

木葡糖醋杆菌发酵产细菌纤维素的培养基优化及外源物质对其代谢的影响

王凯, 赵萍, 冯佩瑶, 晋丹, 高杰, 汪瑞, 李佳颖, 刘冰

Optimization of Fermentation Medium of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* and Effects of Exogenous Substances on Its Metabolism

WANG Kai, ZHAO Ping, FENG Peiyao, JIN Dan, GAO Jie, WANG Rui, LI Jiaying, and LIU Bing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120254>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

醋酸菌发酵产细菌纤维素培养基和培养条件的优化

Optimization of fermentation medium and culture conditions of producing bacterial cellulose of *Gluconacetobacter hensennii* strain

食品工业科技. 2018, 39(3): 117-121,126 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.024>

烟曲霉素发酵培养基的优化

Optimization of fermentation medium for fumagillin production

食品工业科技. 2018, 39(10): 110-116 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.021>

大肠杆菌发酵产L-色氨酸培养基及补料优化

Optimization of Medium and Feeding Process for L-Tryptophan Production Fermented by *Escherichia coli*

食品工业科技. 2020, 41(2): 146-153 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.024>

解淀粉芽孢杆菌fmbj37产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化

Optimization of Fermentation Medium for *Bacillus amyloliquefaciens* fmbj37 to Produce Poly γ -Glutamic Acid

食品工业科技. 2019, 40(20): 160-166 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.026>

响应面法优化甲硫氨酸 γ -裂解酶发酵培养基

Optimization of fermentation medium of methionine γ -lyase by using response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(5): 113-118 <https://doi.org/>

呕吐毒素脱毒菌*Devosia* sp.发酵培养基优化

Optimization of Fermentation Medium of Deoxynivalenol Detoxified Bacteria *Devosia* sp.

食品工业科技. 2020, 41(18): 93-99 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.015>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王凯, 赵萍, 冯佩瑶, 等. 木葡糖醋杆菌发酵产细菌纤维素的培养基优化及外源物质对其代谢的影响 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 208–215. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120254

WANG Kai, ZHAO Ping, FENG Peiyao, et al. Optimization of Fermentation Medium of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* and Effects of Exogenous Substances on Its Metabolism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 208–215. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120254

· 工艺技术 ·

木葡糖醋杆菌发酵产细菌纤维素的培养基优化及外源物质对其代谢的影响

王 凯, 赵 萍*, 冯佩瑶, 晋 丹, 高 杰, 汪 瑞, 李佳颖, 刘 冰
(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘 要: 为了提高细菌纤维素 (Bacterial Cellulose, BC) 的产量, 采用响应面法优化了木葡糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 的发酵培养基, 基于优化结果探究了海藻酸钠 (SA)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、羧甲基纤维素 (CMC) 三种外源物质对 BC 合成过程中 BC 产量、总糖消耗、乙酸、丙酮酸等的影响。结果表明, 最优培养基成分为葡萄糖 4%、酵母浸粉 1%、蛋白胨 0.8%、 MgSO_4 1.9%、 Na_2HPO_4 0.2%、乙酸 0.4%、乙醇 1.6%, BC 产量为 5.19 g/L。外源添加 SA、CMC-Na、CMC 后, 总糖的消耗量分别提高了 29.9%、22.82% 和 15.73%, BC 终产量分别为 6.72、6.01 和 5.1 g/L。相较于对照组, SA 和 CMC-Na 组丙酮酸含量的增幅分别为 29.02% 和 16.52%, 促进了丙酮酸的积累与利用, 提高了 BC 的积累量。CMC 添加组乙酸的积累量最高为 4.27 g/L, 这与 BC 产量的下降有一定关系。

关键词: 木葡糖醋杆菌, BC 产量, 培养基优化, 代谢

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)21-0208-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120254

本文网刊:



Optimization of Fermentation Medium of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* and Effects of Exogenous Substances on Its Metabolism

WANG Kai, ZHAO Ping*, FENG Peiyao, JIN Dan, GAO Jie, WANG Rui, LI Jiaying, LIU Bing

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to improve the yield of bacterial cellulose (BC), the fermentation medium of the *Gluconacetobacter xylinus* was optimized by response surface methodology. Based on the optimization results, the effects of sodium alginate (SA), sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) and carboxymethyl cellulose (CMC) on the yield of BC, total sugar consumption, acetic acid and pyruvic acid were investigated. The results showed that when the amounts of addition of glucose was 4%, yeast extract powder was 1%, peptone was 0.8%, MgSO_4 was 1.9%, Na_2HPO_4 was 0.2%, acetic acid was 0.4%, ethanol was 1.6%, the actual yield of BC could reach 5.19 g/L. After adding SA, CMC-Na and CMC, the total sugar consumption increased by 29.9%, 22.82% and 15.73%, and the yield of BC was 6.72, 6.01 and 5.1 g/L, respectively. The content of pyruvic acid in SA group and CMC-Na group was increased by 29.02% and 16.52% compared with the control group. SA and CMC-Na promoted the accumulation and utilization of pyruvate acid, the yield of BC accumulation was increased. The highest acetic acid accumulation (4.27 g/L) was observed in the CMC addition group, which had a certain relationship to the lower yield of BC than the control group.

Key words: *Gluconacetobacter*; bacterial cellulose yield; medium optimization; metabolism

收稿日期: 2023-01-03

基金项目: 兰州理工大学 2020 年博士科研启动基金 (062002)。

作者简介: 王凯 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物资源综合利用, E-mail: 1280734080@qq.com。

* 通信作者: 赵萍 (1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 微生物, E-mail: Pingzhaogdqg@163.com。

细菌纤维素(BC)主要是由醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、八叠球菌属(*Sarcina*)^[1]等生产菌合成的不溶性直链多糖,它的直链之间彼此呈平行状,没有分支结构^[2]。目前研究较多且能够大量合成 BC 的生产菌为木葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinum*),原名木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)^[3]。BC 与植物纤维素不同之处在于 BC 不含果胶、半纤维素等物质,且具有高度多孔三维网络结构,因此 BC 具有高聚合度、高结晶度、可降解性^[4]、较好的生物相容性等特点^[5]。目前 BC 已成功应用于食品工业、生物医学、保鲜材料、复合材料^[6-9]等领域。但由于其产量低、成本高、无法实现产业化生产,故极大地制约了 BC 的工业化推广应用^[7]。目前,国内外对提高 BC 产量的研究开展了大量的工作,如菌种选育、改变生物反应器和发酵参数^[8]、代谢机理研究等,以期降低 BC 生产成本、改良 BC 合成途径、拓宽 BC 应用范围。

