



研究报告

产纤维素菌株的分离鉴定及产量相关性

胡建颖 吴佳婧 王昕怡 黄婕 孙倩 胡露露 易正芳 常忠义 高红亮 牛延宁*

华东师范大学生命科学学院 上海 200241

摘要:【背景】细菌纤维素是一种性能优异的新型天然生物纳米材料,但其发酵产量低、生产成本低,尚未得到大规模生产与应用。【目的】自然选育细菌纤维素高产菌株,并探索菌株产量与菌落形态、水果来源、菌株种属之间的关联。【方法】从15个不同种类的576份腐烂水果中自然选育产纤维素菌株,并按菌落形态进行分类。静置培养筛选高产纤维素菌株,并对所得菌株进行16S rRNA基因测序,鉴定其种属。【结果】获得134株产纤维素菌株,其中一株分离自芒果的汉氏驹形杆菌(*Komagataeibacter hansenii*)产量最高,为11.24 g/L。所得菌株按菌落形态可分为10个类别,高产纤维素菌株形态共同特征为黄色、圆形、边缘整齐或不规则、表面粗糙或褶皱、凸起(形态4、5、9)。苹果和梨来源中分离得到的菌株菌落形态多样性丰富,高产纤维素菌株的水果来源中芒果所占比值最高,其次为梨和苹果。所有菌株鉴定为5个属13个种,包含了醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、驹形杆菌属(*Komagataeibacter*)、葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*),其中高产纤维素菌株集中分布于汉氏驹形杆菌(*K. hansenii*)和中间驹形杆菌(*K. intermedius*)。【结论】筛到的菌株多样性丰富,并且得到多株高产纤维素菌株,其传代稳定性好,丰富了细菌纤维素生产菌株的来源。分析所得菌株产量与菌落形态、水果来源之间的关系可以为今后菌株筛选工作提供参考。

关键词: 细菌纤维素, 产量分析, 菌落形态, 腐烂水果, 种属鉴定

Isolation, identification and yield correlation of cellulose-producing strains

HU Jian-Ying WU Jia-Jing WANG Xin-Yi HUANG Jie SUN Qian HU Lu-Lu

YI Zheng-Fang CHANG Zhong-Yi GAO Hong-Liang NIU Yan-Ning*

School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: 【Background】 Bacterial cellulose is a new type of natural bio-nanomaterials with excellent properties, but it has not yet been achieved production and application in large-scale because of the low fermentation yield and high production cost. 【Objective】 We naturally selected and bred cellulose high-yield strains, and explored the relationship between the strain yield, colony morphology, fruits source and strains species. 【Methods】 Naturally bred cellulose-producing strains were selected from a total of 576 rotten fruits covering 15 species, and classified by colony morphologies. High-yield cellulose strains were

Foundation item: National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810269096G)

*Corresponding author: Tel: 86-21-54344867; E-mail: ynniu@bio.ecnu.edu.cn

Received: 28-05-2018; Accepted: 04-09-2018; Published online: 15-09-2018

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划(201810269096G)

*通信作者: Tel: 021-54344867; E-mail: ynniu@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-28; 接受日期: 2018-09-04; 网络首发日期: 2018-09-15

screened by static culture, and the 16S rRNA gene region of the strains was sequenced to identify their species. [Results] 134 cellulose-producing strains were obtained. The best strain *Komagataeibacter hansenii* was isolated from mango with the yield 11.24 g/L. All strains was classified into 10 categories according to the colony morphology. The common characteristics of high-yield cellulose colonial morphologies were yellow, round, raised, neat or irregular edges and rough or wrinkled surface (morphology 4, 5, 9). The colonies' morphological diversity of strains isolated from apple and pear were abundant. Most of high-yield cellulose strains were mango-derived, followed by pears and apples. All strains were identified as 5 genera and 13 species, including *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter*, *Serratia*, and *Lactobacillus*, in which highly productive cellulose strains were concentrated in *K. hansenii* and *K. intermedius*. [Conclusion] The screened strains are rich in diversity, and a number of high-yield cellulose strains are obtained, which have good heredity stability and greatly enrich the source of bacterial cellulose production strains. Analysis of the relationship between the yield of the obtained strains with the colony morphology and fruit source may offers reference for future screening work.

Keywords: Bacterial cellulose, Yield analysis, Colony morphology, Rotten fruits, Species identification

细菌纤维素(Bacterial cellulose)是由细菌合成的水不溶性胞外多糖,它由葡萄糖分子以 β -1,4-糖苷键聚合而形成线性长链,这些葡萄糖链通过分子内和分子间的氢键形成网状结构。植物源纤维素由于被木质素、半纤维素等杂质包裹,生产纯的纤维素过程较为复杂。而细菌纤维素则多以纯纤维素的形式存在,纤维素直径在几纳米到几十纳米之间^[1],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^[2-4]。

近年来,细菌纤维素的研究成为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、造纸等领域的应用展现出巨大的潜力^[5-7]。然而,由于目前发酵产量普遍低、生产成本低,细菌纤维素尚未得到大规模生产与应用。为了得到更高产纤维素的菌株,从源头降低生产成本,从自然界中获得纤维素产量高、遗传代谢稳定的菌株是一个行之有效的方法。

