

# N<sup>+</sup>离子束辐照诱变选育细菌纤维素高产菌株

张雯, 李成涛, 李彦军, 刘东文

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

**摘要:** 为获得细菌纤维素(Bacterial cellulose, BC)高产菌株, 同时改善BC材料学性能, 采用低能N<sup>+</sup>离子束辐照技术对木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)进行了诱变选育。将菌落大小、光滑度、致密度、润湿度以及BC膜形成速率、柔韧度、BC产量等作为筛选依据, 建立了平板-96孔板-试管筛选体系, 筛选得到2株BC产量提高且产物材料学性能改良的目标菌株5D、2D。菌株5D BC产量为4.84 g/L, 比出发菌株BC产量提高了89.06%, 菌株2D BC产量为4.53 g/L, 比出发菌株BC产量提高了76.95%。利用FT-IR、XRD、SEM、拉力试验等方法对目标菌株产物性能进行了研究, 结果表明, 目标菌株5D、2D发酵BC均具有高于出发菌株发酵BC的结晶度、抗拉强度及较小的断裂伸长率, 具有更为致密的层状结构以及清晰的纤维束三维网状结构, 表明其具有较为优良的力学性能。目标菌株的获得对BC产量的提高和性能改良奠定了基础。

**关键词:** N<sup>+</sup>离子束辐照; 诱变选育; 木醋杆菌; 细菌纤维素

文章编号: 1673-9078(2015)5-144-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.023

## Mutation Screening to Detect Strains that Produce Bacterial Cellulose at High Yield by N<sup>+</sup> Ion Beam Irradiation

ZHANG Wen, LI CHENG-tao, LI Yan-jun, LIU DONG-wen

(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** In order to obtain strains that produce a high yield of bacterial cellulose (BC) and improve the properties of BC, N<sup>+</sup> ion beam irradiation was used to conduct mutation screening in *Acetobacter xylinum*. A plate-96-well plate-cuvette screening system was established, in which parameters such as the size, smoothness, density, wettability and rate of the colony formation, pliability, and yield of the BC film were chosen as the screening criteria. Two target strains, 5D and 2D, were obtained that could produce BC with improved product properties at an enhanced yield. The BC yields of 5D (4.84 g/L) and 2D (4.53 g/L) were 89.06% and 76.95% higher than that of the original strain, respectively. Fourier transform-infrared spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, and a tensile test were used to study the properties of BC. The results showed that the BC produced by the target strains had higher crystallinity and tensile strength, a smaller elongation at break, a denser layered structure, and a clearer three-dimensional network structure compared with the product from the original strain, indicating that they had superior mechanical properties. The success in obtaining the target strains lays a foundation for improving the BC yield and properties.

**Key words:** N<sup>+</sup> ion beam irradiation; mutation screening; *Acetobacter xylinum*; bacterial cellulose

细菌纤维素(Bacterial cellulose, 简称BC)是由生长在液态含糖基质中的革兰氏阴性菌产生的纤维素成分。与植物纤维素相比, BC不含半纤维素和木质素, 具有高持水率(大于90%)、高分子量以及较高的结晶度。目前, BC作为一种新型功能材料受到了科学界的广泛关注, 如今已成功地应用于食品、生物医学、造纸、声学器材、化妆品、膜滤器等多个领域<sup>[1-2]</sup>的高附加值产品上。但由于细菌纤维素产量较低, 而造成

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金项目(2012JM2005); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2012-14); 2012年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210708030)

作者简介: 张雯(1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物制药

生产成本较高, 成为了其工业化生产和推广应用的瓶颈。目前关于BC的研究多集中于发酵工艺的优化以及产品的材料学性能的改善方面。

离子束辐照诱变育种利用离子注入机将低能重离子(简称低能离子, 能量在10~100 keV之间, 主要有N、C、Ag、Ar等)注入生物体内, 引起生物体诱变<sup>[3-4]</sup>。与传统的辐射法及化学诱变剂相比, 具有损伤轻、突变率高、突变谱宽、遗传稳定、具有一定的重复性和方向性、易于获得理想菌株等特点, 而且技术稳定可靠, 简便易行<sup>[5-6]</sup>。离子注入除了引起DNA链断裂外, 还由于质量、能量、电荷的三因子协同引起大量受体原子移位、重组, 形成新的分子结构和基因, 产生丰富的基因突变, 是菌种选育理想的方法。近年来离子

