

细菌纤维素研究新进展

杨礼富

(中国热带农业科学院橡胶研究所 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室 儋州 571737)

摘要: 综述细菌纤维素的结构和性质、生物合成和分泌的过程与调控以及影响合成的因素。细菌纤维素的化学构成与天然纤维素相近, 但又有其特殊性。参与纤维素合成的酶有 8 种, 其中纤维素合成酶是合成纤维素的关键酶和特征酶, 环二鸟苷酸系统是研究得比较透彻的纤维素合成调节系统。培养基组成、发酵工艺和设备都会影响细菌纤维素的产量。深入研究细菌纤维素的合成和调节机制有助于揭示植物纤维素的生物合成机理和促进细菌纤维素的大规模商业化应用。

关键词: 细菌纤维素, 合成, 分泌, 应用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0095-04

细菌纤维素是由部分细菌产生的一类高分子化合物, 最早由英国科学家 Brown 在 1886 年发现, 他在静置条件下培养醋杆菌时, 发现培养基的气-液表面形成一层白色的凝胶状薄膜, 经过化学分析, 确定其成分是纤维素。为了与植物来源的纤维素相区别, 将其称之为“微生物纤维素”或“细菌纤维素”。细菌纤维素在物理性质、化学组成和分子结构上与天然(植物)纤维素相近, 均是由 β -1, 4-葡萄糖苷键聚合而成。近些年来, 随着实验手段和技术的不断提高, 人们对细菌纤维素的理化特性、生物合成机制和提高产量的途径等进行了比较深入的研究。

1 细菌纤维素的结构和性质

细菌纤维素与高等植物细胞中的纤维素相比, 具有特殊的结构特性。细菌纤维素由独特的丝状纤维组成, 纤维宽 10 nm, 厚 3 nm ~ 8 nm, 每一丝状纤维由一定数量的微纤维组成, 微纤维的大小与结晶度有关。细菌纤维素的结构随菌株种类和培养条件的不同而有所变化, 搅拌培养时, 纤维素的结晶度、聚合度和 Ia 含量均比静置时的低^[1]。

能产生纤维素的细菌种类较多, 常见的有: 醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、八叠球菌属 (*Sarcina*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、固氮菌属 (*Azotobacter*) 和气杆菌属 (*Aerobacter*)。其中木醋杆菌 (*A. Xylinum*) 是最早发现也是研究较为透彻的纤维素产生菌株, 可以利用多种底物生长, 是目前已知合成纤维素能力最强的微生物菌株, 也是研究纤维素生物合成过程和机制的模式菌株。和天然纤维素相比, 细菌纤维素具有独特的理化性质和机械性能: (1) 具有高结晶度、高聚合度和非常一致的分子取向, 并且以单一纤维形式存在, 纯度极高; (2) 纤维直径在 0.01 μ m ~ 0.1 μ m 之间, 抗拉力强度高, 杨氏模量高达 1.5×10^{10} Pa, 并且纤维素的机械性能与菌株种类、发酵方式和处理方式(加热、加压)关系不大; (3) 有极强的持水性和透水透气性, 能吸收 60 ~ 700 倍于其干重的水分; (4) 具有生物可降解性, 是环境友好产品^[2]。

收稿日期: 2002-06-24, 修回日期: 2002-09-30

2 细菌纤维素的合成和分泌过程

木醋酸菌的纤维素合成过程大致可以分为4个步骤,即:(1)葡萄糖在葡萄糖激酶的作用下转化为6-磷酸-葡萄糖;(2)6-磷酸-葡萄糖在异构酶的作用下转化为1-磷酸-葡萄糖;(3)1-磷酸-葡萄糖在焦磷酸化酶的作用下生成尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG);(4)在细胞膜上,通过纤维素合成酶的催化作用,将UDPG(纤维素的直接前体物质)合成为 β -1,4-葡萄糖苷链,然后再聚合成纤维素。果糖在激酶、磷酸化酶和异构酶等的催化作用下转变为6-磷酸-葡萄糖后同样依照上述步骤参与细菌纤维素的合成^[3]。细菌纤维素的合成速度很快,一个木醋杆菌细胞在1s可以聚合200,000个葡萄糖分子。将纤维素合成酶用毛地黄皂苷溶解,在一定的条件下,数分钟内即可以在体外合成细菌纤维素丛。

细菌纤维素的分泌伴随合成同时进行。木醋杆菌在细胞中合成纤维素后,从细菌细胞壁的微孔道中分泌出与细胞纵轴平行的宽约1nm~2nm的亚小纤维(纤维素的最小构成单元),亚小纤维之间通过氢键连接成直径为3nm~4nm的微纤维,微纤维间相互缠绕,组成网状多孔的纤维丝带,其宽度为40nm~100nm,长度不定,结晶方式与植物中的I型纤维素相同。纤维丝带相互交织,形成网状多孔结构,并在培养基的气液界面形成一层透明的凝胶薄膜^[3]。利用冰冻蚀刻技术进行研究,发现细菌纤维素微纤维在形成的初期存在一个由无定型外壳形成的核,分泌纤维素的微孔呈线形排列,孔径在12nm~15nm,深3.5nm^[4]。据报道,在静置培养下,纤维素单纤维的分泌速率为2 $\mu\text{m}/\text{min}$ 。

