌种合成 BC 产量的影响,并选出高产菌种,以高产菌株为模型,研究其对乙醇促进性影响的敏感性和耐受性范围。结果表明:不同菌种合成 BC 对“乙醇影响”的效应不同,其中驹形杆菌属的 5 个菌种和茂物朝井杆菌(*A. bogorensis*)都表现出促进效果,以椰冻驹形杆菌(*K. nataicola*)和木驹形杆菌(*K. xylinus*)的促进作用最显著( $P < 0.05$ ),驹形杆菌属的 1 个未知种(*K. sp.*)影响不显著( $P > 0.05$ ),欧洲驹形杆菌(*K. europaeus*)则表现出抑制作用。筛选到 1 株“乙醇促进”响应敏感性高且耐受力好的菌株(*K. nataicola*)Y19,当添加 0.5%乙醇时增产 6.6 倍,添加 1%乙醇时产量达最大  $7.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,增产 8.3 倍,乙醇最适添加量为 1.0%~1.5%。之后,随添加量增加产量增幅降低,直到乙醇添加量达 5%时其 BC 产量才开始低于对照,显示受到抑制,产量降幅为 44%。该菌株对“乙醇促进”的浓度响应范围较大,为 0.5%~4%。本研究对椰子水自然放置预发酵后用于 BC 生产的大规模应用具有重要指导意义,筛选到的高效促进和抑制合成的这 2 种截然相反影响效应的菌株也为后续乙醇影响机制的深入研究奠定了良好基础。

**关键词:**细菌纤维素;乙醇促进作用;驹形杆菌属;茂物朝井杆菌;敏感性;耐受性

中图分类号:TS 201.2

文献标志码:A

DOI:10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.02.011

细菌纤维素(Bacterial cellulose, BC)由于具有区别于植物纤维素的高纯度、高结晶度、高聚合度以及良好的亲水性、持水力、生物相容性、生物可降解性等优良特性,被广泛应用于生物材料、医疗、食品、化工等领域,又由于其生物合成时可人为调控、合成后可进行结构修饰,细菌纤维素早已被世界公认为性能优异的新型生物材料,成为目前材料学研究领域非常活跃的研究热点<sup>[1-4]</sup>。然而,细菌纤维素除了在食品工业以“椰纤果、椰果、nata de coco”为名作为食品配料或添加剂广泛应用外,在其他商业化大规模应用上还存在成本高、产率低、性能稳定性差等问题亟待解决。因此,如何有效提高生产效率和调控产品性能是细菌纤维素研究领域的热点和难点问题,尤其是在合适的高产菌株与合适的发酵工艺方面。早在 1972 年 Weber et al.就认为乙醇可以促进醋化醋杆菌(*Acetobacter aceti*)生长,并受葡萄糖的调控<sup>[5]</sup>。之后, Takaaki et al.发现添加低于  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙醇能够提高 BC 合成速率和产量,但过量则会使乙酸大量积累反而限制细胞生长、降低 BC 的合成<sup>[6]</sup>。苟金霞等人在考察乙醇对木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)合成纤维素的影响时发现乙醇能使菌体更好繁殖,使 BC 产量快速增加,而起到能源的作用<sup>[7]</sup>。Joong et al.在用汉森葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter hansenii*) PJK 以摇瓶培养方式合成 BC 时,在添加 1%乙醇后 BC 产量在第 5 天达到  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,为此认为乙醇促其增产的原因是减少了培养基中纤维素合成阴性突变体<sup>[8]</sup>。Lee et al.研究了乙醇对 *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145 发酵生产 BC 和乙酸的影响,发现在苹果汁培养基中添加 2%乙醇时 BC 产率最高,当乙醇为 5%时则可以同时生产 BC 和乙酸<sup>[9]</sup>。虽然这些文献均报

收稿日期:2018-04-22

修回日期:2018-05-15

基金项目:预发酵椰子水的微生物菌相解析及促进细菌纤维素合成的机理(No.31660485)