束诱变技术在生物诱变育种、植物转基因、生命起源和进化以及环境辐射与人类健康等方面的研究上取得了一些重要的阶段性成果,并取得了可观的经济效益<sup>[7]</sup>。本研究利用低能N<sup>+</sup>离子束辐照技术对木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)进行诱变选育。建立筛选体系,选育高产且产物性能改良的BC生产菌株,从菌种方面为BC产量的提高和性能改良奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

菌种,木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*); 固体培养基<sup>[8]</sup>,蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 4.40 g、柠檬酸 0.80 g、琼脂 18.00 g、乙醇 10 mL、自来水 1000 mL、pH 6.0; 种子培养基<sup>[8]</sup>,蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 4.40 g、柠檬酸 0.80 g、乙醇 10 mL、自来水 1000 mL、pH 6.0; 发酵培养基<sup>[8]</sup>,蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 4.40 g、柠檬酸 0.80 g、乙醇 10 mL、pH 6.0。其余试剂均采用国产分析纯或生化试剂。

### 1.2 仪器与设备

生物改性离子注入设备,成都同创材料表面新技术工程中心; MG250B恒温培养箱、HYG-1A恒温振荡器,上海新瑞仪器有限公司; XPS-8CA光学显微镜,上海光学仪器有限公司; Dragon-lab移液枪,北京大龙; S-4800电镜扫描仪,日本日立公司; D/max2200PC全自动X-射线衍射仪,日本Rigaku; VERTEX 70傅立叶变换红外光谱仪,德国Bruker公司; TY8000拉伸试验机,上海力晶科学仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 测定分析方法

##### 1.3.1.1 N<sup>+</sup>离子束辐照菌体细胞<sup>[3,4]</sup>

离子注入前,离子注入机开机预热2 h,用紫外线对靶室持续消毒30 min,调节靶室真空度为10<sup>-3</sup> Pa,注入物质N<sup>+</sup>离子提前加速到15 keV。收集木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)菌体细胞<sup>[8]</sup>,取0.1 mL菌悬液均匀涂布于Φ 9 cm平皿,无菌风干,将平皿置于离子注入机真空靶室,进行离子注入。注入后的菌膜加入5 mL种子培养基,30 ℃静置温育2 h,混匀,收集至EP管中。对照菌株置于靶室真空中,不经离子注入。

##### 1.3.1.2 培养方法<sup>[8]</sup>

固体培养基平板培养,30 ℃静置培养2~3 d; 液体种子培养,30 ℃静置培养1 d,160 r/min 震荡 30 min

释放菌体细胞得菌悬液; BC 发酵,15 mL 发酵培养基置于Φ 2×18 cm 试管中,接种量 20%,30 ℃静置培养 10 d。

##### 1.3.1.3 BC 膜处理<sup>[1]</sup>

将发酵所得 BC 膜浸泡于 0.10 mol/L NaOH 溶液中,80 ℃浸泡 30 min,继续加热煮沸约 2 小时,再用蒸馏水反复冲洗,至 pH 为 7.0,得 BC 湿膜,冷冻干燥得 BC 干膜。

##### 1.3.1.4 BC 膜持水率、复水率及产量测定<sup>[1]</sup>

称重法。

$$\text{持水率}(\%) = \frac{M_w - M_d}{M_w} \times 100$$

$$\text{复水率} = \frac{M_{wr} - M_d}{M_w - M_d} \times 100$$

式中, M<sub>w</sub>代表湿膜的质量; M<sub>d</sub>代表干膜的质量; M<sub>wr</sub>代表复水膜的质量。

##### 1.3.1.5 BC 鉴定及基团分析<sup>[9-10]</sup>

红外光谱(样品处理:取适量BC干膜放入红外光谱仪中进行测定,450 mW,扫描范围400~4000 cm<sup>-1</sup>,设定分辨率4 cm<sup>-1</sup>,扫描速度为0.2 cm/s,室温下操作)。