微生物在发酵培养过程中需要利用大量的营养元素,如碳源、氮源、生长因子等,因此发酵培养过程中所用到的培养基成分能够直接影响到 BC 的合成^[9]。此外,在木葡糖醋杆菌发酵过程中,多种添加物已被证实对菌体生长或合成纤维素具有一定的促进作用,如水溶性多糖^[10]、木质素磺酸盐^[11]、金属离子^[12]等。

本研究采用实验室分离菌株为生产菌株,利用 Plackett-Burman 试验设计法和 Box-Behnken 试验设计法^[13]得到合成 BC 的最优培养基配方,有效提高 BC 产量;在此基础上,通过添加 SA、CMC-Na、CMC 等水溶性多糖大分子作为合成体系的外源物质,对发酵过程中总糖含量、乙酸含量、丙酮酸含量等指标变化进行研究,以指标量化的方式,探究不同物质对细菌纤维素合成的影响机理,以期为进一步研究外源物质对 BC 合成的影响机理提供理论依据,为拓展 BC 的工业化应用提供一定的理论与实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)K8-5 由兰州理工大学生命科学与工程学院赵萍老师课题组筛选并保藏;葡萄糖 天津市致远化学试剂有限公司;蛋白胨、酵母浸粉 上海迈瑞尔;K₂HPO₄、Na₂HPO₄、MgSO₄ 天津市北辰方正试剂厂;琼脂 天津大茂化学试剂厂;乙酸、乙醇 天津市富宇精细化工有限公司;斜面培养基:葡萄糖 3%,酵母膏 0.5%,MgSO₄ 1.5%,K₂HPO₄ 0.15%,琼脂 2%,pH 自然;基础培养基:葡萄糖 3%,酵母膏 0.5%,MgSO₄ 1.5%,K₂HPO₄ 0.15%,乙醇 2%,pH 自然。

DHP-9082 电热恒温培养箱 上海恒一科学仪器有限公司;YX280B 压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;Cary50 紫外分光光度计 美国瓦

里安公司;SHA-82 恒温振荡器 上海贺帆仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养 菌种活化:挑取适量保存在 4 ℃ 条件下的木葡糖醋杆菌接种于斜面培养基中,29 ℃ 静置培养 7 d。种子培养:于种子培养基中接种 2~3 环斜面种子,29 ℃,150 r/min 恒温振荡 24 h。发酵培养:10%(v/v)种子液接入基础培养基,29 ℃ 静置培养 7 d^[14]。

1.2.2 木葡糖醋杆菌发酵培养基优化

1.2.2.1 单因素实验 实验前期参照 1.1 中基础培养基配方,通过控制变量法,已筛选出最优碳源为葡萄糖,最优氮源为酵母浸粉、蛋白胨,最优无机盐为 Na₂HPO₄、MgSO₄,最优有机酸为乙酸。以 BC 产量为指标,确定各因素的最佳添加范围。研究葡萄糖添加量(2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%)、酵母浸粉或蛋白胨(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%)代替基础培养基中酵母膏、MgSO₄ 添加量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%)、Na₂HPO₄(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%)代替 K₂HPO₄、乙酸添加量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%)、乙醇添加量(1%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%)对 BC 产量的影响。考察某一因素时,其他固定条件为葡萄糖添加量 3%、酵母膏添加量 0.5%,MgSO₄ 添加量 1.5%,K₂HPO₄ 添加量 0.15%,乙醇添加量 2%。

1.2.2.2 Plackett-Burman 试验 根据单因素实验结果,利用 Plackett-Burman 试验对影响 BC 产量的 7 个因素为自变量,BC 产量作为响应值,设计 7 个因素 2 个水平试验,水平设置如表 1^[15-16]。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiments design

水平	A 葡萄糖 (%)	B 酵母浸粉 (%)	C 蛋白胨 (%)	D MgSO ₄ (%)	E Na ₂ HPO ₄ (%)	F 乙酸 (%)	G 乙醇 (%)
低水平 (-1)	2	0.2	0.2	0.5	0.1	0.1	1
高水平 (+1)	8	1.4	1.4	3.5	0.7	0.7	2.2

1.2.2.3 Box-Behnken 响应面设计试验 根据 Box-Behnken 试验设计原理,结合单因素及 Plackett-Burman 试验的结果,确定 MgSO₄、酵母浸粉、葡萄糖 3 个显著因素为 Box-Behnken 试验考察自变量,BC 产量作为响应值,设计三因素三水平的响应面试验,因素水平及编码见表 2。

1.2.2.4 BC 产量的测定 将发酵液中气液交界处生成的 BC 膜取出,用蒸馏水多次冲洗,后浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,煮沸 30 min,冷却后再用 0.5% 的乙酸浸泡 5 min,经蒸馏水多次冲洗至膜

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及编码
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experiments

因素	编码	水平		
		-1	0	+1
葡萄糖(%)	A	3	4	5
酵母浸粉(%)	B	0.8	1	1.2
MgSO ₄ (%)	C	1.5	2	2.5

呈乳白色半透明,将处理后的纤维素膜 75 ℃ 烘干至恒重,称量 BC 重量^[17]。

1.2.3 添加外源物质对总糖含量、OD₆₀₀、pH、乙酸含量、丙酮酸含量的影响

1.2.3.1 外源物质添加量的确定 在基础培养基中分别添加因素水平为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7%(w/v)的SA、CMC-Na 和 CMC,经 120 ℃、121 kPa 灭菌 30 min 后按比例接种 10%(v/v)的种子液,29 ℃ 条件下静置培养 7 d,收取 BC,确定 BC 产量,根据 BC 最大产量选择最优添加量。

1.2.3.2 发酵样液的制备 在优化培养基中分别添加外源物质(SA、CMC-Na 和 CMC),以空白添加为对照组,将种子液按 10%(v/v)的接种量接种于培养基中,29 ℃ 静置培养 7 d,每天对四组发酵液进行随机 3 次平行取样,共取 7 d,测定其发酵指标(BC 产量、OD₆₀₀、总糖含量、pH、乙酸含量、丙酮酸含量)。