作者简介:贾佳(1991-),女,海南大学食品学院 2015 级硕士研究生.E-mail:354420034@qq.com

通信作者:刘四新(1966-),女,教授,博士,研究方向:食品生物技术.E-mail:sixinliu@126.com

道了各种 BC 生产菌在添加乙醇后的增产效应,但同时对比研究多个不同种、不同属的菌种对“乙醇影响”的效应,筛选出高效菌株,研究高效菌株对乙醇影响的敏感性和耐受性方面的相关研究均未见报道。海南是全国椰纤果的生产基地,主要用于食品工业,部分用于面膜等化妆品行业,均以椰子水为主要发酵生产原料。行业中一个棘手的现实问题是发酵生产不稳定,产量时高时低,严重影响该产业的持续健康发展。笔者通过筛选高产菌种、进行“敏感性和耐受性”研究,试图从理论上探讨高产菌种在生产中出现的“高产稳定性不佳”的制约因素,为解决行业发展的瓶颈问题提供理论指导,同时,筛选获取 BC 高效稳定合成的发酵工艺可为后续代谢调控研究、乙醇影响机制研究奠定前期基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 实验菌株 *Komagataeibacter xylinus* (木驹形杆菌) *K. swingsii* (斯温驹形杆菌) *K. rhaeticus* (莱蒂亚驹形杆菌) *K. europaeus* (欧洲驹形杆菌) *K. hansenii* (汉森驹形杆菌) *K. nataicola* LMG 1536(椰冻驹形杆菌 LMG 1536) *K. nataicola* Y19(椰冻驹形杆菌 Y19,简称 Y19) *K. nataicola* D6(椰冻驹形杆菌 D6,简称 D6) *K. sp.* Y15(驹形杆菌属 Y15,简称 Y15) *Asaia bogorensis*(茂物朝井杆菌)本实验室保存。

RAE 培养基:葡萄糖  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,酵母提取物  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,蛋白胨  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$   $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,Citric acid  $1.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,自然 pH。

Asai 发酵培养基:葡萄糖  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH 自然。

在液体培养基中添加 1.5%~2%的琼脂可制备固体培养基。各培养基均在  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  下灭菌 20 min,冷却备用。

1.2 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);高效液相色谱仪(Agilent1260型,安捷伦科技有限公司)。

1.3 种子液制备 取一环活化好的斜面菌苔接种至 RAE 液体培养基中,于  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 48 h 制备各菌株的种子液。按 2%的量接种一级种子液于 RAE 培养基中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 24~48 h 制备二级种子液备用。

1.4 乙醇对各菌种 BC 合成的影响 取各菌株的种子液以 2%(下同)的接种量分别接种至含 1%、2%、3%(下同)乙醇(过滤除菌)的 Asai 发酵培养基中,摇匀、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$  静置培养 7 d,收获表面的 BC 膜,测定干质量。

1.5 高效菌株对乙醇的敏感性和耐受性 将筛选出的高产菌株按 2%接种量接种至含不同体积分数(0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%)乙醇(过滤除菌)的 Asai 发酵培养基中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$  静置培养 7 d,收获 BC 膜,测定干质量。

1.6 纤维素产量的干质量测定 用清水反复冲洗发酵所得的 BC 膜,去除表面杂质后,将其浸泡在  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 的溶液中, $80 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴处理至膜呈乳白色半透明状,然后用 0.5% 冰醋酸浸泡中和,再用去离子水冲洗至表面 pH 呈中性,后置于  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱烘至恒重,称其干质量。

1.7 数据处理方法 利用 SPSS 对数据进行统计分析,使用 Origin 作图。

## 2 结果与分析

2.1 乙醇对不同菌种合成细菌纤维素的影响 目前报道能产生纤维素的微生物涉及 15 个属,其中驹形杆菌属 *Komagataeibacter*(Yamada et al.重新分类、自葡萄糖酸醋杆菌属 *Gluconacetobacter* 中分出,为独立新属<sup>[10]</sup>)中的一些种生产 BC 的能力最强,研究最多<sup>[11]</sup>。笔者为深入研究乙醇在 BC 合成过程中的作用机制,对保存的 8 种 10 株产 BC 的微生物进行“乙醇响应”的对比研究。为避免天然培养基(如椰子水培养基)的不稳定,使实验数据可靠、对比性强,采用了 Asai 合成培养基进行添加乙醇的研究。结果发现不同菌种合成 BC 对“乙醇影响”的响应差异较大(图 1),其中欧洲驹形杆菌 *K. europaeus* 的 BC 合成受到抑制,BC 产量降幅最低达 40%,乙醇添加越多,产量降幅越大。另一个未知种 Y15 显示乙醇对其 BC 合成的影响不显著( $P > 0.05$ )。此外,驹形杆菌属(*Komagataeibacter*)的 5 个种和茂物朝井杆菌(*Asaia bogorensis*)共 6 个种都显示产量呈增加趋势,其中椰冻驹形杆菌 *K. nataicola* 的增幅最大。其 3 个不同来源的菌株(1 个模式菌