##### 1.3.1.6 BC膜结晶度<sup>[1]</sup>

X-射线衍射光谱(样品处理:BC干膜平整固定在样品架上,铜靶,测试电压40 kV,测试电流100 mA,速率5 %/min,步宽0.02°,2θ为0~80°范围扫描。根据X衍射参数,由下面两个计算公式分别计算细菌纤维素的结晶度(X<sub>c</sub>)和晶体的粒径L)。

$$X_c(\%) = \frac{I - I_{am}}{I} \times 100$$

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

注:式中,I代表衍射峰的衍射强度; I<sub>am</sub>代表无定形区衍射强度; β代表半峰宽(rad); k代表常数,通常取0.89; λ代表X射线波长(0.15406 nm); θ代表布拉格衍射角。

##### 1.3.1.7 BC 膜机械性能<sup>[2]</sup>

拉伸试验:(BC湿膜平铺于离型纸上,制样器制成标距 50 mm,宽度 10 mm 的标准样,测试厚度,固定于拉力机上进行拉伸强度测试。测试速度:100.000 mm/min)。

##### 1.3.1.8 BC膜表面形貌<sup>[1]</sup>

SEM(样品处理:处理后的BC干膜置于液氮中,脆断处理,分别取断面及水平面制样,喷金镀膜后利用扫描电子显微镜观察其微观结构,电压25 kV)。

### 1.3.2 存活率曲线的绘制

对木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)进行活化培养,收集菌体细胞<sup>[8]</sup>,按照1.3.1.1所述方法对细胞进行N<sup>+</sup>离子

束注入诱变处理,共制备样品45个,注入剂量分别为: $6 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $11.5 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $16 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $21 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $26 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $32 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $37 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $41 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $47 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $50 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $55 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $60 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $67 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ 、 $70 \times 10^{14}$   $N^+/cm^2$ ,每个剂量三个平行。注入后的菌体细胞经适当稀释后涂固体培养基平板,利用平板计数法计算各个剂量下的细胞存活率,绘制 $N^+$ 离子束注入存活率曲线。

### 1.3.3 突变菌株的筛选

平板初筛:诱变后的菌株涂布培养基平板培养,挑取95株菌落较大(编号1A-1H~12A-12G,12H为出发菌株),且菌落光滑度、致密度、润湿度等外观特征发生明显变化的菌株至装有300  $\mu$ L发酵培养基的96孔板中发酵培养。

96孔板复筛:观察96孔中BC膜的生成情况,选择50株成膜速度快、膜较厚且膜致密度、光滑度明显变化的菌株接入试管中发酵BC。

试管复筛:通过测定50株突变菌株生产BC膜产量,筛选高产突变菌株,接固体斜面培养基培养,4  $^{\circ}$ C保藏备用。

### 1.3.4 目标菌株遗传稳定性能研究

将试管复筛所得目标菌株连续传代培养3代,传代后制备种子液,发酵生产BC。测定BC产量,研究目标菌株的遗传稳定性。

### 1.3.5 目标菌株产物性能研究

利用目标菌株发酵生产BC,测定其基团结构、持水率、复水率、结晶度、机械性能以及表面形貌,研究目标菌株发酵生产BC的材料学性能。

### 1.3.6 数据分析

所有数据均采用三次平行试验的平均值表示,利用SPSS(PASW Statistics 18)软件对数据进行处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 存活率曲线

$N^+$ 离子束辐照木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)存活率曲线如图1所示。结果表明,不同剂量的 $N^+$ 离子注入时,细胞存活率曲线整体呈现先快速下降后略微平缓上升再下降的“马鞍型”变化: $N^+$ 注入剂量小于 $21 \times 10^{14}$   $ions/cm^2$ 时,菌体细胞存活率随着注入剂量的增大而急速下降至3.12%以下;而后随着注入剂量的增大,存活率又呈现缓慢上升趋势,在剂量为 $32 \times 10^{14}$   $ions/cm^2$ 处达到峰值,此时菌体细胞的存活率为15.60%;之后随着注入剂量的增大,菌体细胞存活率下降,当剂量达到