1.2.3.3 菌体生长情况的测定 将 1% 纤维素酶(10000 U/g)溶液置于柠檬酸缓冲溶液(pH5)中,将发酵液与纤维素酶溶液以 1:1 混合,50 ℃ 水浴 2 h,室温静置后取两份上清液,将其中一份上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌作为对照组^[18],使用紫外分光光度计测定菌液在 600 nm 处的吸光度,以 OD₆₀₀ 值反映菌体生长发育情况^[19]。

1.2.3.4 总糖的测定 将发酵样液 4000 r/min 离心 10 min 后取上清液 5 mL,加入 5 mL 6 mol/L HCl 溶液和 30 mL 蒸馏水,70 ℃ 水浴 15 min,冷却后调 pH 至 7~8,定容至 100 mL,作为混合液备用。吸取混合液 1 mL,DNS 试剂 2 mL,沸水浴 2 min 显色,流水迅速冷却后定容至 25 mL,在 540 nm 处测定样品的吸光值,根据标准曲线计算总糖含量^[20-21]。

1.2.3.5 乙酸及 pH 测定 样品处理:取一定量的发酵样液,经 8000 r/min 离心后取上清液,稀释 10 倍,用 0.22 μm 的滤膜过滤后进样分析。色谱条件:SB-AQ 色谱柱,流动相:pH2.5 的磷酸二氢钾溶液,流速:0.5 mL/min,检测器波长:210 nm,柱温 30 ℃,进样量:10 μL。pH 的测定参考 GB 5009.237-2016 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定^[22]。

1.2.3.6 丙酮酸的测定 参考张继冉^[23]的方法在 320 nm 处测定紫外吸收丙酮酸标准曲线。以丙酮酸含量为 X 轴,吸光值为 Y 轴,绘制丙酮酸标准曲线,标准曲线为 $y=0.2583x+0.0248$ ($R^2=0.9975$)。发酵液

经 8000 r/min 离心 10 min,取上清液用 NaOH 溶液调 pH 为 11.0,在 320 nm 处测其吸光值,根据标准曲线计算丙酮酸含量。

1.3 数据处理

使用 Design Expert 8.0.6、SPSS Statistics 21 软件对试验数据进行处理以及显著性分析($P<0.05$),使用 Origin 2021 软件作图,BC 产量有效数据均取 5 次平行实验的平均值,其余有效数据均取 3 次平行实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 木葡糖酯杆菌培养基优化结果

2.1.1 单因素实验结果 不同物质的添加量对 BC 产量的影响存在一定差异。葡萄糖作为唯一的碳源,为菌体生长和 BC 合成提供能量,如图 1 所示,当葡萄糖添加量为 4% 和 5% 时 BC 产量并不具有显著性差异($P>0.05$),但当葡萄糖添加量增加时,BC 产量呈下降趋势,因此选择葡萄糖的最佳添加量为 4%;氮源是细胞代谢所必需蛋白质的主要成分,占细菌干细胞质量的 8%~14%,当蛋白胨和酵母浸粉分别代替基础培养基中氮源时,对 BC 产量进行测定,结果表明当蛋白胨和酵母浸粉的添加量分别为 0.8% 和 1% 时,BC 产量最高;无机盐可以作为酶的重要组成成分参与微生物的代谢,当 MgSO₄ 添加量为 2% 时,BC 产量最高为 2.89 g/L,且 Na₂HPO₄ 添加量为 0.2% 时,BC 产量最高;Liu 等^[24]研究表明,在 BC 合成过程中,乙醇或乙酸盐作为补充碳源,通过三羧酸循环产生 ATP,可以有效提高 BC 产量,当乙醇添加量为 1.6% 时,BC 合成量最大,当乙酸浓度大于 0.4% 时,BC 合成被抑制,表明过量的乙酸浓度会对细胞生长造成抑制作用,故乙醇和乙酸的最佳添加量分别为 1.6% 和 0.4%。选择上述各物质最佳添加量进行下一步实验。

2.1.2 Plackett-Burman 试验 根据单因素实验进行 Plackett-Burman 试验,如表 3。由表 4 可知 Plackett-Burman 试验模型的 P 值为 $0.013<0.05$,对 BC 产量影响最显著的三个因子为 MgSO₄、酵母浸粉、葡萄

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Design and results of Plackett-Burman experiments

实验号	A	B	C	D	E	F	G	BC产量(g/L)
1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.31±0.11
2	1	-1	1	1	-1	1	1	3.75±0.27
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.29±0.05
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2.51±0.18
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.12±0.05
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.78±0.09
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4.18±0.16
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	3.44±0.15
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.35±0.17
10	1	1	-1	1	1	1	-1	4.44±0.37
11	-1	1	1	-1	1	1	1	0.36±0.11
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	2.42±0.08