从自然界的腐烂水果中容易富集到产纤维素的菌株^[8]。Toyosaki 等^[9]收集了 547 份不同来源的样品,分离到 2 096 株产纤维素的菌株,其中水果中筛选效率最高。Park 等^[10]从腐烂的苹果中分离

到一株产纤维素的菌株 *Gluconacetobacter hansenii*。Son 等^[11]从水果和醋中分离到了 57 株产纤维素菌株。本研究以腐烂水果作为实验材料,筛选得到 134 株产纤维素菌株,大大丰富了菌种资源库。

在自然选育过程中,菌落形态和水果来源与产纤维素的关系还未见详细报道。本文从不同种类的腐烂水果中自然选育纤维素生产菌株,并根据菌落形态进行分类,尝试找出菌落形态与纤维素产量的关系并对不同腐烂水果来源的菌株进行产量分析,以期找到更容易获得高产纤维素菌株的菌落形态和腐烂水果源,为今后的筛菌工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

腐烂水果:苹果、梨、芒果、葡萄等,上海市闵行区水果市场;对照菌株木驹形杆菌(*Komagataeibacter xylinum*) BCC529,本实验室保藏;细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技有限公司;PCR 所用试剂,宝生物工程(大连)有限公司;引物,金斯瑞生物技术有限公司。

1.1.2 培养基

(1) HS 富集培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨

5.0, 酵母粉 5.0, 磷酸氢二钠 2.7, 柠檬酸 1.15; 用乙酸调节 pH 为 4.0; 0.1 MPa 灭菌 20 min 后加入无水乙醇使其终浓度为 3%。

(2) HS 琼脂培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 磷酸氢二钠 2.7, 柠檬酸 1.15, 琼脂 18.0; 用乙酸调节 pH 为 6.0; 0.1 MPa 灭菌 20 min。

(3) HS 斜面培养基(g/L): 葡萄糖 100.0, 酵母粉 10.0, 碳酸钙 20.0, 琼脂 18.0; 用乙酸调节 pH 为 6.8; 0.1 MPa 灭菌 20 min。

(4) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 玉米浆 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 磷酸氢二钠 2.7, 柠檬酸 1.15; 用乙酸调节 pH 为 6.0; 0.1 MPa 灭菌 20 min。

(5) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 磷酸氢二钠 2.7, 柠檬酸 1.15; 用乙酸调节 pH 为 6.0; 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器

洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 冷冻离心机, 日立公司; PCR 仪, 艾本德公司; 精密电子天平、精密 pH 计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 富集培养^[12-13]

取果实的腐烂部分约 1 g, 接入装有 10 mL HS 富集培养基的试管中, 30 °C 静置培养 5 d, 管内液面上长有乳白色胶质薄膜个体为阳性。

1.2.2 菌株筛选与纯化^[12-14]

取阳性个体膜片, 剪碎并置于装有 10 mL HS 富集培养基的试管中浸泡 24 h, 取浸提液经梯度稀释后涂布平板, 培养 5 d, 挑取不同菌落形态单菌落接入装有 2 mL 富集培养基的小试管中培养 5 d, 有白色胶质薄膜出现的个体即为产纤维素细菌, 扩大培养保存菌种。

1.2.3 静态培养^[14-16]

产纤维素细菌活化后, 取一环活化菌液进行平板三区划线, 于 30 °C 培养 5 d, 待长出单菌落

后记录菌落形态, 挑取 5 个单菌落于装有 15 mL 发酵培养基的离心管中, 透气封口膜封口, 30 °C 培养 9 d, 每组 4 个平行。

1.2.4 产量测定^[13,17]

静置培养结束取出纤维素膜, 用清水浸泡, 9 000 r/min 离心 10 min, 冲洗 2 次, 除去膜表面培养基及杂质。用 1% 的 NaOH 溶液浸泡, 100 °C 加热 20 min, 9 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 再加入 1% 的 NaOH 溶液, 重复此步骤至纤维素膜呈透明或白色, 去除液膜中的菌体和残留的培养基; 再用与碱溶液等体积的 0.5% 乙酸浸泡 5 min 后, 9 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 水洗离心 2-3 次至中性。将纤维素膜放在 80 °C 的烘箱中烘干 24 h, 称重。

1.2.5 种属鉴定

用细菌基因组提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。所用引物为 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTA CGACTT-3')。PCR 反应体系 (50 μL): 2×Mix 25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物提交上海美吉生物医药科技有限公司测序, 将测定序列于 NCBI 核糖体 DNA 数据库中进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 菌株在 HS 分离纯化平板上的菌落形态分类

从 15 种腐烂水果 (576 份) 中分离筛选得到 134 株产细菌纤维素菌株。按照所得菌株在 HS 琼脂培养基上生长的菌落形态, 包括颜色、形状、粗糙与光滑程度等分为 10 个类别 (图 1 和表 1)。其中, 形态 5、6、7、8 对应的菌株在培养期内存在形态变化, 培养 5 d 如图 1 中 5A、6A、7A 和 8A 所示, 培养到 7 d 如图 1 中 5B、6B、7B 和 8B 所示。