$67 \times 10^{14}$   $ions/cm^2$ 时菌体细胞存活率降至5%以下。低能离子辐照具有能量沉积、质量沉积和电荷交换三方面的效应<sup>[12]</sup>,随着辐照剂量增加,细胞存活率变化所呈现上述三个阶段的原因分别为:第一阶段,低剂量的等离子体使生物大分子逐步获得能量进而发生键断裂、原子被击出位、导致DNA和生物膜等生物大分子断键或缺陷,从而造成细胞存活率迅速下降;第二阶段,随着等离子体注入时间延长,注入剂量增多,在等离子体中,带电粒子之间的库仑力是长程力,库仑力的作用效果远远超过带电粒子可能发生的局部短程碰撞效果,等离子体中的带电粒子运动时,能引起正电荷或负电荷局部集中,产生电场,这样就导致在被注入细胞上形成暂时的“保护屏障”,阻碍后续等离子体的注入,起到暂时保护作用,使细胞存活率有所回升;第三阶段,随着注入时间的延长,注入剂量进一步增加,能量不断蓄积,大量堆积的电荷达到一定的临界值会产生库仑爆炸,形成的暂时的“保护屏障”不复存在,质量沉积导致注入的等离子体与生物大分子形成新的分子,动量传递在分子中产生级联损伤,电荷交换引起生物分子电子转移造成损伤,从而使生物体产生死亡、自由基间接损伤、染色体重复、易位、倒位或使DNA分子断裂、碱基缺失等多种生物学效应。随着注入时间的进一步延长,菌体大量死亡,致死率不断升高<sup>[4]</sup>。通常,在细胞存活率曲线中的“波峰”和“波谷”处,生物细胞正突变出现的几率较高<sup>[13]</sup>,考虑到保证诱变效果前提下应尽可能保持较高存活率,选择 $32 \times 10^{14}$   $ions/cm^2$ 剂量辐照诱变的细胞样品进行目标菌株的筛选。

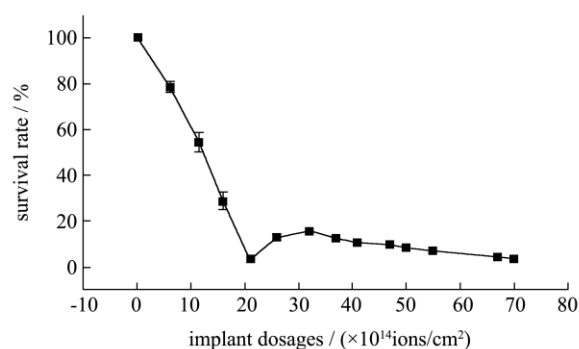


图1 诱变存活率曲线

Fig.1 Survival curve of mutants

### 2.2 突变菌株的筛选

木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)代谢过程中,随着菌体细胞的繁殖,BC随之产生,且往往缠绕着细胞共同增殖<sup>[14]</sup>,因此菌落大小、形态均可直接反应BC合成情况,本研究建立平板-96孔板-试管筛选体系对BC高产

突变菌株进行筛选, 筛选过程中, 将菌落大小、光滑度、致密度、润湿度以及BC膜形成速率、柔韧度等外观特性作为初筛依据, BC膜产量作为复筛依据进行目标菌株的筛选。该筛选体系不仅可筛选到BC高产菌株, 同时可获得所生产BC性能改善的突变菌株。筛选结果如图2及表1所示。按照1.3.3所述方法筛选到2株成膜速度快、产膜厚且膜致密、光滑的目标菌株, 编号2D、5D。其中菌株2D发酵生产BC产量为4.53 g/L, 比出发菌株12H发酵BC产量提高了76.95%, 菌株5D发酵生产BC产量为4.84 g/L, 比出发菌株12H发酵BC产量提高了89.06%。且发酵产生的BC膜均表现出更为致密、坚硬、柔韧度相对较小的特性。