3 细菌纤维素生物合成的调控

细菌纤维素的生物合成过程复杂,受多种酶和基因以及其它因素的调节和控制,其中研究较为透彻的是环二鸟苷酸(c-di-GMP)系统。参与细菌纤维素生物合成的酶有8种,其中纤维素合成酶是纤维素合成过程中的特征酶和关键酶,为一细胞膜结合蛋白复合体,至少含4种蛋白,分子量分别为85kD, 85 kD, 141 kD和17 kD,分别由bcsA、bcsB、bcsC和bcsD等4个结构基因所编码^[1],催化UDPG合成纤维素。c-di-GMP是对细菌纤维素的生物合成进行调节的关键因子,它作为纤维素合成酶的变构激活剂,以可逆方式结合到酶的调节位点,使非活性的纤维素合成酶转变为活性形式,如果缺乏c-di-GMP,纤维素合成酶活性很低,甚至不具备催化活性。环二鸟苷酸浓度高低受其合成和降解两条代谢途径双重控制,其中合成受2种环化酶的催化,在PDE-A、PDE-B2种磷酸二酯酶的催化作用下则由于被降解而失活。纤维素合成酶的活性受 Ca^{2+} 和PEG的极大调节, Ca^{2+} 对位于细胞膜上的降解环二鸟苷酸的PDE-A酶的活性起选择性抑制作用^[5]。

许多研究表明,摇瓶培养降低纤维素产量,其中一个重要的原因是由于菌株的遗传不稳定性,使部分菌株突变成非生产性菌株。在产生纤维素的醋杆菌中也发现有引起遗传不稳定性的插入序列的存在。为了调控纤维素的合成,日本的Yoshinaga等发展了一套宿主-载体系统,并构建出一穿梭载体,以便向PBR2001中引入各种基因^[5]。Robertson等对致癌农杆菌中影响纤维素合成的染色体基因的研究发现:Tn 5位点的突变可以导致纤维素的过量合成,紧靠ilv-13的另一个位点的突变同样可以导致纤维素的

过量合成^[6]。

4 影响细菌纤维素生物合成的因素

4.1 培养基配方组成 木醋杆菌在静置条件下进行分批培养时,最佳C源是果糖,最佳N源是蛋白胨+酵母浸膏,不能以无机氮作为唯一氮源。向经过适当稀释的菠萝汁中加入15%的蔗糖和1%的柠檬酸,可以提高纤维素的产量^[7]。研究还发现,玉米浸出液可以大大提高纤维素的产量,将乳酸盐加到牛肉膏和蛋白胨中,也收到同样的效果。Naritomi等(1998)在玉米浸出液-果糖培养基中对菌株BPR3001A进行分批培养时,纤维素产率为0.4g/L/h,连续培养时,纤维素产率为0.62g/L/h。而在以乳酸盐为主要碳源的分批培养中,只有6.9%转化为纤维素,产率仅2.2g/L/h。研究还发现蛋氨酸是提高纤维素产量必需的^[8]。此外,Fontana等人发现咖啡因和黄嘌呤对提高纤维素的产量具有促进作用。

Toyosaki等(1995)筛选出木醋杆菌的一个新亚种BPR2001,向其培养基中加入PABA(对氨基苯甲酸)能提高纤维素产量。该菌株能产生一种AM-2或acetan的水溶性高分子聚合多糖,它可以影响纤维素产量和结构。由BPR2001经过N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍诱变后,获得一株磺胺胍(PABA类似物)抗性突变株BPR3001E,在44g/L的果糖培养基中添加PABA,纤维素的产量达到9.7g/L,比出发菌株的产量高出40%以上^[9]。Tonouchi等向培养BPR2001的发酵罐培养基中添加少量来源于绿色木霉的纤维素复合酶(30mg/L以内),可以提高纤维素的早期产量。利用纯化的外切 β -1,4-葡聚糖酶实验,也得到同样的结果。实验还表明,水溶性的脱乙酰壳多糖能促进纤维素的产生,大于0.01%的荧光增白剂可以使木醋杆菌连续合成 β -1,4-葡聚糖。

4.2 发酵方式和条件 Chao Y P等(1997)研究了搅拌培养条件下气相中CO₂分压对纤维素产量的影响,发现15%~20%的高CO₂分压降低纤维素产量,向培养BPR2001的气升式发酵罐中供应富含O₂的空气,经过28h发酵,纤维素产量即达到5.63g/L,比供应普通空气的纤维素产量(2.3g/L)高出许多^[10]。Watanabe等^[11]研究了在静置培养条件下气相中的O₂分压对纤维素产量和物理特性的影响,在10%~15%的O₂分压下,纤维素的产量比大气条件下高25%左右。研究还发现,纤维素的密度和产量成反比,供应高于大气O₂分压的气体会降低胶膜的厚度、提高纤维强度。微纤维两分支之间的片段长度与纤维素密度和O₂分压也有关,10%的O₂分压下为700 μ m,50%时为200 μ m,后者的密度更大。Kouda等研究了在搅拌条件下O₂和CO₂分压变化对纤维素生成的影响,当发酵液中纤维素积累时,O₂的传递速率和氧传递系数下降,可以通过供给富氧空气或者提升工作压力提高氧气的供给能力,但是伴随工作压力的增加,纤维素产率将下降,提高通气流量可以消除高CO₂分压对纤维素合成的抑制效应^[12,13]。日本的Okiyama等采用二步发酵法进行纤维素的生产工艺研究,先使细胞在气升式发酵罐中培养3d,形成大量的菌体,然后转移到浅盘中进行静置培养^[14]。该工艺可以提高纤维素产量,降低生产成本。

