

# *Acetobacter xylinum* NUST4 合成细菌纤维素 发酵条件的优化

周伶俐 孙东平\* 吴清杭 杨树林

(南京理工大学化工学院生物工程系 南京 210094)

**摘要:** 采用均匀设计法优化了 *Acetobacter xylinum* NUST4 的基础培养基, 向其中添加了  $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、对氨基苯甲酸、烟酸、生物素、乙醇, 优化后的发酵培养基组成为: 葡萄糖 24g, 蔗糖 22g, 蛋白胨 16g, 醋酸 2.4mL, 磷酸氢二钠 3.5g, 磷酸二氢钾 1g, 硫酸镁 6g, 硫酸亚铁 0.015g, 烟酸 0.003g, 生物素 0.02g 和乙醇 20mL, 纤维素产量达 9.87g, 定容至 1L, 比由 S-H 培养基发酵合成的纤维素产量 (仅  $0.74g \cdot L^{-1}$ ) 提高了 12 倍。

**关键词:** *Acetobacter xylinum* NUST4, 细菌纤维素

**中图分类号:** TQ92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0096-04

## Optimum Culture Conditions for Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* NUST4

ZHOU Ling-Li SUN Dong-Ping\* WU Qing-Hang YANG Shu-Lin

(Department of Bioengineering, School of Chemical Engineering, Nanjing University of  
Science & Technology, Nanjing 210094)

**Abstract:** The optimum culture conditions for *Acetobacter xylinum* NUST4 which produces bacterial cellulose (BC) were obtained by uniform design method. BC production was dependent on  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  and cosubstrates such as *p*-aminobenzoic acid, nicotinamide, d-Biotin and ethanol. The optimal medium contained glucose 24g, sucrose 22g, peptone 16g, HAc 2.4mL,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  3.5 g,  $KH_2PO_4 \cdot H_2O$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  6 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.015g, nicotinamide 0.003 g, d-Biotin 0.02g and ethanol 20mL in 1L culture medium. BC yield reached 9.87g (the dried weight) in stationary culture for 7 days, which was 12-fold higher than that in the S-H medium.

**Key words:** *Acetobacter xylinum* NUST4, Bacterial cellulose

细菌纤维素 (BC) 是由某些微生物合成得到的超微纯纤维素, 是维管束植物、地衣植物以及一部分藻类细胞壁的主要成分<sup>[1]</sup>。与自然界中存在的植物纤维素相比, 具有纯度高、结晶度高、重合度高、吸水性强、抗张强度好、生物适应性强等独特的性质, 因为植物纤维素中还包括木质素、半纤维素和含蜡芳香物, 所以细菌纤维素作为一种新型生物材料受到了科学界的广泛关注。如今 BC 已成功地应用于食品、生物医学、造纸、声学器材、化妆品、三次采油、膜滤器、具有环保性能的纸杯等领域<sup>[2,3]</sup>, 为扩大 BC 的工业化生产和开发应用领域, 需筛选性能稳定的菌种、优化发酵条件以提高产量并利用聚合物表征的分析方法来进一步研究 BC 的结构、性能和功能。

本文采用均匀设计法优化 *A. xylinum* NUST4 的基础培养基, 并向其中添加一些生长

\* 通讯作者 Tel: 025 84315256, E-mai: dongpingsun@163.com

收稿日期: 2005-03-03, 修回日期: 2005-05-30

因子,从而提高其产量。

1 材料与方法

1.1 菌种

*Acetobacter xylinum* NUST4 由本实验室筛选并保藏。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 斜面培养基:葡萄糖 30g,蛋白胨 10g,柠檬酸 1.15g,磷酸氢二钠 2.7g,硫酸镁 0.25g,琼脂 18g,自来水定容至 1L, pH 为 6.0。

1.2.2 种子培养基:葡萄糖 20g,蛋白胨 10g,柠檬酸 1.15g,磷酸氢二钠 2.7g,硫酸镁 0.25g,自来水定容至 1L, pH 为 6.0。

1.2.3 基础发酵培养基:葡萄糖 15g,蔗糖 10g,蛋白胨 15g,醋酸 0.8mL,磷酸氢二钠 2.7g,磷酸二氢钾 1g,硫酸镁 0.25g,自来水定容至 1L, pH 为 6.0。

1.2.4 培养方法:种子培养基中接入斜面菌种后 28℃, 150r/min, 培养 6h~8h, 按 8%接种量接种于基础发酵培养基中 28℃静置培养 7d 后提取。

1.3 细菌纤维素产量测定

将 *A. xylinum* NUST4 发酵生成的纤维素膜取出后,先用自来水冲洗,再浸泡于 80℃的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中保温 2h,至膜呈乳白色半透明,最后用去离子水彻底漂洗至溶液成中性为止,然后将膜(保持平整)置于 80℃烘箱中干燥至恒重,于室温称重<sup>[4]</sup>。纤维素产量表示为: g·L<sup>-1</sup> 培养液。

1.4 基础培养基的优化方法

均匀设计法<sup>[5]</sup>和 SAS 软件回归处理。

1.5 发酵参数测定

pH 值测定:使用上海理达仪器厂的 PHB5 微机型酸度计;残糖测定:DNS 法<sup>[6]</sup>;细菌浓度测定:于 420nm 波长下直接测光密度 OD。