株 2 个分离于自然发酵椰子水)都显示出对乙醇的良好响应, Y19 菌株在加 1%乙醇(下同)时的 BC 产量是对照的 6.14 倍; MGI536 菌株在加 2%乙醇时的 BC 产量为对照的 4.54 倍; D6 菌株在加 1%乙醇时的 BC 产量为对照的 3.14 倍。这可能与该菌种的天然生态位有关, 椰冻驹形杆菌在长期进化过程中形成了“椰子水 - 自然发酵产生了乙醇 - 为避免乙醇影响其中的细菌进化出产生胞外多糖(细菌纤维素)的功能 - 从而保护了菌体”的自然生存逻辑, 使其具有了相应的遗传背景。木驹形杆菌(*K. xylinus*) 在加 2%乙醇时 BC 增幅最大(为对照的 3.40 倍), 加 3%乙醇时产量增幅虽有所下降, 但仍达对照的 2.1 倍, 显示其具有较高的乙醇耐受性。*K. rhaeticus* 和 *K. hansenii* 在加 2%乙醇时产量分别为对照 2.38 的倍和 1.70 倍, 乙醇增加至 3%时仍具有促进作用, 只是产量增幅有所下降, 而 *K. swingsii* 在加 1%乙醇时产量为对照的 1.50 倍, 增加乙醇后产量增幅逐渐下降。此外, 茂物朝井杆菌 *A. bogorensis* 在加 1%乙醇时产量为对照的 1.22 倍, 增加乙醇后产量增幅也下降。这与汉森驹形杆菌 (*K. hansenii*) 的相关添加乙醇的研究报道不尽相同, Joong et al. 添加 1%乙醇时其 BC 产量为  $2.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (为对照的 1.78 倍) 增加乙醇时 BC 产量则下降<sup>[8]</sup>; Li et al. 添加 2%乙醇时 BC 产量为  $2.87 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 比对照增加 1.42 倍, 这可能是菌株不同, 对“乙醇响应”的敏感性和增幅效应不同所致<sup>[12]</sup>。另外, Mohammadkazemi et al. 报道添加 1%乙醇时 *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 的 BC 产量与产率分别增加了 57.7% 和 54.9%, 且乙醇可以改变细菌纤维素的性质<sup>[13]</sup>。可见, 通过对比性试验, 显示出乙醇对多种细菌合成 BC 具有促进作用, 促进作用强弱呈显著种间差异 ( $P < 0.05$ )。在这些常见而重要的菌种中, 椰冻驹形杆菌 *K. nataicola* 为 BC 合成能力较强且对“乙醇促进响应”也最强, 其中 Y19 为典型的高效菌株。通过对比, 笔者同时找到了响应“乙醇影响”不显著和具有抑制作用的菌株, 这对后续遗传分子水平深入研究乙醇影响机制打下了重要基础。