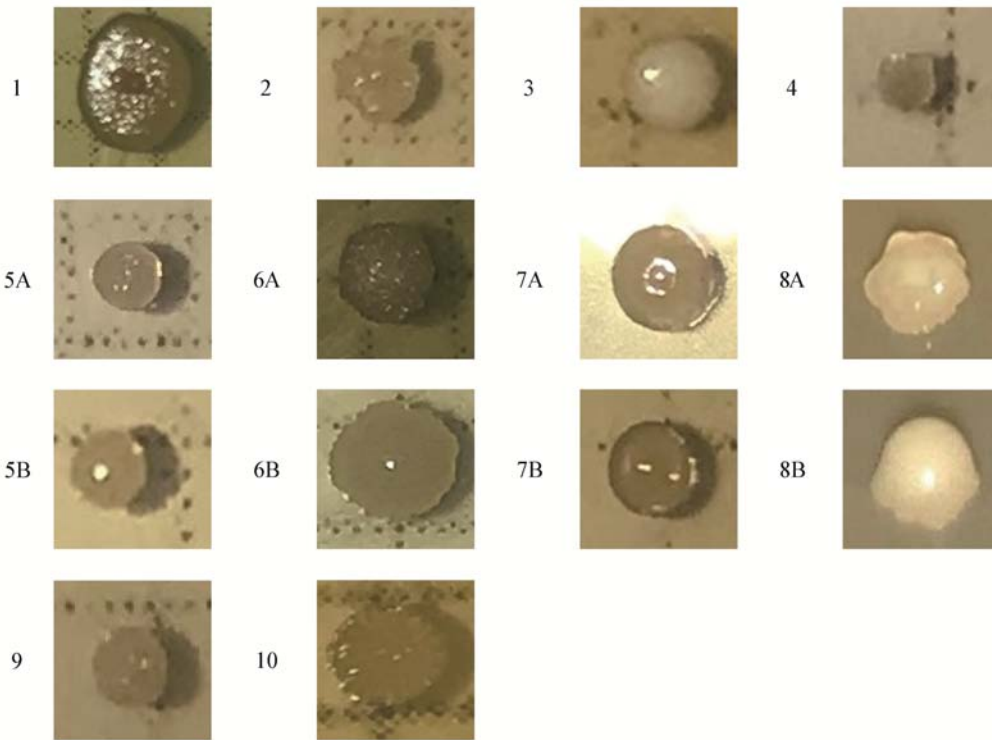


图 1 在 HS 培养基上的不同菌落形态

Figure 1 Different colony morphologies on HS medium

表 1 菌株在 HS 琼脂培养基上的培养类型及其描述

Table 1 Types and description of bacteria growing on the HS agar

类型 Type	HS 形态描述 HS morphology description
1	粉色、圆形、边缘整齐、表面粗糙、中间凸起、中间色深 Pink, circular, regular edge, rough surface, middle raised, middle color is darker
2	淡黄色、形状不规则、表面粗糙、凸起 Canary yellow, irregular shape, rough surface, raised
3	乳白色、圆形、边缘整齐、表面光滑、中间凸起 Milk white, circular, regular edge, smooth surface, middle raised
4	黄色、圆形、边缘整齐、表面粗糙、凸起 Yellow, circular, regular edge, rough surface, raised
5	黄色、圆形, A: 表面粗糙、凸起, 边缘不规则; B: 表面光滑、中间凸起, 边缘锯齿 Yellow, circular, A: Rough surface, raised, irregular edge; B: Smooth surface, middle raised, zigzag edge
6	乳白色、圆形、边缘不规则, A: 表面褶皱、凸起; B: 表面光滑、中间凸起 Milk white, circular, irregular edge, A: Wrinkled surface, raised; B: Smooth surface, middle raised
7	黄色、圆形、边缘整齐、表面光滑, A: 凸起, 顶部环状凹陷; B: 中间凸起 Yellow, circular, regular edge, smooth surface, A: Raised, annular depression in the top; B: Middle raised
8	乳白色、形状不规则, 表面光滑、凸起, A: 边缘不规则、六瓣花朵状; B: 边缘不规则、球状凸起 Milk white, irregular shape, smooth surface, raised, A: Irregular edge, six-petals' shape; B: Irregular edge, spheroidal raised
9	黄色、圆形、边缘不规则、表面有褶皱、凸起 Yellow, circular, irregular edge, wrinkled surface, raised
10	黄色、圆形、边缘放射状、表面粗糙、中间凸起 Yellow, circular, radial edge, rough surface, middle raised

2.2 菌株形态与产量之间的关系

不同形态的菌株与其产量之间的关系见图 2。木驹形杆菌 BCC529 是本实验室保存的一株产纤维素菌株, 产量达到 4.89 g/L。本文将纤维素相对产量大于 100% 划分为高产; 50%–100% 划分为中产, 低于 50% 为低产。形态 4、5 和 9 是高产纤维素菌株较多的类别, 在这几个形态组中超过一半菌株的相对产量高于 100%; 形态 1 和 8 属于低产形态, 菌株相对产量全部低于 100%; 形态 2、3、6、7 和 10 是中产形态, 组中有且仅有个别相对产量高于 100% 的菌株。因此, 在筛菌过程中应尽量避免形态 1 和 8 的菌株, 高产趋向选择形态 4、5 和 9 的菌株。当然, 影响菌落形态的因素很多, 如培养时间、培养基成分和培养条件等。上述菌落形态和产量的对应关系是在本文的实验条件下得出的, 因此对高产纤维素菌株筛选的借鉴意义有一定的局限性。