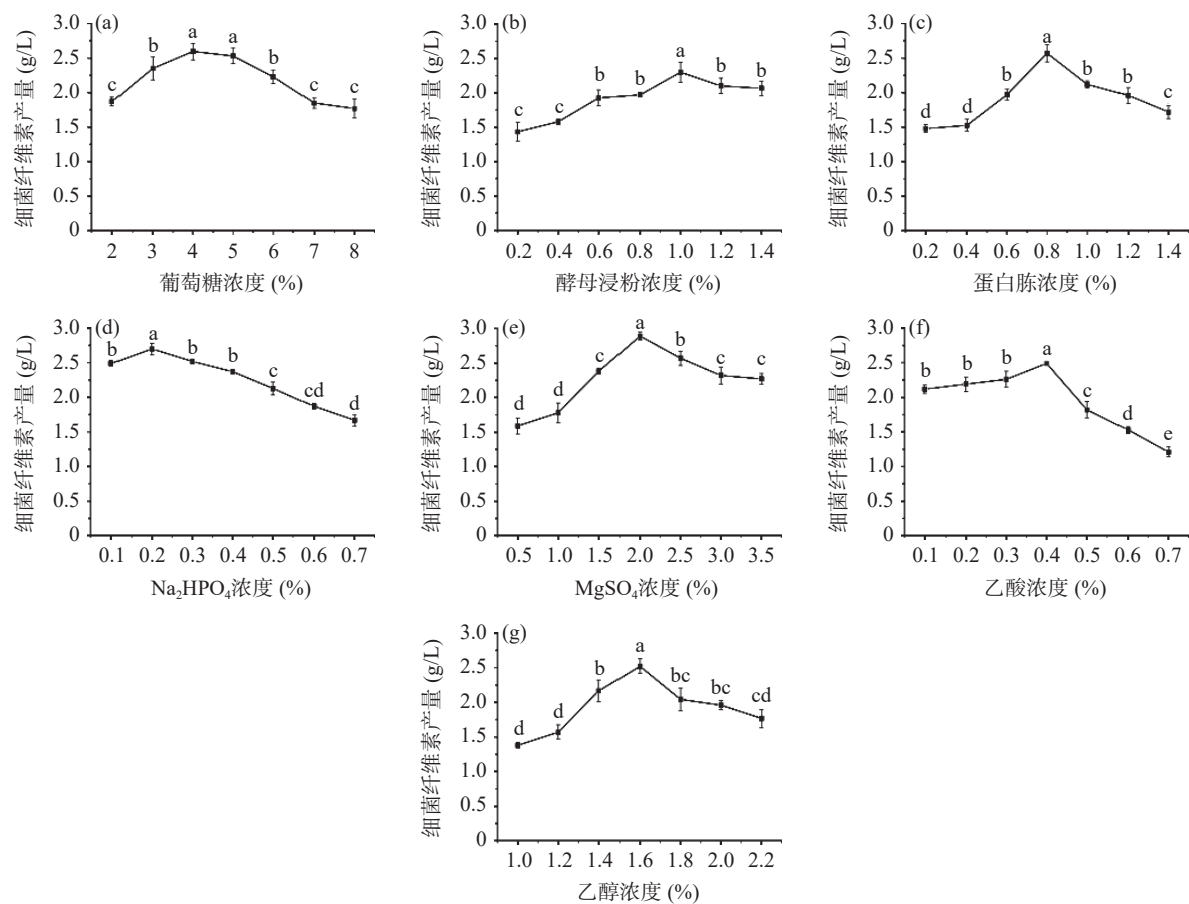


图 1 不同添加物浓度对 BC 产量的影响

Fig.1 Effects of different additive concentrations on yield of bacterial cellulose

注: 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 图 3 同。

糖, 固定其他因素, 蛋白胨(0.8%)、乙酸(0.4%)、乙醇(1.6%)、 Na_2HPO_4 (0.2%)的添加量不变, 进行下一步 Box-Behnken 试验。

表 4 Plackett-Burman 试验的方差分析

Table 4 Analysis of variance of Plackett-Burman experiments

因素	平方和	F值	P值	显著性
模型	25.3	12.99	0.0130	*
A葡萄糖	2.21	7.95	0.0479	*
B酵母浸粉	4.6	16.54	0.0153	*
C蛋白胨	0.037	0.13	0.7324	
D MgSO_4	17.06	61.36	0.0014	**
E Na_2HPO_4	1.37	4.91	0.0909	
F乙酸	1.008E-003	3.625E-003	0.9549	
G乙醇	0.015	0.055	0.8255	

注: *表示差异显著 $P<0.05$, **表示差异极显著 $P<0.01$; 表6同。

2.1.3 Box-Behnken 响应面优化试验结果与分析

在 Plackett-Burman 试验基础上以 MgSO_4 、酵母浸粉和葡萄糖的添加量为响应值, 进行 Box-Behnken 试验, 如表 5。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验数据进行多元回归拟合, 最终得到 BC 产量高低响应面回归模拟方程为:

$$Y=5.20-0.11A-5.000E-003B-0.24C+0.11AB-0.33AC-0.28BC-0.46A^2-0.71B^2-0.48C^2$$

由表 6 可知, A^2 、 B^2 、 C^2 对 BC 产量有极显著影

表 5 Box-Behnken 响应面试验设计与结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken response surface experiment

实验号	葡萄糖	酵母浸粉	MgSO_4	BC产量(g/L)
1	0	0	0	5.29±0.12
2	0	1	1	3.5±0.19
3	0	1	-1	4.32±0.18
4	1	1	0	4.08±0.31
5	0	0	0	5.24±0.08
6	0	0	0	5.19±0.04
7	-1	1	0	4.19±0.09
8	1	0	1	3.54±0.12
9	1	0	-1	4.89±0.19
10	-1	-1	0	4.21±0.03
11	0	-1	-1	3.98±0.15
12	1	-1	0	3.67±0.26
13	0	0	0	5.31±0.09
14	0	-1	1	4.27±0.15
15	0	0	0	4.99±0.18
16	-1	0	1	4.31±0.15
17	-1	0	-1	4.32±0.14

响($P<0.01$), C、AC、BC 对 BC 产量有显著影响($P<0.05$), A、B、AB 影响不显著($P>0.05$)。该模型 P 值为 0.0006, 表明回归模型影响极显著($P<0.01$), 失拟项为 0.1087($P>0.05$)不显著, 决定系数 $R^2=0.9565$, 校正系数 $R^2_{adj}=0.9005$, 说明该回归模型具有良好的拟合度和预测能力。

表 6 Box-Behnken 响应面实验结果方差分析

Table 6 Analysis of variance of Box-Behnken response surface experiment results

方差来源	平方和	自由度	均方	Prob>F	显著性
模型	5.74	9	0.64	0.0006	**
A	0.09	1	0.09	0.1639	
B	2.000E-004	1	5.356E-003	0.9437	
C	0.45	1	0.45	0.0106	*
AB	0.046	1	0.046	0.3026	
AC	0.45	1	0.45	0.0104	*
BC	0.31	1	0.31	0.0239	*
A ²	0.89	1	0.89	0.0018	**
B ²	2.10	1	2.10	0.0001	**
C ²	0.97	1	0.97	0.0014	**
残差	0.26	7	0.037		
失拟项	0.20	3	0.065	0.1087	
纯误差	0.11	4	0.022		
总和	6.58	16			

$$R^2=0.9565, R^2_{adj}=0.9005$$

2.1.4 响应面不同因素间交互作用分析 由图 2 可知,葡萄糖和酵母浸粉(AB)的等高线中心区域呈圆形,表明葡萄糖和酵母浸粉之间交互作用不明显,葡萄糖和 $MgSO_4$ (AC)、酵母浸粉和 $MgSO_4$ (BC)的交互作用的等高线中心区域显示为椭圆形,响应曲面坡度趋势陡峭,表明 AC、BC 的交互作用明显,对 BC 产量影响较大,响应面分析结果与方差分析结果一致。