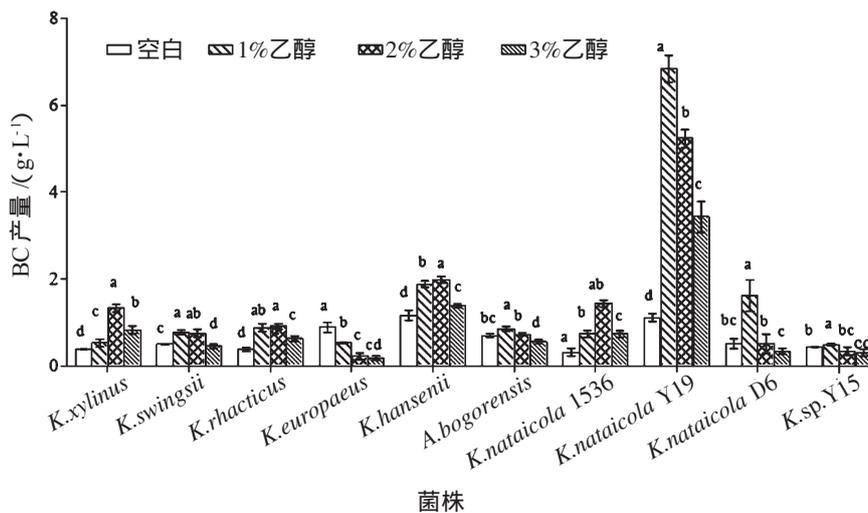


图 1 乙醇对各菌株合成 BC 的影响

Fig.1 Effect of ethanol on the synthesis of BC by different strains

2.2 Y19 菌株对乙醇的敏感性和耐受性研究 本课题组前期已揭示椰子水经过“自然放置预发酵”(海南椰子加工行业特点所决定)后含有各种微生物及其代谢产物, 包括酵母菌和乙醇。为了从“乙醇含量”角度探寻“发酵不稳定”的原因, 笔者所获高产的菌种进行乙醇的耐受性和敏感性研究, 结果(图 2)表明, 在 Asai 合成培养基中添加 0.5%~5%乙醇时, *K. nataicola* Y19 发酵合成 BC 的能力呈极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 当乙醇添加量仅为 0.5%时, 合成 BC 的产量比对照提高 6.9 倍; 当增加乙醇至 1%时, BC 的产量继续升高达到峰值  $7.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 比对照提高了 8.3 倍; 随乙醇体积分数进一步增加, BC 产量虽然仍比对照显著增加, 但增幅逐渐呈下降趋势, 当添加量为 1.5%时, 产量比对照增加 7.8 倍, 却比峰值下降 10%左右, 差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 即统计学上的乙醇最适添加量为 1.0%~1.5%; 但当添加 2%时, 产量比对照增加 6.1 倍, 却比峰值下降 23%, 幅度达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 添加量为 4%时, TB 比对照增产, 但当添加达 5%时, 其 BC 产量比对照下降 44%, 比峰值下降 94%。这表明高产菌株 Y19 合成 BC 虽然对“乙醇影响”呈高敏感性

强响应,仅需添加 0.5%就有极显著增产作用( $P < 0.01$ ),也表现出较好的“乙醇影响”耐受性,当添加体积分数达 4%时,产量仍能比对照显著增加( $P < 0.05$ ),当添加 5%时,其 BC 合成才开始受到抑制。但是,从另一个参照角度分析,在高于最适乙醇添加范围(1.0%~1.5%)后,该菌株的 BC 合成相比于峰值水平其实已呈“抑制状态”,说明该菌株受“乙醇促进”是有浓度限制范围的,本课题组将进一步深入研究。

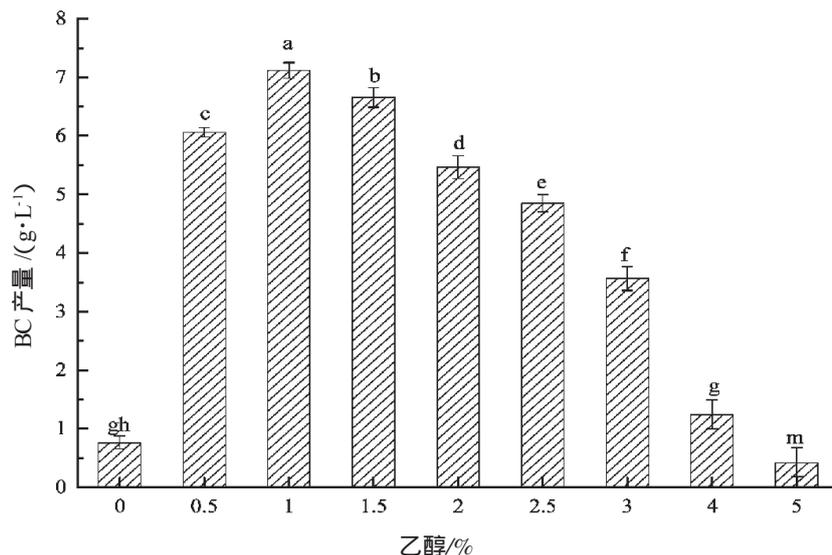


图2 不同体积分数的乙醇对 *K. nataicola* Y19 合成 BC 的影响

Fig.2 Effect of ethanol on BC synthesis by *K. nataicola* Y19

### 3 讨论

以合成培养基为基础,研究以膜滤法添加不同体积分数的乙醇后,8个不同菌种(共10株)合成BC的响应情况。结果表明,乙醇对驹形杆菌属的5个种和茂物朝井杆菌共6个菌种都表现出促进效果,促进作用强弱呈显著性种间差异,其中以椰冻驹形杆菌 *K. nataicola* 和木驹形杆菌 *K. xylinus* 的促进作用最显著,驹形杆菌属的1个未知种(*K. sp.*)影响不显著,欧洲驹形杆菌(*K. europaeus*)则表现出抑制作用。10株BC产生菌中,以椰冻驹形杆菌 Y19 菌株对“乙醇促进”的响应最敏感,增产幅度最大,当添加 0.5%乙醇时BC比对照增产 6.6倍,当添加 1%时增产 8.3倍,产量达最大 7.12 g·L<sup>-1</sup>,乙醇最适添加量为 1.0%~1.5%。之后,随添加量增加,产量增幅不断降低,直至添加达 5%时,其BC产量才开始低于对照,说明该菌株对“乙醇促进”的体积分数响应范围较大,为 0.5%~4%,耐受浓度也较高。但是,与添加 1.0%~1.5%的乙醇时的最佳水平相比,更大添加量时BC合成已表现为相对的“抑制状态”。这一结果对BC的大规模生产具有重要指导意义,可能正是产业化生产实践中“产量不稳定”的重要原因:未加控制、随意放置预发酵的椰子水中的乙醇含量是波动的,且随环境条件和预发酵时间不同而不同。在生产中必须控制每批培养基中乙醇浓度在一定范围才能保证BC产量的持续稳定高产。另一方面,本研究筛选获得的高效促进和截然相反效应(抑制合成)以及不受乙醇影响的各种菌株,可为后续进一步在遗传分子水平上深入研究乙醇影响机理奠定良好基础。

