

纤维素高产菌的筛选与鉴定

刘 娅¹, 杨 勇², 肖 谊¹, 代立勤¹, 乔尚杰¹

(1. 石河子大学食品学院, 新疆 石河子, 832000

2. 湖南怀化医学高等专科学校药理学系, 湖南 怀化 418000)

摘 要: 本研究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, 反复筛选, 从杏子中分出了一株纤维素生产能力强、产量稳定(纤维素产量9g/L)的菌株, 初步鉴定为醋化醋杆菌。

关键词: 细菌纤维素; 筛选; 鉴定

Screening and Identification of Bacterium Strain with High Cellulose Yield

LIU Ya¹, YANG Yong², XIAO Yi¹, DAI Li-qin¹, QIAO Shang-jie¹

(1. College of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Department of Pharmacology, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China)

Abstract: Using some ordinary food and fruit teeming in July of Xinjiang as sample, through static culture and repeated screening, a strain with high production capacity and stable output of bacterial cellulose from apricots (yield of bacterial cellulose 9g/L) was obtained, and it was preliminary identified as *Acetobacter aceti* subsp.

Key words bacterial cellulose; screening; identification

中图分类号: Q539.3 Q933 Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0304-03

纤维素作为植物细胞的基本成分, 是地球上最丰富的碳水化合物, 也是造纸、纺织、生物降解材料、医药、食品添加剂等工业的重要生产原料, 但由于植物中木质素、半纤维素等的存在, 使得高纯度纤维素的提取、精制成为工业领域的一项重大技术难题, 因此如何有效提高纤维素纯度、积极寻求新的纤维素来源就成为纤维素科学迫切需要解决的课题之一。近年来的研究表明, 某些细菌能以异养方式产生胞外细菌纤维素, 其结构与天然纤维素非常相似, 都是由葡萄糖以 β -1, 4-糖苷键连接而成的高分子化合物。细菌纤维素相对于传统的纤维素资源有其优势, 如加工时不用去木质素, 可合成高质量的纸张或者加工成任何形状的无纺布, 还可通过发酵条件的改变控制合成不同结晶度的纤维素。由于它具有纯度高、结晶度高、机械强度高、吸水量高及生物相容性好等优点, 因此, 研究和开发细菌纤维素制品日益成为食品、造纸、声音振动膜、人造皮肤的制造、造纸行业及生物降解材料等领域的热点^[1-2]。

本研究根据新疆环境特点, 利用本地食品、果蔬资源, 以葡萄糖为糖原, 从中筛选出产纤维素能力强的细菌, 并对其鉴定, 从而为细菌纤维素的后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离菌种的样品来源

石河子大学果园采集的土壤、残次野苹果; 石河子金马市场采集的散醪糟、零售泡菜、残次蟠桃、杏子; 超市采购的瓶装醋。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 富集培养基

葡萄糖5%, 酵母膏0.5%, 乙酸钠0.2%, CaCO_3 1%, 用乙酸调pH至5.0, 121℃灭菌20min, 灭菌后加入2%乙醇和50mg/L制霉菌素。

1.1.2.2 发酵培养基

葡萄糖5%, 蛋白胨0.5%, 酵母膏0.5%, 柠檬酸0.1%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, 乙醇0.5%, 调pH至5.8, 121℃灭菌20min。

1.1.2.3 鉴定培养基

葡萄糖10%, 酵母膏1%, CaCO_3 (或乳酸钙) 1%, 乙醇2%, 琼脂2%, 调pH至6.2, 121℃灭菌20min。

1.1.2.4 生酮实验培养基

收稿日期: 2007-02-02

作者简介: 刘娅(1974-), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: 168274609@163.com