2.1.5 验证实验 根据试验可得出 BC 产量的最大预测值为 5.23 g/L,最终得到的预测培养基配方为:葡萄糖 3.98%、酵母浸粉 1.01%、蛋白胨 0.8%、 $MgSO_4$ 1.87%、 Na_2HPO_4 0.2%、乙酸 0.4%、乙醇 1.6%,为了实际操纵可控,设置优化后培养基配方为葡萄糖 4%、酵母浸粉 1%、蛋白胨 0.8%、 $MgSO_4$ 1.9%、 Na_2HPO_4 0.2%、乙酸 0.4%、乙醇 1.6%。按此培养基配方进行发酵,实际得到 BC 产量为 5.19 g/L,与预测结果接近,因此,可以证明这个模型准确性较高,可预测实际发酵情况。

文献报道赵浩杰等^[15]通过响应面法优化培养基后,最终 BC 产量为 5.02 ± 0.14 g/L;文章等^[25]利用稀释后的白酒酿造副产物黄水为培养基,BC 产量提高了 53.2%,终产量为 2.42 g/L;张丽平等^[21]在基础培养基中添加乙醇及有机酸后,有效提高了 BC 产量,BC 产量为 3.012 g/L。本文响应面优化后实际 BC 产量为 5.19 ± 0.16 g/L,BC 产量较高,具有较大优势。

2.2 外源物质对 BC 的影响

2.2.1 外源物质添加量的确定 通过单因素实验,确定外源物质 CMC-Na、SA、CMC 的最佳添加量。由图 3 可知,当 CMC-Na 添加量为 0.4%、0.5%、0.6% 时,BC 含量并不具有显著性差异($P>0.05$),发酵环境中不同因素会对发酵结果产生不同影响,且三次平行实验结果显示 CMC-Na 添加量为 0.5% 时,BC 合成量最大,故 CMC-Na 的最佳添加量为 0.5%;随着

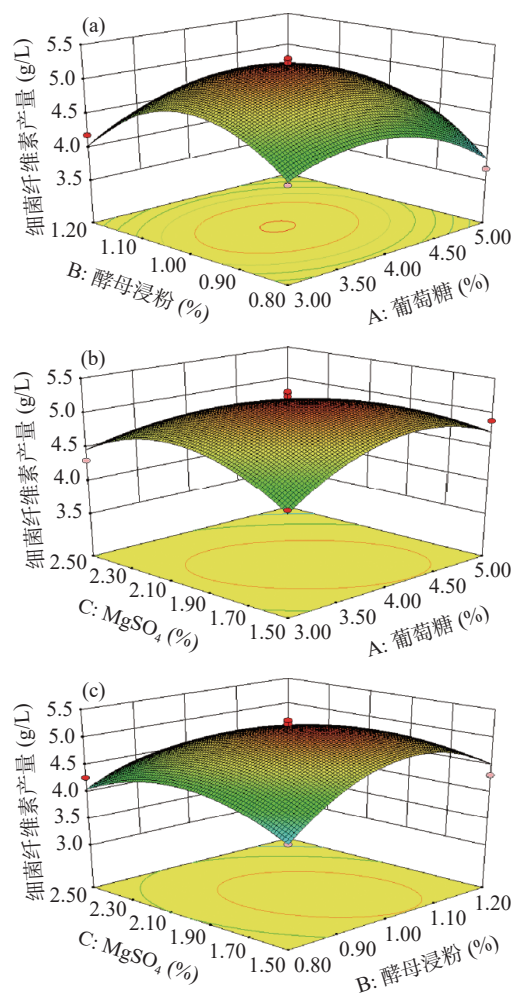
图 2 葡萄糖、酵母浸粉、 $MgSO_4$ 添加量交互作用对 BC 产量影响的响应面图

Fig.2 Response surface plots of the effects of interaction between glucose, yeast powder and magnesium sulfate addition on the yields of BC

SA 添加量的增加,合成 BC 的促进作用较明显,SA 的最佳添加量为 0.4%;添加 CMC 后培养基体系粘度增大,BC 产量误差较大,但当 CMC 添加量为 0.5% 时,BC 产量最高。

2.2.2 外源物质对 BC 产量、 OD_{600} 、总糖含量的影响 木葡糖醋杆菌发酵过程中,培养基中的一些外源物质可以直接与纤维素结合,干扰其结晶或与纤维素共结晶,部分外源物质也可以直接干扰细菌细胞,间接改变纤维素的生产^[26]。

由图 4a 可知,添加外源物质后葡萄糖利用率明显提高,与对照组相比,添加 SA 和 CMC-Na 的细菌纤维素产量由 5.19 g/L 上升到 6.74 g/L 和 6.01 g/L,增幅达到 29.87% 和 15.8%;添加 CMC 后的 BC 产量为 5.1 g/L,低于对照组,表明添加一定量的 SA 和 CMC-Na 可以有效提高 BC 产量,添加 CMC 后不但没有促进作用,反而抑制了 BC 的合成,这与钱子俊等^[3]的研究结果类似。所有实验组中菌体浓度整体呈持续增长趋势(图 4b)。添加外源物质后,发酵前期菌体浓度的增长速率均高于对照组,尤其是 SA 处