### 参考文献:

- [1] Santos S M, Carbajo J M, Quintana E, et al. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 116:173 - 181.
- [2] 孙勇慧,刘鹏涛,刘忠. 细菌纤维素的应用进展[J]. 材料导报, 2015, 29(5):62- 67.
- [3] Gama M, Gatenholm P, Klemm D. Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material[M]. CRC Press, 2012.
- [4] Picheth G F, Pirich C L, Sierakowski M R, et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104(A):97.

- [5] Weber P, Ettliger L. The effect of glucose on the utilization of ethanol by a strain of *Acetobacter acetic* [J]. *Pathologia et microbiologia*, 1972, 38(1): 26 - 30.
- [6] Takaaki N, Tohru K, Hisato Y, et al. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 85(6): 598 - 603.
- [7] 苟金霞, 齐香君, 贺小贤, 等. 乙醇对提高细菌纤维素产量的影响[J]. *食品研究与开发*, 2005(1): 55 - 57.
- [8] Joong K P, Jae Y J, Youn H P. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(24): 2055 - 2059.
- [9] Lee O S, Jang S Y, Jeong Y J. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145 [J]. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2003, 32(2): 182 - 184.
- [10] Yamada Y Y P, Lan Vu H T, Muramatsu Y, et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*) [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2012, 58: 397.
- [11] Shi ZJ, Zhang Y, Phillips GO, et al. Utilization of bacterial cellulose in food [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30: 1-7.
- [12] Li Y, Tian C, Tian H, et al. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(6): 1479-1487.
- [13] Mohammadkazemi F, Doosthoseini K, Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734) [J]. *Cellul. Chem. Technol*, 2015, 49(5-6): 455-462.

## The Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Synthesis by Different Bacterial Species and the Sensitivity and Tolerance of High-yield Bacterial Strains to Ethanol

JIA Jia<sup>1</sup>, CHEN Huamei<sup>1</sup>, WANG Yanmei<sup>1</sup>, SHAO Luying<sup>1</sup>, LIU Xiaolan<sup>1</sup>, LI Congfa<sup>1</sup>, LIU Sixin<sup>1,2</sup>

(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)

**Abstract:** In order to study the efficient synthesis of bacterial cellulose (BC) and the factors affecting the stable high yielding BC synthesis, 8 cellulose-producing bacterial species were cultured in Asai chemically-defined medium to observe the effects of ethanol on BC synthesis to select high yielding bacterial species. These high yielding species were used as models to analyze their sensitivity and tolerance to ethanol. The results showed that the effects of ethanol on the 8 cellulose-producing species were quite different in BC synthesis. Of the 8 cellulose-producing species, 5 from the genus *Komagataeibacter*, and *Acetobacter bogorensis* were improved in BC synthesis, especially *K. nataicola* and *K. xylinus* which had most significant improvement ( $P < 0.05$ ), while an unknown species from the genus *Komagataeibacter* was not significantly improved and *K. europaeus* was inhibited in BC synthesis. A *K. nataicola* strain Y19 was screened to show high sensitivity and tolerance to ethanol. This strain increased BC yield sharply by 6.6 times in the Asai medium supplemented with 0.5% (similarly hereinafter) ethanol and by 8.3 times to  $7.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  at the presence of 1% ethanol, and then declined gradually the growth rate of BC synthesis with the increase of ethanol in the Asai medium. The BC yield of the strain was 44% lower than that of the control when the Asai medium was added with ethanol by up to 5%. This suggested that *K. nataicola* Y19 had an improving effect in response to ethanol at a wide range of concentrations from 0.5% to 4%, which would explain the vital significance to the large-scale BC production practice by using natural pre-fermented coconut water. On the other hand, one high yield and one inhibition strain were selected, which would lay good foundation for further mechanism study on ethanol effect.

**Keywords:** bacterial cellulose producing bacterial strain; improving effect of ethanol; *Komagataeibacter*; *A. bogorensis*; sensitivity and tolerance

(责任编辑: 钟云芳)