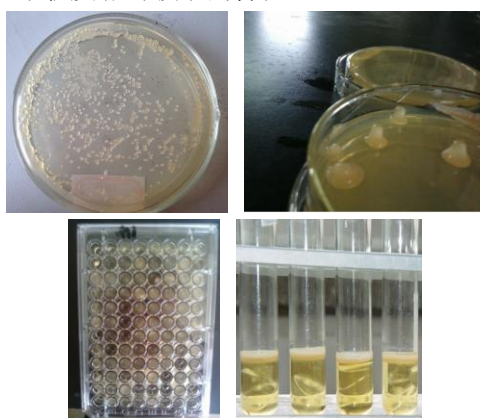


图2 突变菌株平板(a, b)-96孔板(c)-试管筛选(d)

Fig.2 Mutation screening using a plate (a,b)-96-well plate-(c)-cuvette(d) system

表1 诱变后突变菌株的BC产量

Table 1 BC yields of the strains after inducing mutations

菌株	BC 产量/(g/L)	菌株	BC 产量/(g/L)
12H	2.56±0.07	6C	1.52±0.11
1G	2.11±0.06	6D	2.10±0.08
1B	1.62±0.10	6E	3.95±0.04
1D	1.44±0.05	6F	1.44±0.09
1E	2.60±0.11	6G	2.42±0.12
2B	2.14±0.05	7A	2.84±0.08
2C	2.67±0.03	7B	2.46±0.03
2D	4.53±0.04	7H	3.91±0.05
2E	2.88±0.03	8B	2.93±0.10
2G	1.80±0.11	8D	1.92±0.04
3A	2.75±0.10	8E	1.94±0.12
3D	3.74±0.08	8F	2.57±0.16
3E	2.24±0.15	8G	1.88±0.08
3G	3.51±0.09	9A	3.46±0.04
3H	1.40±0.01	9B	2.32±0.11
4A	1.87±0.02	9H	3.97±0.04
4B	2.69±0.17	10A	2.45±0.08

4E	3.18±0.05	10B	2.65±0.05
4F	1.77±0.04	10C	1.47±0.01
5A	3.90±0.10	10G	2.24±0.03
5C	2.54±0.07	11C	2.68±0.13
5D	4.84±0.04	11D	3.85±0.07
5E	3.15±0.09	11E	2.81±0.06
5F	2.43±0.12	11F	1.80±0.02
5G	3.98±0.07	11G	3.51±0.07
6A	3.31±0.04		

### 2.3 目标菌株遗传稳定性能

对目标菌株2D、5D进行连续传代, 其遗传稳定性研究结果如表2所示。连续传代三次, 其发酵生产BC能力较为稳定, 两株目标菌株均表现出良好的遗传稳定性。

表2 目标菌株遗传稳定性试验结果

Table 2 Genetic stability test of the target strains

菌株	第一代 BC 产量/(g/L)	第二代 BC 产量/(g/L)	第三代 BC 产量/(g/L)
2D	4.53±0.02	4.43±0.14	4.55±0.08
5D	4.84±0.07	4.91±0.02	4.76±0.11

### 2.4 目标菌株发酵产物性能研究

目标菌株2D、5D发酵生产BC (BC-2D、BC-5D) 与出发菌株发酵BC (BC-12H) 红外图谱如图3所示。吸收峰3285 cm<sup>-1</sup>、1154 cm<sup>-1</sup>、1077 cm<sup>-1</sup>、1040 cm<sup>-1</sup>证实了样品中大量-OH的存在; 吸收峰2925 cm<sup>-1</sup>、1383 cm<sup>-1</sup>、1313 cm<sup>-1</sup>、667 cm<sup>-1</sup>、645 cm<sup>-1</sup>证实了-CH<sub>2</sub>-、>CH-和C-H的存在; 吸收峰1241 cm<sup>-1</sup>证实了环C-O-C的存在; 吸收峰1241 cm<sup>-1</sup>、1033 cm<sup>-1</sup>证实了直链C-O-C的存在。以上结果显示为细菌纤维素葡聚糖的特征吸收, 可以推断出目标菌株发酵产物主要成分为BC<sup>[9-10]</sup>。