按上述定义对这 10 种形态的菌株进行分类, 每种形态对应的高产、中产及低产纤维素菌株的数量见图 3。其中, 高产形态(形态 4、5、9)与中产、低产形态之间存在显著性差异, 并且在中产形态与低产形态之间也存在显著性差异。形态 4、5 和 9 组内菌株中高产纤维素菌株所占比率分别为 66.67%、59.26% 和 71.42%。在形态 4、5、9 之间, 形态 9 高产纤维素菌占比例最大, 是自然选育菌株时的最优形态, 其菌落形态为黄色、圆形、边缘不规则、表

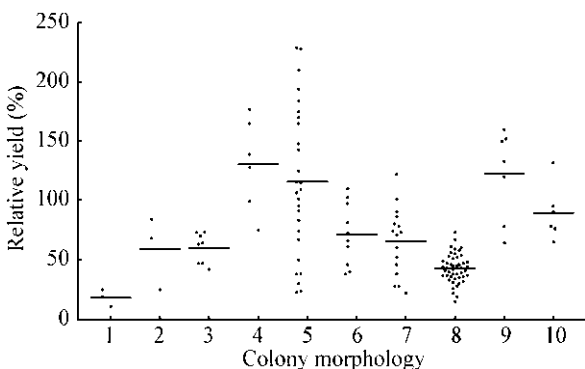


图 2 不同菌落形态菌株的相对产量
Figure 2 Relative yield of strains with different colony morphologies

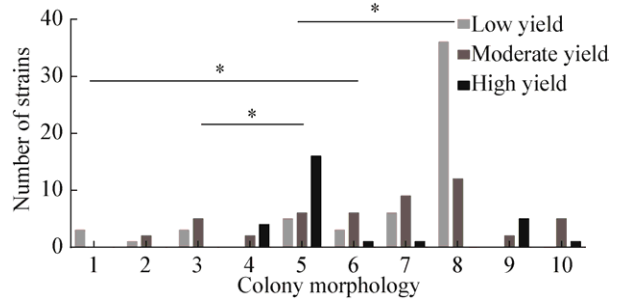


图 3 不同菌落形态的 3 类菌株数量
Figure 3 The number of three types of strains with different colony morphologies
注: *: $P < 0.05$, 通过 t 检验进行统计学分析。
Note: *: $P < 0.05$, statistical analysis was conducted using student t -test.

面有褶皱、凸起。其次, 形态 5 对应的高产纤维素菌株数量最多, 显著高于其他任何一个形态的高产纤维素菌株数量。如若从高产纤维素菌株的样本容量考虑, 提高高产纤维素菌株的筛选数量, 则可以考虑选择在形态 5 中占比例最大的水果种类。

2.3 菌株形态在不同水果中的分布情况

10 个菌株形态在 15 种腐烂水果中的分布情况见图 4。从水果种类、菌株形态以及产量相关性来看, 苹果和梨来源的菌株形态丰富, 包含了高产(形态 4、5、9)、中产(形态 2、6、7、10), 没有低产形态; 蜜瓜、杏、橘子、香蕉和芒果来源的菌株也没有低产形态, 其中蜜瓜和杏中产形态(形态 3、6、10)占多数, 橘子、香蕉和芒果高产形态(形态 4、5、9)占多数。美人指和毛桃来源的菌株形态虽不及苹果和梨来源的丰富, 但包含了高产(形态 5、9)、中产(形态 3、6)和低产(形态 8)的形态, 而且 3 类形态的菌株分布较均匀; 桂圆、冬枣、圣女果、红提、葡萄和油桃来源的菌株多数是低产形态(形态 1 和 8), 剩余部分涵盖在中产形态中(形态 2、3、6)。

形态 5 对应的高产纤维素菌株数量最多(图 3), 筛选来源有 6 种水果, 芒果筛出的菌种数量最多, 占总计 44.44%, 梨和苹果筛出数量次之。因此, 进行产纤维素细菌的自然选育时, 选择从芒果、梨和苹果中富集分离, 会有更高的概率筛得高产纤维素菌株。