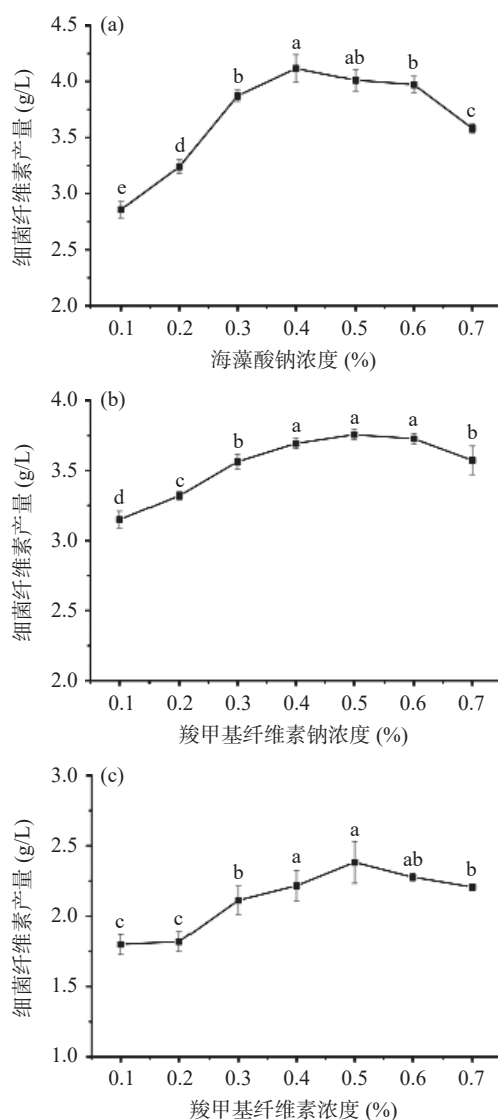


图3 海藻酸钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素添加浓度对 BC 产量的影响

Fig.3 Effects of SA, CMC-Na, CMC concentrations on yield of bacterial cellulose

理组菌体浓度上升趋势最为明显,表明加入适量外源物质可以缩短木葡糖醋杆菌发酵过程的适应期,使其迅速进入对数期,菌体迅速生长、繁殖,从而提高 BC 产量。在发酵过程中,葡萄糖主要用于 BC 合成途径以及糖酵解(EMP)途径和三羧酸循环(TCA),产生能量和菌体所需的蛋白质,同时产生各种有机酸与其他代谢副产物^[27]。由图 4c 可看出,对照组以及添加 SA、CMC-Na、CMC 后的总糖消耗量分别为 11.57、15.03、14.21、13.39 g/L,与对照组相比,添加外源物质后总糖消耗量和总糖消耗速率均大于对照组,表明添加外源物质后促进了碳源的消耗。发酵前 3 d 总糖快速消耗,后趋于平稳,主要是由于发酵前期菌体迅速繁殖,合成 BC,碳源物质消耗速率加快。张丽平等^[21]的研究表明,部分外源物质的添加可以减少无效碳循环,提高糖转化率,促进总糖消耗,提高 BC 合成途径的碳流量,与本文中添加 SA 和 CMC-Na 组研究结果类似。

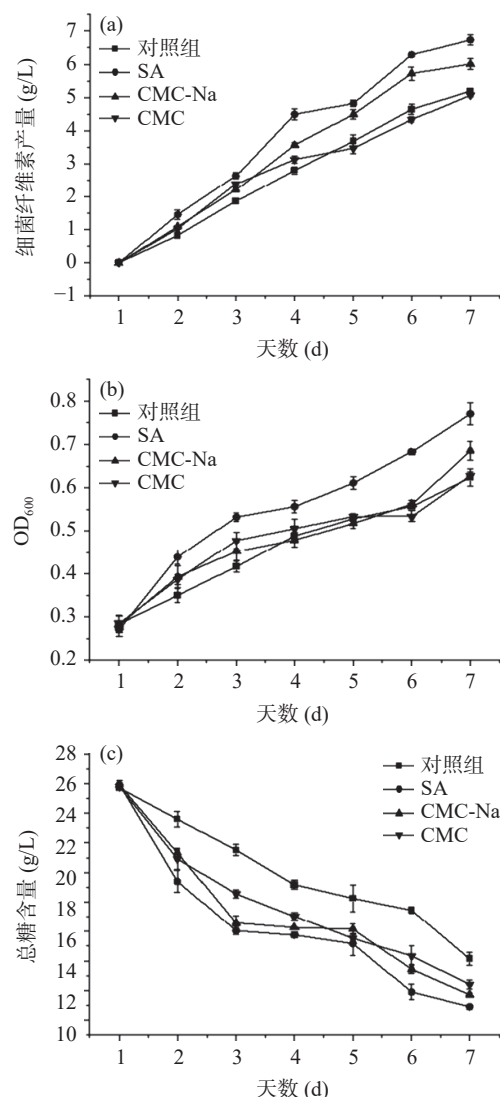


图4 外源物质对 BC 产量(a)、OD₆₀₀(b)、总糖含量(c)的影响

Fig.4 Effects of exogenous substances on bacterial cellulose yield (a), OD₆₀₀ (b) and total sugar content (c)

2.2.3 外源物质对发酵液 pH、乙酸含量、丙酮酸含量的影响 由图 5a 可看出,添加不同外源物质对发酵液 pH 的变化影响有一定差异,发酵前期 pH 迅速下降,发酵中后期缓慢下降,这种现象与 BC 合成过程中乙酸、葡萄糖酸等物质的生成和后期消耗有关^[28]。对照组 pH 下降趋势最明显,且发酵过程中 pH 均低于其他三组,可能是由于对照组中其他有机酸的积累量高于外源添加物组。李萧^[29]的研究中发现,与添加外源物质组相比未添加外源物质的菌株利用碳源合成 BC 时,会生成大量的葡萄糖酸,使 pH 降低。吴敏等^[30]研究发现添加外源物质可以减缓 pH 的下降,为菌体合成 BC 提供适宜的培养环境,从而促进 BC 合成,与本研究 SA 与 CMC-Na 组结果类似。

由图 5b 乙酸含量变化图可看出,添加 CMC 后乙酸积累量最高为 4.27 g/L,其次是对照组,而 SA 与 CMC-Na 组在发酵中后期乙酸积累量分别为 3.85 g/L

和 3.87 g/L, 高于对照组, 但在终期低于对照组, 表明 SA 与 CMC-Na 的添加促进了乙酸的部分积累, 且一定量的乙酸可以作为底物, 在发酵后期被利用, 流向 BC 合成路径, 促进 BC 合成。而 CMC 组乙酸积累量显著高于其他三组, BC 合成被抑制, 表明 CMC 的添加会促使菌株积累过量的乙酸, 从而使细菌细胞的生长和纤维素的合成受到抑制。马霞等^[31]研究有机酸对 BC 合成的影响规律时发现, 当乙酸浓度高于临界值, 会导致 BC 产量下降; 李珏等^[32]研究表明, 汉逊氏葡萄糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter hasenii*) 发酵生产 BC 时的最适乙酸浓度为 3 g/L。