目标菌株2D、5D发酵生产BC (BC-2D、BC-5D) 与出发菌株发酵BC (BC-12H) XRD图谱如图4所示。由图可知, BC-2D、BC-5D和BC-12H的X-射线图谱大致相同, 且在相同位置处均含有主要衍射峰, 分别在14.98°、17.68°和22.92°附近存在三个衍射峰, 此三个峰分别对应纤维素晶体的<101>、<101>和<002>晶面, 据此可知BC-2D、BC-5D以及BC-12H均为I型纤维素<sup>[11]</sup>。

目标菌株2D、5D发酵生产BC (BC-2D、BC-5D) 与出发菌株发酵BC (BC-12H) 应变曲线如图5所示。由图可知, BC-5D、BC-2D抗拉强度分别为38.86MPa、45.52 MPa, 均高于BC-12H的抗拉强度27.75MPa, BC-5D、BC-2D断裂伸长率分别为5.05%、4.42%, 低

于BC-12H的断裂伸长率6.31%，表明两株目标菌株发酵生产BC机械强度高于出发菌株发酵生产BC，而其韧性相对较小<sup>[2]</sup>。

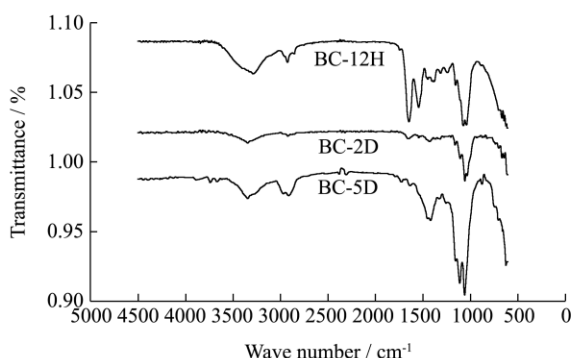


图3 出发菌株发酵BC (BC-12H)与目标菌株发酵BC (BC-5D、BC-2D)红外图谱

Fig.3 Fourier transform-infrared spectra of the bacterial cellulose produced by the original strain (BC-12H) and the target strains (BC-5D, BC-2D)

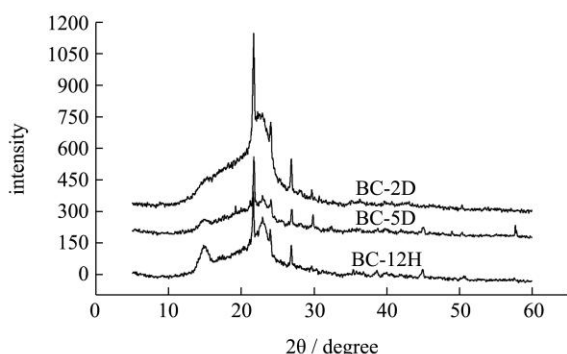


图4 出发菌株发酵BC (BC-12H)与目标菌株发酵BC (BC-5D、BC-2D)XRD图谱

Fig.4 X-ray diffraction patterns of the bacterial cellulose produced by the original strain (BC-12H) and target strains (BC-5D, BC-2D)

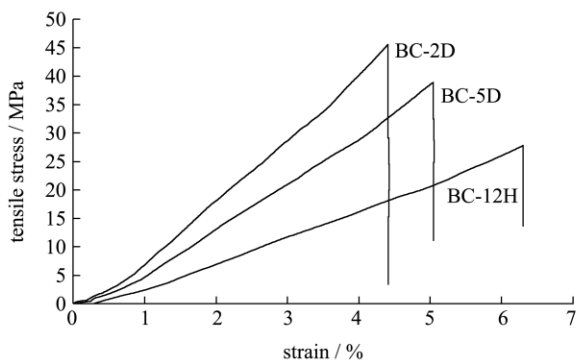


图5 出发菌株发酵BC (BC-12H)与目标菌株发酵BC (BC-5D、BC-2D)应变曲线

Fig.5 Stress-strain curves of the bacterial cellulose produced by the original strain (BC-12H) and the target strains (BC-5D, BC-2D)