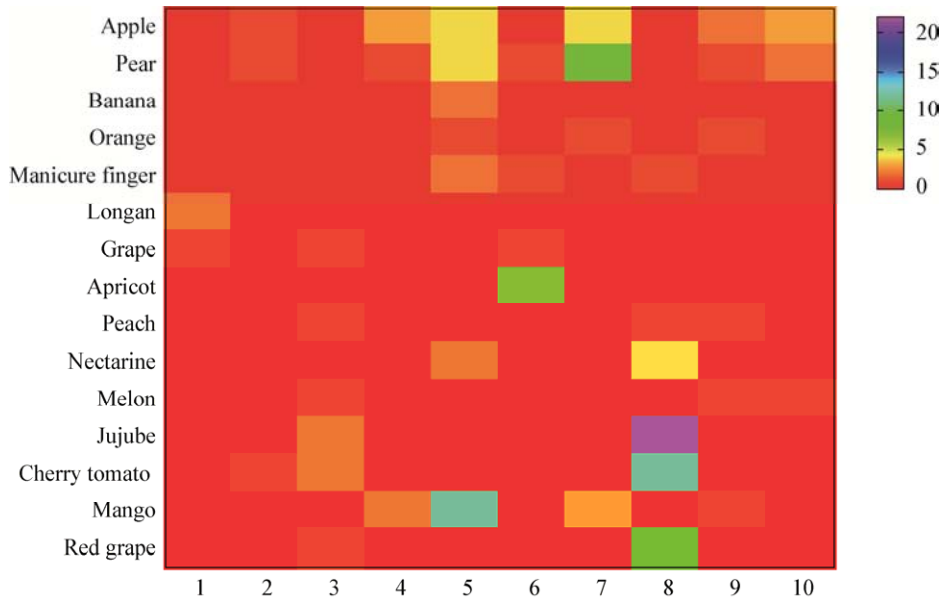


图 4 不同菌落形态的菌株在不同水果中的分布

Figure 4 Distribution of strains with different colony morphologies in different fruits

对筛选所得菌株进行静置培养, 其中有 30 株菌的相对产量大于 100%, 即有 30 株高产纤维素菌株 (图 2)。建立高产纤维素菌株和其水果来源的关系 (图 5), 结果发现: 芒果来源的高产纤维素菌株在所有高产纤维素菌株中所占的比例最大, 高达 46.67%; 其次是梨和苹果, 占比例分别为 23.33% 和 16.67%。

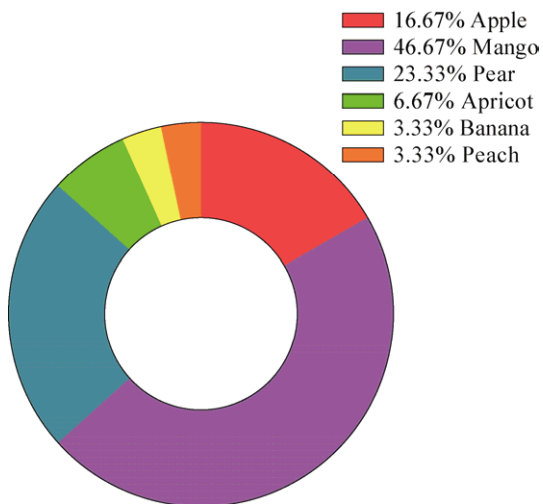


图 5 高产纤维素菌株中不同水果来源的占比

Figure 5 The proportion of different fruit sources in high-yield cellulose strains

本研究获得的最高产纤维素的菌株是一株分离自芒果的汉氏驹形杆菌(*K. hansenii*), 产量为 11.24 g/L, 高于文献[18-19]报道的菌株。

2.4 16S rRNA 基因序列鉴定分析结果

对这 134 株产纤维素菌株的 16S rRNA 基因序列进行测序, 根据测序结果比对分析得到 5 个属 13 个种 (表 2), 包括醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、驹形杆

表 2 不同菌种的分离株数及水果来源

Table 2 Number of isolates and fruit sources of different strains

已鉴定菌种 Identified strains	分离株数/高产株数 Number of isolates/High yield strains	水果种类 Fruit species
<i>K. hansenii</i>	58/25	10
<i>K. oboediens</i>	26/0	4
<i>K. intermedius</i>	20/5	8
<i>K. sucrofermentans</i>	9/0	5
<i>K. swingsii</i>	3/0	2
<i>K. europaeus</i>	2/0	1
<i>K. maltaceti</i>	2/0	1
<i>A. tropicalis</i>	7/0	4
<i>A. ghanensis</i>	2/0	1
<i>A. malorum</i>	1/0	1
<i>G. entanii</i>	2/0	1
<i>S. odorifera</i>	1/0	1
<i>L. nagelii</i>	1/0	1

菌属 (*Komagataeibacter*)、葡糖醋杆菌属 (*Gluconacetobacter*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)。汉氏驹形杆菌 (*K. hansenii*) 的数量最多, 而且对应的水果种类也最多。温驯驹形杆菌 (*K. oboediens*)、中间驹形杆菌 (*K. intermedius*)、蔗糖驹形杆菌 (*K. sucrofermentans*) 以及热带醋酸杆菌 (*A. tropicalis*) 对应的菌株数量和水果种类也较丰富。对 30 株高产菌株的种属进行分析, 其中 25 株属于汉氏驹形杆菌 (*K. hansenii*), 5 株属于中间驹形杆菌 (*K. intermedius*)。

不同类型的水果来源与分离所得菌株种属关系如表 3 所示。圣女果中分离所得菌株种属类别最为丰富, 其中欧洲驹形杆菌 (*K. europaeus*)、麦芽醋驹形杆菌 (*K. maltaceti*)、圆谷葡糖醋杆菌 (*G. entanii*) 只在圣女果中分离得到。其次是冬枣和苹果中分离所得菌株种属类别较丰富, 其中加纳醋酸杆菌 (*A. ghanensis*) 和气味沙雷氏菌 (*S. odorifera*) 有且只在冬枣来源中分离得到; 而腐烂苹果醋酸杆菌 (*A. malorum*) 也只在苹果中分离得到。值得一提的是, 一株分离自红提的菌株经鉴定后发现与少见的黑麦乳杆菌 (*L. nagelii*) 一致性达到 99%。通过以上这些不常见的产纤维素细菌种属, 体现了所筛得产纤维素菌株的多样性十分丰富。