2 结果与讨论

2.1 均匀设计优化基础培养基

*A. xylinum* NUST4 合成细菌纤维素,根据已有的实验结果确定考察基础培养基中的 5 种成分及其浓度(%)范围:A:葡萄糖 2.0~3.0, B:蛋白胨 1.5~2.6, C:蔗糖 1.0~3.2, D:醋酸 0.1~0.2, E:磷酸氢二钠 0~0.55,将各因素的考查范围分成 12 个水平,选用 5 因素 12 水平的均匀设计表 U<sub>13</sub><sup>\*</sup> (13<sup>12</sup>) 安排实验(见表 1)。

表 1 试验条件的安排和结果

试验号	A	B	C	D	E	纤维素 Y (g·L <sup>-1</sup> )
1	2.0	2.0	2.4	0.14	0.45	5.644
2	2.2	2.6	1.4	0.18	0.30	5.238
3	2.4	1.9	3.0	0.10	0.15	5.004
4	2.6	2.5	2.0	0.16	0.00	5.611
5	2.8	1.8	1.0	0.20	0.50	5.167
6	3	2.4	2.6	0.12	0.35	5.096

续表 1

7	2	1.7	1.6	0.18	0.20	5.250
8	2.2	2.3	3.2	0.10	0.05	5.477
9	2.4	1.6	2.2	0.14	0.55	5.684
10	2.6	2.2	1.2	0.20	0.40	4.886
11	2.8	1.5	2.8	0.12	0.25	5.240
12	3.0	2.1	1.8	0.16	0.10	5.600

运用 SAS 软件中的多元统计程序回归得： $Y = 9.08 + 55.49A - 71.52B + 3.01A^2 - 2.91A * B - 11.86A * C - 269.9A * D + 2.48A * E + 14.45B * C + 328.44B * D - 3.11B * E$ ，与试验同步进行得到较优的培养基组成：葡萄糖  $24\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，蔗糖  $22\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，蛋白胨  $16\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，醋酸  $2.4\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ，磷酸氢二钠  $3.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，磷酸二氢钾  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，硫酸镁  $0.25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  对 *A. xylinum* NUST4 合成纤维素产量的影响

据文献报道<sup>[7]</sup>， $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  对 *Acetobacter xylinum* NUST4 合成纤维素产量的影响很大，故本文考察了两种金属离子的影响程度大小。

2.2.1  $\text{Mg}^{2+}$  的影响： $\text{Mg}^{2+}$  对 *A. xylinum* NUST4 合成纤维素的影响很大，主要是  $\text{Mg}^{2+}$  在纤维素代谢中发挥了很重要的作用，由于它对 *A. xylinum* NUST4 菌的生长和合成纤维素都是必不可少的，它能激活二鸟苷酸环化酶，而在纤维素合成中如果没有环状鸟苷酸，则纤维素合成酶将失去活性<sup>[7,8]</sup>。实验结果表明， $\text{Mg}^{2+}$  含量达到  $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时，*A. xylinum* NUST4 菌株合成细菌纤维素产量达到最大值  $7.974\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此 *A. xylinum* NUST4 菌株合成细菌纤维素  $\text{Mg}^{2+}$  最适添加量为  $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.2  $\text{Fe}^{2+}$  的影响： $\text{Fe}^{2+}$  能激发高能磷化物如 ATP、UTP 的产生，亚铁激活剂可使  $\text{Fe}^{2+}$  插入丙酮酸羧化酶的活性中心形成复合物，从而克服无机磷酸的抑制作用，增加该酶的活性<sup>[7,9]</sup>，进而加速草酰乙酸产生，加速细胞生长，但当浓度超过一定程度时将会抑制细胞生长，当添加  $0.015\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Fe}^{2+}$  时纤维素产量达最大。

2.3 微量元素对 *A. xylinum* NUST4 合成纤维素产量的影响

实验结果（图 1 和表 2）表明，除了添加茶浸汁对 *A. xylinum* NUST4 合成纤维素有明显的促进作用，而对氨基苯甲酸对产量没有什么影响外，烟酸、生物素及乙醇对 *A. xylinum* NUST4 菌株合成细菌纤维素均有增效作用，尤其是添加了乙醇后作用相当明显，乙醇作为能源物质可促进 *A. xylinum* NUST4 合成纤维素，随乙醇浓度的增加，*A. xylinum* NUST4 将乙醇氧化成乙酸，产生大量 ATP 促进细胞生长，但浓度过高会产生大量的  $\text{CO}_2$  而抑制细胞生长<sup>[10]</sup>；生物素是丙酮酸羧化酶的辅酶，该酶联系 TCA 和糖异生作用，添加适量生物素加快了草酰乙酸产生的速度；添加适量对氨基苯甲酸和烟酸也能促进细胞生长<sup>[4]</sup>，提高纤维素产量，因此添加  $0.003\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  烟酸、 $0.02\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  生物素和  $20\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇时纤维素产量达  $9.87\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