表1 三角瓶发酵培养中不同来源样品筛选的目的菌产纤维素量

Table 1 Celluloses yields by strains from different sources

样品来源	土壤	散醪糟	瓶装醋	零售泡菜	残次野苹果	残次蟠桃	杏子
细菌纤维素膜产量(g/L)(干重)	2.4	3.5	无	3.7	6.3	5.1	9.0

A. 葡萄糖 3%, CaCO_3 2%, 酵母膏 1%, 琼脂 2%, 121℃灭菌 20min; B. 甘油 3%, 酵母膏 3%, 琼脂 2%, 121℃灭菌 20min。

1.1.3 仪器

SW-CJ-1CU型超净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; FA1004型电子天平 上海精科天平仪器有限公司; DHG-9146A型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验仪器有限公司; DNP-9272型电热恒温培养箱 上海精宏实验仪器有限公司; LS-B50L型立式蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂; FFD05A真空冷冻干燥器 西安飞机设计研究所; LXJ-IIB型低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂; CHL奥林巴斯生物显微镜 奥林巴斯(台湾)公司; DMB5含图像处理器数码显微镜 中国麦克奥迪实业集团公司; precisely FT-IR光谱仪 美国Perkin-Elmer公司。

1.1.4 试剂

葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、乙酸钠、 CaCO_3 、乙酸、乙醇、琼脂、制霉菌素、柠檬酸、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、KBr、甘油、辅酶Q₁₀和纤维素酶等。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

将采集的样品粉碎或打浆后以1:10(V/V)无菌水稀释,取稀释液1ml接入经灭菌装有10ml富集培养液的试管中,28℃静态培养3d后观察,凡管内液面长有乳白色胶质膜者为阳性。

将长膜试管中的菌液采用划线分离方法接种于灭菌后的鉴定培养基上,28℃恒温培养5d,对有透明圈产生的菌落进行菌落形态和细菌显微结构的观察,挑革兰氏染色呈现阴性的杆菌单菌落接入富集培养基,28℃恒温培养,观察长膜情况。以上富集和分离操作反复进行2次,直到分出纯菌株。

1.2.2 菌株显微形态观察

采用革兰氏染色,用油镜观察菌株个体形态,并进行显微照像。

1.2.3 菌落形态观察

用肉眼观察划线分离纯化的菌株形态,并进行数码照像。

1.2.4 菌株生理生化特性检测^[3-5]

参照《伯杰细菌鉴定手册》,进行乙醇氧化、乳

酸盐氧化、产纤维素、过氧化氢酶生成、淀粉水解、明胶水解及生酮实验等。

1.2.5 纤维素膜纯度的定性分析

称取一定量真空冷冻干燥后的薄膜,充分研磨后,加入用磷酸缓冲液(pH5.0)配制的纤维素酶液,50℃保温水解,观察膜的溶解情况。其酶解程度以细菌纤维素的失重率(%)表示。

1.2.6 纤维素膜的红外光谱鉴定与结构分析^[1]

将纤维素薄膜真空冷冻干燥后,研成粉末,用溴化钾压片处理,放入样品池对其进行透射,波长范围400~4000 cm^{-1} 。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

样品经过初筛及反复复筛,野苹果及杏子在实验过程中都有透明圈和长膜现象出现,其中以杏子中分离出的菌株产生的透明圈最明显,在试管培养及三角瓶发酵培养中产膜速度快,产膜量大(9.0g干重/L培养液),所产薄膜质地均匀、光滑,培养5d后,厚度可达4mm(见表1和图1、2),因此,以杏子中分离出的菌株为产纤维素出发菌株进行研究,并将其命名为APR72。



图1 产透明圈的菌落

Fig.1 Colonies producing transparent circle

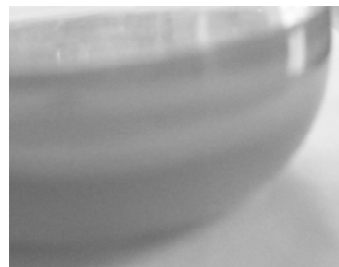


图2 长菌膜的三角瓶

Fig.2 Triangular flask with BC film

2.2 APR72 菌株的细菌学鉴定

2.2.1 形态与培养特征

光学显微镜观察革兰氏染色后的菌株, 该菌为革兰氏阴性菌, 菌体呈杆状, 长约为 $3\mu\text{m}$, 宽约为 $0.5\mu\text{m}$, 较粗, 两端稍钝圆, 以单个形式存在为主, 小部分呈链状, 照像显微镜观察结果见图 3。