3 讨论与结论

细菌纤维素作为一种具有广泛用途的生物纳米材料, 具有很好的商业前景, 但由于其生产效率低、成本较高, 极大地限制了它的工业化推广应用。因此, 相关研究人员一直在致力于提高细菌纤维素的产量, 其中选育高产纤维素菌株^[18-19]、开展发酵条件优化^[20]、改进发酵方式^[21-22]等都是非常活跃的研究方向。

腐烂水果是细菌纤维素产生菌的良好来源, Toyosaki 等^[9]收集了 547 份不同来源的样品, 包括 353 份水果、28 份坚果、124 份糖蜜、36 份花和 6 份土壤, 一共分离了 2 096 株产纤维素的菌株, 其中水果中筛选效率最高, 筛选率达到 31.7%, 而土壤

表 3 不同菌种在各类水果的分离菌株中的分布

Table 3 Distribution of different bacteria species in each fruit

水果 Fruits	菌种 Strains	分离株数 Number of isolates
芒果 Mango	<i>K. hansenii</i>	16
	<i>A. tropicalis</i>	2
冬枣 Jujube	<i>K. oboediens</i>	13
	<i>K. sucrofermentans</i>	4
	<i>K. intermedius</i>	2
	<i>A. tropicalis</i>	2
	<i>A. ghanensis</i>	2
	<i>S. odorifera</i>	1
梨 Pear	<i>K. hansenii</i>	17
	<i>A. tropicalis</i>	1
香蕉 Banana	<i>K. intermedius</i>	1
	<i>K. hansenii</i>	1
橘子 Orange	<i>K. hansenii</i>	3
油桃 Nectarine	<i>K. oboediens</i>	3
	<i>K. hansenii</i>	2
	<i>K. sucrofermentans</i>	1
毛桃 Peach	<i>K. hansenii</i>	2
	<i>K. sucrofermentans</i>	1
杏 Apricot	<i>K. intermedius</i>	7
美人指 Manicure finger	<i>K. intermedius</i>	4
圣女果 Cherry tomato	<i>K. oboediens</i>	4
	<i>K. intermedius</i>	2
	<i>K. europaeus</i>	2
	<i>K. swingsii</i>	2
	<i>K. maltaceti</i>	2
	<i>K. sucrofermentans</i>	1
	<i>G. entanii</i>	2
	<i>K. hansenii</i>	2
葡萄 Grape	<i>K. intermedius</i>	1
	<i>K. hansenii</i>	11
苹果 Apple	<i>K. intermedius</i>	2
	<i>K. swingsii</i>	1
	<i>A. tropicalis</i>	2
	<i>A. malorum</i>	1
	<i>K. oboediens</i>	6
	<i>K. sucrofermentans</i>	2
红提 Red grape	<i>L. nagelii</i>	1
	<i>K. hansenii</i>	1
桂圆 Longan	<i>K. intermedius</i>	1
	<i>K. hansenii</i>	3
蜜瓜 Melon	<i>K. hansenii</i>	3

中则完全没有筛到。Son 等^[23]从 75 份材料中分离到 8 株产纤维素的细菌, 其中从腐烂苹果中分离到 1 株, 从腐烂梨中分离到 1 株, 从腐烂葡萄中分离到 2 株, 从醋中分离到 4 株, 从土壤中没有分离到。曹海鹏等^[24]从 40 多种残次水果、酸菜、咸菜、酸米酒糟及醋和酱油等原料中筛选产细菌纤维素菌株, 仅从青李中分离到产细菌纤维素菌株。朱宏阳等^[25]采集的 50 份土壤和水果样品中, 仅 3 份采集于残次水果中产生了纤维素。刘娅等^[26]以土壤、残次野苹果、散醪糟、泡菜、残次蟠桃、杏和瓶装醋等为材料, 仅从杏中分离出一株产纤维素的菌株 APR72。因此目前的筛选效率较低。本文以腐烂水果作为实验材料, 首先列出了高产纤维素菌株可能的菌落特征, 并进一步尝试分析高产纤维素菌株和腐烂水果来源的相关性, 结果表明芒果来源的高产纤维素菌株在所有高产纤维素菌株中占比最大, 高达 46.67%。其次是梨和苹果, 占比分别为 23.33% 和 16.67%。分析所得菌株产量与菌落形态、水果来源之间的关系可以为今后纤维素生产菌株的筛选工作提供参考, 进而提高筛选效率。当然, 菌株形态、水果来源和纤维素合成能力之间只是可能存在某种关联, 而不能过于绝对, 因此对高产纤维素菌株筛选的借鉴意义有一定的局限性。