表3 出发菌株发酵BC (BC-12H)与目标菌株发酵BC (BC-5D、BC-2D)物理性质

Table 3 Physical properties of the bacterial cellulose produced by the original strain (BC-12H) and the target strains (BC-5D, BC-2D)

物理性质	BC-12H	BC-5D	BC-2D
持水率/%	96.67±1.57	93.45±2.54	90.24±3.01
复水率/%	74.10±1.02	76.58±1.18	75.42±2.24
结晶度 X <sub>c</sub> /%	23.73	28.96	32.78
抗拉强度/MPa	27.75±0.35	38.85±0.88	45.51±1.24
断裂伸长率/%	6.31±0.05	5.05±0.16	4.42±0.09

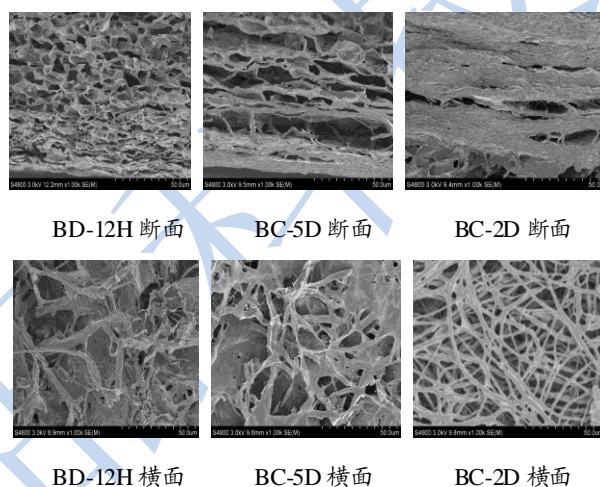


图6 出发菌株发酵BC (BC-12H)与目标菌株发酵BC (BC-5D、BC-2D)SEM图谱

Fig.6 Scanning electron microscope images of the bacterial cellulose produced by the original strain (BC-12H) and target strains (BC-5D, BC-2D)

由表3可知, BC-2D、BC-5D结晶度分别为32.78%、28.96%, 相对于出发菌株所生产BC-12H结晶度23.73%均有所提高。结晶度与纤维的抗拉强度、断裂伸长率、吸湿性、润胀度、柔软性等性质有一定关系, 结合三种样品的其他物理参数, BC-2D、BC-5D具有高于BC-12H的结晶度, 同时表现出较高的抗拉强度及较小的断裂伸长率, 而两种样品的持水率相对低于BC-12H, 复水率差别不大, 各个参数的不同表明了样品性能的区别, 与筛选过程中BC的外观特性是一致的。

目标菌株2D、5D发酵生产BC (BC-2D、BC-5D)与出发菌株发酵BC (BC-12H)扫描电镜图谱如图6所示。由图可知, BC-2D、BC-5D、BC-12H均由高密度纳米级微纤维相互缠绕形成, 具有BC所特有的三维网状层状结构<sup>[1]</sup>。SEM横面和断面图谱显示BC-2D、BC-5D相对于BC-12H具有更为致密的层状结构以及清晰的纤维束三维网状结构, 这种物理结构的变化导致了其较高的力学强度、结晶度及相对较小的韧性、持