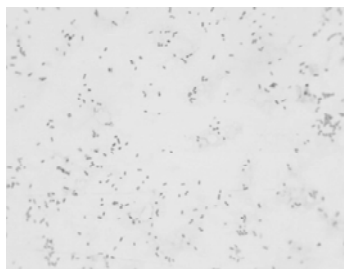


图3 APR72 的照像显微照片(高倍镜)
Fig.3 Microscope photograph of APR72

APR72 在鉴定培养基上培养 5d 后, 形成 $2\sim 2.5\text{mm}$ 的菌落, 菌落凸起, 呈圆形, 表面光滑, 湿润, 边缘较规则, 略带棕黄色, 放置时间较长后棕色加深。

2.2.2 菌种生化鉴定

菌种生理生化鉴定结果见表 2。

表2 菌种生理生化测定结果

Table 2 Results of biochemical and physiological detection on APR72

特征	结果	特征	结果
好氧性	+	明胶水解	—
乙醇氧化成乙酸	+	过氧化氢酶	+
乳酸盐氧化	+	生酮实验	+
产纤维素实验	+	以铵盐为唯一氮源	—
淀粉水解	—	醌类物质	Q ₁₀

注: “+”表示阳性, “—”表示阴性。

参照《伯杰细菌鉴定手册》, 根据以上鉴定结果, 初步判定该菌为醋化醋杆菌。

2.3 纤维素膜纯度检测

利用 Nonvon 纤维素酶对所产细菌纤维素进行酶解, 在 2h 时, 已有近 70% 的纤维素分解, 6h 后, 纤维素全部分解(表 3)。说明该菌株能生产纤维素, 且纤维素纯度非常高。

表3 纤维素酶对细菌纤维素膜的酶解程度

Table 3 Degree of cellulose hydrolyzing bacterial cellulose film

纤维素酶作用时间(h)	1	2	3	4	5	6
细菌纤维素膜的失重率(%)	43	69	87	95	98	100

2.4 红外光谱鉴定结果

ARP72 所产细菌纤维素的红外光谱分析结果见图 4。

从图 4 可看出, 在 1032cm^{-1} 处的吸收峰, 是由碳氧键的伸缩振动引起的, 是纤维素分子的特征峰; 在 3347cm^{-1} 处的吸收峰, 反映了 O-H 的伸缩振动; 在 1639cm^{-1} 处的吸收峰是由纤维素 4' 端的半缩醛基引起的, 在 1423cm^{-1} 处的吸收峰是由 C-H 键伸缩振动引起的, 深度与纤维素结晶度有关; 而在 2934cm^{-1} 处的吸收峰则是由 $\text{CH}_2\text{-CH}$ 伸展产生的。在 916cm^{-1} 的吸收峰是糖苷键的特征峰^[6]。

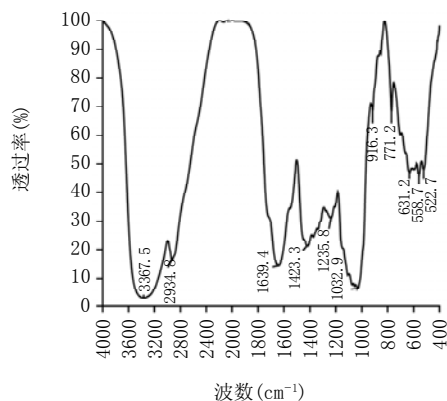


图4 细菌纤维素薄膜的红外图谱

Fig.4 FT-IR of bacterial cellulose

3 结 论

本研究从新疆本地产杏子中分离到一株高产纤维素细菌 ARP72, 以葡萄糖为糖原, 在发酵培养基中, 28℃ 条件下, 三角瓶中静态发酵培养 5d, 纤维素产量可达 9g/L (干重), 且产量稳定。此培养条件下的细菌纤维素产量较国内一般研究报道数值($2\sim 6\text{g/L}$)高。经生化鉴定, 初步确定 ARP72 为醋化醋杆菌。

参考文献:

- [1] 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, 2004.
- [2] 熊强. 细菌纤维素生产菌的筛选及其产物性质研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.
- [3] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯, 等编. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 9版. 北京: 科学出版社, 1994.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [6] 刘俊来. 仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002.