自然选育的菌株产量一般都不高。如 Hungund 等^[27]从腐烂苹果中分离到一株产纤维素菌株 *Enterobacter amnigenus* GH-1, 产量为 4.1 g/L。Rani 等^[28]从腐败的葡萄酒中筛选出一株 *Gluconacetobacter hansenii* UAC09, 产量为 1.5 g/L。Kim 等^[29]从传统的发酵醋工业中分离到一株 *Gluconacetobacter* sp. RKY5, 并对它的发酵培养基进行优化, 产量为 4.59 g/L。Nguyen 等^[30]从红茶菌中分离出一株 *Gluconacetobacter xylinus*, 分析其产纤维素的特性, 并比较了红茶和绿茶对该菌株发酵产纤维素量的影响, 产量最高为 3.34 g/L。本研究获得的最高产量纤维素菌株是一株分离自芒果的汉氏驹形杆菌(*K. hansenii*), 产量为 11.24 g/L,

高于文献[18-19]报道的菌株, 该菌株有一定的工业化应用前景。

许多微生物被报道能产细菌纤维素, 主要涉及醋杆菌属 (*Acetobacter*)、葡糖醋杆菌属 (*Gluconacetobacter*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等 17 个属^[31-33]。其中, 关于醋杆菌属和葡糖醋杆菌属的报道较多。刘娅等^[26]以某些常见食品及新疆 7 月份盛产的水果为原料, 经静态培养和反复筛选, 从杏中分离出了一株纤维素生产能力强、产量稳定的菌株, 初步鉴定为醋化醋杆菌 (*Acetobacter aceti*)。咸赫等^[34]通过初步活化和分步富集的方法获得细菌纤维素生产菌株, 经过 16S rRNA 基因序列及形态学鉴定后, 确定为木葡糖酸醋杆菌, 命名为 *G. xylinus* 5-2。近年来, 随着产纤维素菌株的研究不断深入, 种属之间不断地进行重新分类。驹形氏杆菌属 (*Komagataeibacter*) 是从葡糖醋杆菌属中划分出来的一个新的属^[35], 同样地, 醋杆菌属中的某些类别也被分类于葡糖醋杆菌属和驹形氏杆菌属。目前, 驹形氏杆菌属的报道最多也最深入^[35-36], 已报道该属中有纤维素合成能力的菌种共有 14 个^[37], 如 *K. xylinus*、*K. hansenii*、*K. europaeus*、*K. swingsii*、*K. nataicola*、*K. rhaeticus* 等^[38-39]。本研究获得的 134 株菌涵盖 5 个属 13 个种, 其中驹形杆菌属的菌株最多。同时, 还筛选得到了文献中极少报道的产纤维素细菌, 如气味沙雷氏菌 (*S. odorifera*)、腐烂苹果醋酸杆菌 (*A. malorum*) 和黑麦乳杆菌 (*L. nagelii*), 这表明所筛菌株的多样性十分丰富。这些菌株丰富了我国的菌种资源, 并为细菌纤维素的大规模生产提供了新的原始菌种。

REFERENCES

- [1] Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N, et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose[J]. *Journal of Materials Science*, 1989, 24(9): 3141-3145
- [2] Tan YJ, Hong F. Production of bacterial cellulose using static