水性。同时表现出BC膜的致密、坚硬。与前述分析结果一致。

### 3 结论

本研究以BC高量及材料学改性为目标,建立了平板-96孔板-试管筛选体系。利用该体系筛选得到2株目标菌株-2D、5D。菌株5D发酵生产BC产量为4.84 g/L,与出发菌株12H发酵BC产量相比,提高了89.06%。菌株2D发酵生产BC产量为4.53 g/L,比出发菌株12H发酵BC产量提高了76.95%,两株菌株发酵生产BC产量与文献报道及实际生产相比有较大幅度提高<sup>[4]</sup>。两株菌株发酵生产BC性能研究结果表明,目标菌株2D、5D发酵产物为BC,具有高于出发菌株发酵产物BC的结晶度、抗拉强度及较小的断裂伸长率和相对较低的持水率,具有更为致密的层状结构以及清晰的纤维束三维网状结构,以上BC材料学性能的改善能够扩大BC的应用领域及范围,如组织工程支架、造纸、钻井、增稠等。本研究筛选两株目标菌株具有BC高产及生产优良材料学性能BC的能力。同时本研究为BC的材料学改性提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] C Zhijiang, Y Guang. Bacterial cellulose/collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, 120(5), 2938-2944
- [2] Sybele Saska, Lucas Novaes Teixeir, Paulo Tambasco de Oliveira, et al. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22 (41): 22102-22112
- [3] 周国丽. 离子束诱变技术研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2009, (19): 342-343  
ZHOU Guo-li. Research progress on the ion beam mutation technique [J]. *Anhui Agriculture*, 2009, (19): 342-343
- [4] 张桂才,贾士儒,闫林,等. 等离子体注入诱变选育细菌纤维素高产菌株 [J]. *现代食品科技*, 2010, 26(12): 1354-1357  
ZHANG Gui-cai, JIA Shi-ru, YAN Lin, et al. Mutation screening of a high bacterial cellulose-producing strain by plasma ion implantation [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(12): 1354-1357
- [5] 庞敏,姚建铭. 低能N<sup>+</sup>注入产色氨酸酶大肠杆菌的育种研究 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, 27(3): 167-172  
PANG Min, YAO Jian-ming. Breeding of tryptophanase-producing *Escherichia coli* by use of N<sup>+</sup> ion beam implantation [J]. *J. Radiat. Res. Radiat. Process.*, 2009, 27(3): 167-172
- [6] 聂云,厉炯慧,吕平. 阿特拉津降解菌低能离子注入选育和降解特性 [J]. *水处理技术*, 2010, 36(6): 61-64  
NIE Yun, LI Jion-ghui, LV Ping. Study on atrazine degrading bacteria at low temperature obtained by low-energy ion beam irradiation and the biodegradation characteristic of atrazine [J]. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(6): 61-64
- [7] 张宁,蒋剑春. 氮离子注入纤维素酶产生菌的诱变效应研究 [J]. *应用基础与工程科学学报*, 2011, 19(6): 900-905  
ZHANG Ning, JIANG Jian-chun. Mutagenic effects of cellulase-producing strain by N<sup>+</sup> implantation [J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2011, 19(6): 900-905
- [8] 张雯,齐香君. 细菌纤维素生产菌株菌体细胞收集方法的研究 [J]. *食品工业科技*, 2006, 27(9): 57-58  
QI Xiang-jun, ZHANG Wen. Studies on the method of collecting the cells Producing Bacterial Cellulose [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(9): 57-58
- [9] 张丽平,卢红梅,彭湘屏,等. 淋浇发酵法生产细菌纤维素的结构与性质研究 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(22): 197-201  
ZHANG Li-ping, LU Hong-mei, PENG Xiang-ping, et al. Study on structure and properties of bacterial cellulose produced by trickling fermentation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(22): 197-201
- [10] RAJALAXMI D, MARCUS F, ARTHUR J R. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91(2): 638-645
- [11] S Saska, H S Barud, A M M. Gaspar, et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration [J]. *Int J Biomater*, 2011, 1(27): 175362-175371
- [12] 邵春林,余增亮. 离子束辐照下微生物、植物组织存活模型的研究 [J]. *核技术*, 1997, 20(7): 423-430  
SHAO Chun-lin, YU Zeng-liang. Studies on survival model for organism of plants and microbes irradiated by low energy ions [J]. *NUCLEAR TECHNOLOGY*, 1997, 20(7): 423-430
- [13] Feng H Y, Yu Z L, Chu P K. Ion implantation of organisms [J]. *Materials Science and Engineering R*, 2006, 54(3): 49-120
- [14] Bin Wei, Guang Yang, Feng Hong. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(1): 533-538