由图 5c 可知, 4 个组的丙酮酸含量整体呈先上升后下降的趋势, 添加外源物质后丙酮酸积累量明显高于对照组, 添加 SA 和 CMC-Na 后丙酮酸在第 5 d 达到最高积累量 2.89 g/L 和 2.61 g/L, 而 CMC 与对照组在第 4 d 最高达到 2.41 g/L 与 2.24 g/L, 当丙酮酸大量积累, EMP 途径和 TCA 循环受到抑制, 随后丙酮酸作为底物被消耗, 经过糖异生后合成 6-磷酸葡萄糖, 使代谢流向 BC 合成途径, 丙酮酸含量下

降^[21], SA 与 CMC-Na 的添加促进了丙酮酸的积累与再利用, 进而提升了 BC 的产量。

3 结论

本文利用响应面优化试验, 确定木葡糖醋杆菌合成 BC 的最佳培养基配方为葡萄糖 4%、酵母浸粉 1%、蛋白胨 0.8%、MgSO₄ 1.9%、Na₂HPO₄ 0.2%、乙酸 0.4%、乙醇 1.6%, 此时, BC 产量可达 5.19 g/L。并在优化培养基中添加 SA、CMC-Na 和 CMC 三种物质, 测定 BC 产量、总糖、乙酸、pH 等指标。结果表明, 与对照组相比, 添加 SA 和 CMC-Na 后, 消耗的碳源分别增加了 3.46 g/L 和 2.64 g/L, 同时也促进了丙酮酸的积累, 使糖异生途径被加强, 更多能量流向 BC 合成途径, 最终 BC 产量分别为 6.74 g/L 和 6.01 g/L, 与对照组相比分别提高了 29.87% 和 15.8%; 添加 CMC 后乙酸含量最大为 4.27 g/L, 过量的乙酸积累量对细菌细胞的生长和纤维素的合成造成负面影响, BC 产量为 5.1 g/L, 较对照组 BC 产量下降。后续将继续针对发酵液中各种有机酸对 pH 及 BC 产量的影响开展深入研究, 以期外源物质对木葡糖醋杆菌合成 BC 的影响提供理论基础, 为细菌纤维素的规模化生产提供一定的参考。

参考文献

- [1] 赵鑫, 熊健力, 任叶琳, 等. 细菌纤维素合成与鉴定研究综述[J]. 化工进展, 2020, 39(S2): 262-268. [ZHAO X, XIONG J L, REN Y L, et al. Synthesis and identification of bacterial cellulose[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(S2): 262-268.]
- [2] RADIMAN C, YULIANI G. Coconut water as a potential resource for cellulose acetate membrane preparation[J]. Polymer International, 2008, 57(3): 502-508.
- [3] 钱子俊, 张一瞳, 刘鹏, 等. 不同添加剂对木醋杆菌发酵细菌纤维素的影响[J]. 林业工程学报, 2018, 3(4): 62-67. [QIAN Z J, ZHANG Y T, LIU P. Effects of different additives on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinum*[J]. Journal of Forestry Engineering, 2018, 3(4): 62-67.]
- [4] JI L, ZHANG F, ZHU L, et al. An in-situ fabrication of bamboo bacterial cellulose/sodium alginate nanocomposite hydrogels as carrier materials for controlled protein drug delivery[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 170: 459-468.
- [5] 张艳, 孙怡然, 于飞, 等. 细菌纤维素及其复合材料在环境领域应用的研究进展[J]. 复合材料学报, 2021, 38(8): 2418-2427. [ZHANG Y, SUN Y R, YU F, et al. Research progress on the application of bacterial cellulose and its composites in environmental field[J]. Acta Materialiae Compositae Sinica, 2021, 38(8): 2418-2427.]
- [6] AREVALO GALLEGOS A M, CARRERA S H, PARRA R, et al. Bacterial cellulose: A sustainable source to develop value-added products-A review[J]. BioResources, 2016, 11(2): 5641-5655.
- [7] 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. [YANG Y, JIA J J, LU S M, 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.]
- [8] BLANCO PARTE F G, SANTOSO S P, CHOU C C, et al.

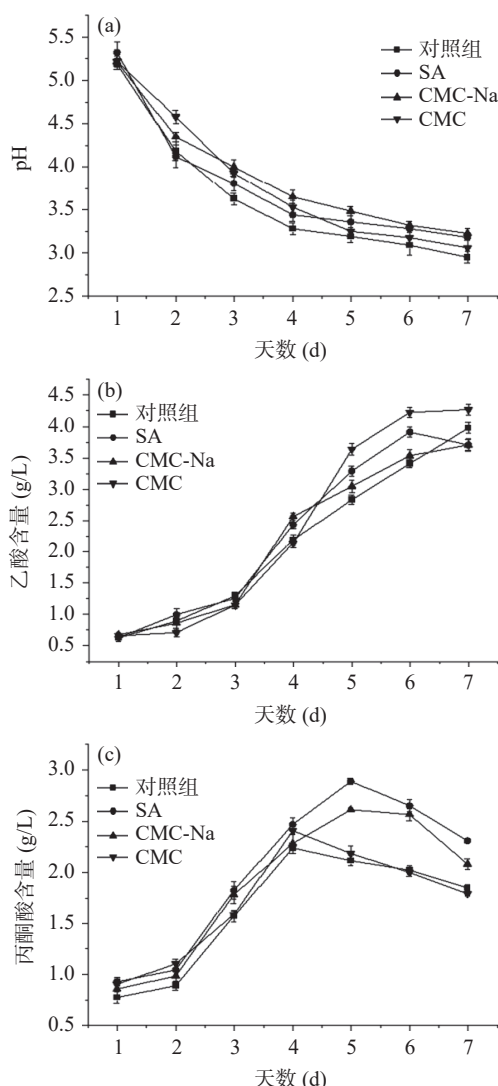


图5 外源物质对发酵液 pH(a)、乙酸(b)、丙酮酸(c)的影响
Fig.5 Effects of exogenous substances on fermentation liquid pH (a), acetic acid (b) and pyruvic acid (c)

Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(3): 397–414.