- fermentation and characterization of the cellulose's physical properties[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2007, 15(4): 1-8 (in Chinese)
- 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
- [3] Wang Y, Luo QP, Peng BH, et al. A novel thermotropic liquid crystalline-benzoylated bacterial cellulose[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74(4): 875-879
- [4] Wang LF, Li Z, Jia SR, et al. The research progress in characteristics and applications of bacterial cellulose[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1675-1683 (in Chinese)
- 汪丽粉, 李政, 贾士儒, 等. 细菌纤维素性质及应用的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1675-1683
- [5] Lu SM, Jia JJ, Yang Y. Research progress on fermentation technology and application of the bacterial cellulose[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2011, 47(1): 27-31 (in Chinese)
- 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
- [6] Jung JY, Khan T, Park JK, et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2007, 24(2): 265-271
- [7] Fan ZQ, Yuan Y, Shen Q. Recent development in nanocellulose research and application II[J]. *Polymer Bulletin*, 2010(3): 40-60 (in Chinese)
- 范子千, 袁晔, 沈青. 纳米纤维素研究及应用进展 II[J]. *高分子通报*, 2010(3): 40-60
- [8] Yang G, Wang CX. Cost-efficient production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* using rotten fruits as the culture medium[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2015, 23(4): 67-70 (in Chinese)
- 杨光, 王彩霞. 以腐烂水果为营养源高效制备细菌纤维素[J]. *纤维素科学与技术*, 2015, 23(4): 67-70
- [9] Toyosaki H, Naritomi T, Seto A, et al. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(8): 1498-1502
- [10] Park JK, Park YH, Jung JY. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003, 8(2): 83-88
- [11] Son HJ, Lee OM, Kim YG, et al. Isolation and identification of cellulose-producing bacteria[J]. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 28(3): 134-138
- [12] Qi XJ, Gou JX, Di YN, et al. Purification and fermentation condition investigating of cellulose-producing strains[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2004, 12(1): 27-32,36 (in Chinese)
- 齐香君, 苟金霞, 邸雅楠, 等. 细菌纤维素合成菌株的分离与生产工艺研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(1): 27-32,36
- [13] Ma CZ, Gu ZR. Screening, identification and products testing of high-yield cellulose-producing strains of *Acetobacter xylinum*[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2000, 16(3): 78-82 (in Chinese)
- 马承铸, 顾真荣. 醋菌纤维素高产菌株筛选和菌物鉴定[J]. *上海农业学报*, 2000, 16(3): 78-82
- [14] Ma X, Wang RM, Guan FM, et al. Selection and preliminary identification of bacterial cellulose-producing strain[J]. *Industrial Microbiology*, 2005, 35(3): 23-26 (in Chinese)
- 马霞, 王瑞明, 关凤梅, 等. 细菌纤维素生产菌株的分离和菌种初步鉴定[J]. *工业微生物*, 2005, 35(3): 23-26
- [15] Czaja W, Romanovicz D, Brown RM. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture[J]. *Cellulose*, 2004, 11(3/4): 403-411
- [16] Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jezierska A, et al. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 29(4): 189-195
- [17] Zhu MY. Breeding of bacterial cellulose producing strains and study of bacterial cellulose properties[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2004 (in Chinese)
- 朱明阳. 产细菌纤维素菌株选育及细菌纤维素性质研究[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2004
- [18] Yang Y, Jia JJ, Lu SM, et al. Identification and product characteristics analysis of cellulose-producing strain[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(7): 216-221 (in Chinese)
- 杨颖, 贾静静, 陆胜民, 等. 细菌纤维素高产菌株的鉴定及产物分析[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(7): 216-221
- [19] Tang WH, Li F, Jia YY, et al. Screening and fermentation conditions of strains from *Gluconacetobacter oboediens* for high-yield bacterial cellulose production[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(9): 1016-1019 (in Chinese)
- 汤卫华, 李飞, 贾原媛, 等. 细菌纤维素高产菌株的诱变选育和发酵条件研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(9): 1016-1019
- [20] Zhou LL, Sun DP, Wu QH, et al. Optimum culture conditions for bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* NUST4[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(6): 96-99 (in Chinese)
- 周伶俐, 孙东平, 吴清杭, 等. *Acetobacter xylinum* NUST4 合成细菌纤维素发酵条件的优化[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 96-99
- [21] Tang WH, Ma X, Jia YY, et al. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in static fed-batch culture[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(2): 21-24 (in Chinese)
- 汤卫华, 马霞, 贾原媛, 等. 木醋杆菌流加静置培养生产细菌纤维素[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(2): 21-24
- [22] Zhou LL, Sun DP, Wu QH, et al. Influence of culture mode on bacterial cellulose production and its structure and property[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 914-917 (in Chinese)

- 周伶俐, 孙东平, 吴清杭, 等. 不同培养方式对细菌纤维素产量和结构性质的影响[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 914-917
- [23] Son CJ, Chung SY, Lee JE, et al. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 12(5): 722-728
- [24] Cao HP, Yuan S, Zhao K, et al. Screening and identification of cellulose-producing strains[J]. Food Science, 2010, 31(5): 211-214 (in Chinese)
曹海鹏, 袁帅, 赵昆, 等. 细菌纤维素高产菌株的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 211-214
- [25] Zhu HY, Yao J, Feng S, et al. Isolation and identification of bacterial cellulose producing strain[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2014, 12(5): 80-84 (in Chinese)
朱宏阳, 姚俊, 冯珊, 等. 1株产细菌纤维素芽胞杆菌的分离及鉴定[J]. 生物加工过程, 2014, 12(5): 80-84
- [26] Liu Y, Yang Y, Xiao Y, et al. Screening and identification of bacterium strain with high cellulose yield[J]. Food Science, 2008, 29(3): 304-306 (in Chinese)
刘娅, 杨勇, 肖谊, 等. 纤维素高产菌的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 304-306
- [27] Hungund BS, Gupta SG. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(10): 1823-1828
- [28] Rani MU, Appaiah KAA. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(4): 755-762
- [29] Kim SY, Kim JN, Wee YJ, et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 131(1/3): 705-715
- [30] Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, et al. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha[J]. Current Microbiology, 2008, 57(5): 449-453
- [31] Bi JC, Liu SX, Li CF, et al. Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(5): 1305-1311
- [32] Fujiwara T, Komoda K, Sakurai N, et al. The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit A[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 431(4): 802-807
- [33] Serra DO, Richter AM, Hengge R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(24): 5540-5554
- [34] Xian H, Shi SJ, Mao JJ, et al. Isolation and identification of a cellulose-producing bacterium-*Gluconacetobacter xylinus* and analysis of its products[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2016, 24(2): 77-84 (in Chinese)
咸赫, 史素娟, 毛静静, 等. 一株细菌纤维素生产菌株 *Gluconacetobacter xylinus* 的分离鉴定及其产物分析[J]. 纤维素科学与技术, 2016, 24(2): 77-84
- [35] Yamada Y, Yukphan P, Vu HTL, et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*)[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(5): 397-404
- [36] Shi ZJ, Zhang Y, Phillips GO, et al. Utilization of bacterial cellulose in food[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 539-545
- [37] Yamada Y. Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(5): 1670-1672
- [38] 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
- [39] Mohite BV, Patil SV. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106: 132-141