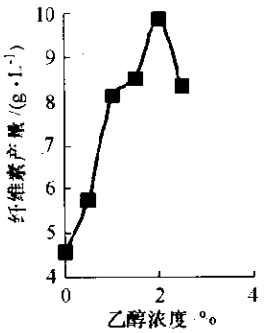


图 1 乙醇对纤维素产量的影响

表 2 增效因子对纤维素产量的影响

增效因子(g·L <sup>-1</sup> )	不加	对氨基苯甲酸	烟酸		茶抽提物		生物素	
		5×10 <sup>-6</sup>	0.003	0.006	0.012	3	0.02	0.04
纤维素(g·L <sup>-1</sup> )	5.79	5.7	6.3	5.65	5.64	4.57	6.1	5.54

综合上述实验优化后的发酵培养基组成为：葡萄糖 24 g·L<sup>-1</sup>，蔗糖 22 g·L<sup>-1</sup>，蛋白胨 16 g·L<sup>-1</sup>，醋酸 2.4 mL·L<sup>-1</sup>，磷酸氢二钠 3.5 g·L<sup>-1</sup>，磷酸二氢钾 1 g·L<sup>-1</sup>，硫酸镁 6 g·L<sup>-1</sup>，硫酸亚铁 0.015 g·L<sup>-1</sup>，烟酸 0.003 g·L<sup>-1</sup>，生物素 0.02 g·L<sup>-1</sup> 和乙醇 20 mL·L<sup>-1</sup>，纤维素产量达 9.87 g·L<sup>-1</sup>，比由 S-H 培养基<sup>[11]</sup> 发酵合成的纤维素产量（仅 0.74 g·L<sup>-1</sup>）提高了 12 倍。

2.4 静置培养细菌纤维素的动态变化

pH 值在第 1d 几乎不变，在第 2d 后快速下降，第 4d 后基本保持恒定，最终几乎维持在 4.0 左右；从总糖变化趋势来看，前 3d 菌株缓慢耗糖，第 3d 后快速耗糖，此时纤维素产量提高很快，到第 5d 时糖降至 1.25%，后期缓慢降低，而纤维素产量和菌浓却在缓慢增加，至第 7d 时达最大。但从菌浓和纤维素产量的趋势线来看，变化趋势同步，即随着培养时间的延长，细菌生长的同时也在合成纤维素，考虑到试验方便，故选择 7d 为一培养周期（见图 2）。

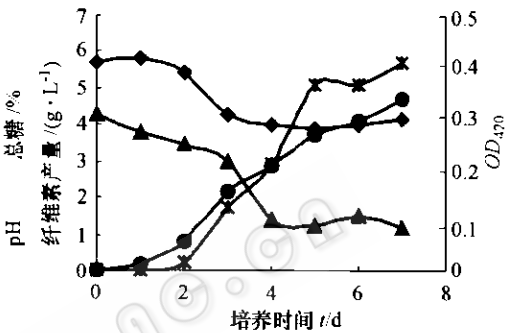


图 2 细菌纤维素发酵的动态变化  
◆ pH, ▲ 总糖 (%), ● 细菌纤维素产量 (g·L<sup>-1</sup>), × 菌浓 OD<sub>420</sub>

3 讨论

通过试验验证了均匀设计法的优化培养基能得到较高的纤维素产量，同时通过添加一定量的无机盐和增效因子，获得了比 S-H 培养基发酵所得纤维素产量的 12 倍，达 9.87 g·L<sup>-1</sup>（绝干重），不过纤维素比生长率并不高，所以今后一方面可以驯化 *A. xylinum* NUST4 高效生产纤维素，另一方面可以寻找价格低廉的农副产品代替价格昂贵的蛋白胨，尝试采用发酵罐发酵为工业化生产提供理论基础，同时可以通过跟踪测定发酵罐参数建立 *A. xylinum* NUST4 发酵产纤维素的动力学模型，以期获得更好的发酵条件。

参考文献

[1] Vandamme E J, De Baets S, Vanbaelen A, et al. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59: 93 ~ 99.  
[2] Jonas R, Farah L F. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59: 101 ~ 106.  
[3] Klemm D, Schumann D, Udhardt U, et al. Progress in Polymer Science, 2001, 26: 1561 ~ 1603.  
[4] 欧兹宇, 贾士儒, 马 霞. 食品与发酵工业, 2004, 29 (1): 18 ~ 22.  
[5] 熊宗贵. 发酵工艺原理. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 216 ~ 219.  
[6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 (第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 10 ~ 11.  
[7] Son H J, Kim H G, Kim K K, et al. Bioresource Technology, 2003, 86: 215 ~ 219.  
[8] 贾士儒, 欧兹宇. 化工科技市场, 2001, 2: 21 ~ 23.  
[9] 沈 同, 王镜岩, 赵邦梯, 等. 生物化学 (下册) (第二版). 北京: 高等教育出版社, 2002. 77 ~ 114.  
[10] Takaaki N, Tohru K, Hisato Y, et al. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 6 (85): 598 ~ 603.  
[11] Hestrin S, Schramm M. Biochemical Journal, 1954, 58: 345 ~ 352.