[9] 尤勇. 乙醇、乙酸、乳酸对木葡糖醋杆菌合成细菌纤维素的影响及其功能分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2019. [YOU Y. Function exploration of ethanol, acetic acid and lactic acid on the synthesis of bacterial cellulose in *Gluconacetobacter xylinus*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.]

[10] JUNG J Y, PARK J K, CHANG H N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(3): 347–354.

[11] KESHK S, SAMESHIMA K. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 40(1): 4–8.

[12] ZHU H, JIA S, WAN T, et al. Biosynthesis of spherical Fe₃O₄/bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86(4): 1558–1564.

[13] 毋锐琴. 高产细菌纤维素菌株的筛选及发酵工艺优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008. [WU R Q. Selection of strain with high-yield bacterial cellulose and optimization of fermentation process[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2008.]

[14] 李艳. 细菌高产菌株筛选鉴定与发酵工艺优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013. [LI Y. Selection and identification of strain with high-yield bacterial cellulose and optimization of fermentation process[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013.]

[15] 赵浩杰, 王光翟, 廖博文, 等. 响应面法优化动态发酵细菌纤维素菌株 HS01 培养基[J]. *纤维素科学与技术*, 2020, 28(4): 1–9, 27. [ZHAO H J, WANG G Z, LIAO B W, et al. Optimization of fermentation medium of shake flask for bacterial cellulose producing strain *Komagataeibacter hansenii* HS01 by response surface methodology[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2020, 28(4): 1–9, 27.]

[16] 林杉, 赵萍, 付云娜, 等. 羊肚菌胞外多糖液态发酵培养基配方优化及其体外降血糖活性[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 196–203. [LIN S, ZHAO P, FU Y N, et al. Optimization of liquid fermentation medium formulation of *Morchella eschschera* exopolysaccharide and its hypoglycemic activity *in vitro*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(20): 196–203.]

[17] MARTINS D, FERREIRA D D C, GAMA M, et al. Dry bacterial cellulose and carboxymethyl cellulose formulations with interfacial-active performance: Processing conditions and redispersion[J]. *Cellulose*, 2020, 27(11): 6505–6520.

[18] 李元敬. 细菌纤维素发酵优化及代谢途径调控[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2011. [LI Y J. Optimization of bacterial cellulose fermentation and regulation of metabolic pathways[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2011.]

[19] 李孔翰, 陈玲琳, 周建森, 等. TAT-SOD 在长期保藏的重组毕赤酵母中表达的条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(8): 51–58. [LI K H, CHEN L L, ZHOU J S, et al. Optimization of TAT-SOD expression conditions in long-term preserved recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(8): 51–58.]

[20] 贾青慧, 卢红梅, 陈莉, 等. 增效因子对木醋杆菌产细菌纤维素发酵液中物质变化的影响[J]. *中国酿造*, 2016, 35(1): 14–18. [JIA Q H, LU H M, CHEN L, et al. Effect of synergistic factor on the substances change of fermentation liquid with bacterial cellu-

lose-producing *Acetobacter xylinum*[J]. *China Brewing*, 2016, 35(1): 14–18.]

[21] 张丽平, 卢红梅, 戴锐, 等. 乙醇及有机酸对木醋杆菌合成细菌纤维素的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(4): 161–165, 169.

[ZHANG L P, LU H M, DAI R, et al. Study on the function of ethanol and organic acid to *Acetobacter xylinum* synthetic bacterial cellulose[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(4): 161–165, 169.]

[22] 国家卫生和计划生育委员会 GB 5009.237-2016 食品 pH 值的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission GB 5009.237-2016 Determination of food pH value[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]

[23] 张继冉. 丙酮酸发酵工艺的优化及其快速测定方法的研究[D]. 开封: 河南大学, 2011. [ZHANG J R. Optimations on parameters control of pyruvate fermentation and studies on rapid detection of pyruvic acid[D]. Kaifeng: Henan University, 2011.]

[24] LIU M, LIU L, JIA S, et al. Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6266.

[25] 文章, 何朝玖, 陈才, 等. 以黄水为培养基生产细菌纤维素[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 100–107. [WEN Z, HE Z J, CHEN C, et al. Production of bacterial cellulose using “yellow water” as medium[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(9): 100–107.]

[26] RUKA D R, SIMON G P, DEAN K M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1717–1723.

[27] 李萧, 王森. *Komagataeibacter rhaeticus* 3-15 全基因组及葡萄糖脱氢酶基因缺失体的构建[J]. *工业微生物*, 2020, 50(2): 7–14. [LI X, WANG M. Whole genome and construction of glucose dehydrogenase gene deletion in *Komagataeibacter rhaeticus* 3-15[J]. *Industrial Microbiology*, 2020, 50(2): 7–14.]

[28] CHAWLA P R, BAJAJ I B, SURVASE S A, et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications[J]. *Food Technology & Biotechnology*, 2009, 47(2): 107–24.

[29] 李萧. 莱蒂亚驹形杆菌 315 生物合成细菌纤维素[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [LI X. The bacterial cellulose biosynthesis of *Komagataeibacter rhaeticus* 315[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]

[30] 吴敏, 喻少帆, 曹献英, 等. 添加海藻酸钠对椰子水体系合成细菌纤维素的影响[J]. *精细化工*, 2011, 28(5): 456–460. [WU M, YU S F, CAO X Y, et al. Effect of different additive amount of sodium alginate in coconut water culture system on bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* [J]. *Fine Chemicals*, 2011, 28(5): 456–460.]

[31] 马霞, 贾士儒, 关凤梅, 等. 有机酸对木醋杆菌合成细菌纤维素的影响规律[J]. *纤维素科学与技术*, 2003(1): 34–37. [MA X, JIA S R, GUAN F M, et al. Effect of organic acid on the production of *Acetobacter xylinum* cellulose [J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2003(1): 34–37.]

[32] 李珏, 董梦娜, 吴延鸽, 等. 葡糖酸醋杆菌 JR-02 产细菌纤维素发酵工艺优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37(3): 42–48. [LI J, DONG M N, WU Y G, et al. Optimization of fermentation process of *Gluconacetobacter hansenii* JR-02 for bacterial cellulose production [J]. *China Brewing*, 2018, 37(3): 42–48.]