4.3 发酵设备 为了增加静置培养时细菌产纤维素的表面积,Yoshino等^[3]设计出一种特殊的培养体系,即在圆形发酵容器底部套上一层100 μ m厚的透性硅膜片,用巴氏醋杆菌AP-1SK在静置条件下进行实验,结果纤维素在硅膜的内表面和液体表面同时形

成,且细菌纤维素的产量与硅膜表面的粗糙程度关系密切,光滑硅膜上的纤维素产量是粗糙表面的5倍左右,他们还通过改变发酵罐中搅拌器的构型来提高纤维素产量。据报道,具有叶轮的搅拌器适合于纤维素的发酵生产,因为其混合效果好, O_2 传递系数高^[3]。

5 细菌纤维素的应用和展望

细菌纤维素经碱和(或)氧化剂以及热压处理后,杨氏模数高达30 GPa,可用于制造具有高传播速度和高内耗(产生的声音清晰)的声音振动膜,目前已经有一些相关产品投放市场(如日本SONY公司的部分音响制品)。用纯化的细菌纤维素生产人造皮肤,在潮湿条件下具有高的机械强度以及对气体和液体的高渗透性,优于常规皮肤代用品,在巴西已实现商业化;向纸浆中添加微生物纤维素,可以提高纸张的强度和耐用性以及吸附容量,从而生产出高强度纸。在食品工业,细菌纤维素可以作为增稠剂、结合剂、成型剂和分散剂,或者作为纤维食品。细菌纤维素还可以替代棉、麻等纺织原料或者作为医药新材料,如纱布、绷带和药物载体^[1],此外,还可以作为化妆品、高吸水材料和功能性树脂、哺乳动物细胞的培养载体以及生物传感器^[15]。

目前,细菌纤维素的生产都采用浅盘培养,劳动强度大、生产效率低,致使产品价格偏高,大规模应用受到限制。今后,要筛选和构建基因工程菌株,通过改变菌株的遗传结构,将纤维素合成的关键酶基因导入其它可利用便宜底物的菌株中,或者将底物利用基因转入生产菌株中,将植物纤维素基因导入细菌,甚至是将细菌产生纤维素的基因导入光合细菌,直接通过光合作用生产纤维素;可以利用价格低廉、来源广泛的工农业废料和下脚料作为生产原料,同时优化培养条件和发酵工艺,以不断降低成本、提高产量,使细菌纤维素能及早在众多领域得到广泛应用。

参考文献

- [1] Yoshinaga F, Tonouchi N, Watanabe K. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61** (2): 219 ~ 224.
- [2] Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N. *J Materials Sci*, 1989, **24**: 3141 ~ 3145.
- [3] Yoshino T, Asakura T, Toda K. *J Fer Bioeng*, 1996, **81** (1): 32 ~ 36.
- [4] Zaar K. *J C Bio*, 1979, **80**: 773 ~ 777.
- [5] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, *et al.* *Nature*, 1987, **325**: 279 ~ 281.
- [6] Robertson J L, Holliday T, Matthyse A G. *J Bac*, 1988, **170** (3): 1408 ~ 1411.
- [7] Jen T Y, Ping Y L, Che W M, *et al.* *Proceedings of a symposium on enhancing competitiveness of fruit industry*. 1997, **38**: 257 ~ 273.
- [8] Naritomi T, Kouda T, Yano H, *et al.* *J Fer Bioeng*, 1998, **85** (1): 89 ~ 95.
- [9] Ishikawa T, Matsuoka M, Tauchida T, *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59** (12): 2259 ~ 2262.
- [10] Chao Y P, Sugano Y, Kouda T, *et al.* *Biotech ~ Tech*, 1997, **11** (11): 829 ~ 832.
- [11] Watanabe K, Yamanaka S. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59** (1): 65 ~ 68.
- [12] Kouda T, Naritomi T, Yano H, *et al.* *J Fer Bioeng*, 1998, **85** (3): 318 ~ 321.
- [13] Kouda T, Naritomi T, Yano H, *et al.* *J Fer Bioeng*, 1997, **84** (2): 124 ~ 127.
- [14] Okiyama A, Shirae H, Kano H, *et al.* *Food-hydrocolloids*, 1992, **6** (5): 471 ~ 477.
- [15] Eisele S, Ammon H, Kindervater R, *et al.* *Biosensor Bioelectronics*, 1994, **9** (2): 119 ~ 124.