文章编号：1000-5773(2011)01-0079-010

细菌纤维素菌株超高压诱变选育及其发酵培养基的优化*

杜双奎，李志西，毋锐琴，杨甲平

（西北农林科技大学食品科学与工程学院，陕西杨凌 712100）

摘要：为了获得高产细菌纤维素菌株，对初选的细菌纤维素菌株 J_2 进行超高压诱变，运用 Plackett-Burman 设计对影响高压诱变菌株生产细菌纤维素的因素效应进行评价，采用 Box-Behnken 试验优化发酵培养基组成。试验结果表明，超高压诱变压力、时间对细菌纤维素菌株有显著或极显著影响。细菌纤维素菌株高压诱变条件为压力 250 MPa、时间 15 min、温度 25 ℃。经超高压诱变，获得产纤维素能力高、遗传稳定性好的诱变菌株 M_{438}。影响诱变菌株 M_{438} 发酵生产细菌纤维素的关键因子是酵母浸出汁、$MgSO_4$ 和无水乙醇。优化的发酵培养基为碳源 5%（葡萄糖∶蔗糖为 4∶1）、酵母浸出汁 1.25%、$CaCl_2$ 0.15%、$ZnSO_4$ 0.20%、K_2HPO_4 0.20%、$MgSO_4$ 0.93%、富马酸 0.30%、无水乙醇 0.50%。利用此培养基培养诱变细菌纤维素菌株 M_{438}，其纤维素产量是优化前的 1.84 倍，是超高压诱变之前的 2.69 倍。超高压技术用于细菌纤维素菌株的诱变育种是可行的。发酵培养基的优化可显著提高菌株 M_{438} 发酵生产细菌纤维素的能力。

关键词：细菌纤维素菌株；超高压诱变；发酵培养基；发酵

中图分类号：O521.9；TQ920.6 **文献标识码**：A

1 引 言

自然界中的纤维素绝大部分由植物合成，少数微生物也能合成纤维素。与一般的植物纤维素相比，细菌纤维素（Bacterial Cellulose，BC）具有结晶度高、聚合度好、分子取向好、吸水性强和机械性能优良等优点[1-2]。作为一种新型的微生物合成材料，细菌纤维素已经应用于食品、造纸、医药等多个领域[3-8]。然而，细菌纤维素产量低，生产成本高，远不能满足实际需求，寻求稳定、高产的细菌纤维素菌株是势在必行的。目前，人工诱变是获得高产菌株的有效途径。多年来，物理和化学诱变一直是工业微生物育种行之有效的方法。其中物理诱变因其简单实用、效果明显而得到广泛应用。近年来，随着高压理论和技术的发展，高压生物学的研究已经深入到生物学的多个领域，高压诱变技术在微生物育种方面有了新的进展[9-14]。高翔等用 220 MPa 高压处理大肠杆菌 TG1、DH5α 和 HB101，得到了耐压的突变菌株 TG1P、DH5αP 和 HB101P，它们在 220 MPa 高压力下的存活率提高了 2～3 个数量级[10]。Silva 等首次观察到在高压下发生亚基解离和聚合而失活的病毒（VSV）仍保持高免疫原性[11]。王岁楼等利用紫外线和 150 MPa 压力诱变漆酶产生菌灵芝（*G. lucidum Karst*），发现超高压对菌丝形态和发酵特性有大幅度诱变作用[12-13]。王华等研究发现，高压对米曲霉的存活率、形态特征、蛋白酶及淀粉酶活性有明显

* **收稿日期**：2009-11-24；**修回日期**：2010-03-26

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助（QN2009072）

作者简介：杜双奎（1972—），男，博士，副教授，主要从事农副产品综合利用与发酵研究. E-mail：dushuangkui@nwsuaf.edu.cn

通讯作者：李志西（1958—），男，博士，教授，主要从事谷物功能食品及发酵技术创新研究. E-mail：lzx580721@yahoo.com.cn

的影响;高压处理后获得一株生长速度快、孢子数量多、蛋白酶活力高的理想变异菌株 HP300a,其成曲的主要指标均优于对照株[14]。但将超高压技术应用于细菌纤维素菌株的诱变尚未见报道。

为了获得高产、稳定的细菌纤维素菌株,提高细菌纤维素产量,本研究在前期研究的基础上[15-16],利用超高压技术对筛选出的细菌纤维素菌株 J_2 进行诱变处理,运用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计[17-18],对影响高压诱变菌株发酵生产细菌纤维素的关键因子进行筛选,并对其发酵培养基组成进行优化,建立优化预测模型,以期为细菌纤维素菌株的诱变研究提供理论指导和技术支持。

2 材料与方法

2.1 材料

菌株 J_2:由荞麦醋中分离,实验室保藏。所用试剂为分析纯级。

2.2 主要仪器设备

UHPF-750 MPa 超高压食品处理装置:包头科发新型高技术食品机械有限公司生产。真空封口机:广东宇杰包装机械设备有限公司生产。XSP-2 光学显微镜:上海浦东物理光学仪器厂生产。

2.3 培养基

斜面培养基:葡萄糖 2%,酵母膏 0.5%,K_2HPO_4 0.1%,$MgSO_4$ 1%,无水乙醇 2%,琼脂 1.7%,pH 值为 7.0。

基础种子培养基:葡萄糖 2%,酵母膏 0.5%,K_2HPO_4 0.1%,$MgSO_4$ 1%,无水乙醇 2%,pH 值为 7.0。

发酵培养基:同种子培养基。

2.4 方法

2.4.1 超高压处理菌悬液的制备

取液体培养 24 h 的 J_2 菌株培养液,用灭菌的液体培养基稀释菌液,调整菌体浓度为10^7 个/毫升左右,制成菌悬液,以备超高压诱变处理。

2.4.2 超高压诱变处理

(1) 处理时间对菌株诱变的影响试验

取 7 份 15 mL 制备好的菌悬液,在无菌条件下装入铝箔聚丙烯袋中,封口。在温度 25 ℃、压力 200 MPa条件下,分别处理 0、5、10、15、20、25、30 min。将处理后的菌液用无菌生理盐水稀释,选取 10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 3 种稀释度的菌液各 0.1 mL 涂布平板,30 ℃恒温培养 3～5 d,计菌落数,以处理时间为横坐标,致死率为纵坐标,绘制处理时间-致死率曲线。

(2) 处理压力对菌株诱变的影响试验

菌悬液的制备方法及菌株的培养方法同(1)。高压处理条件为温度 25 ℃、处理时间 15 min,压力设计 0、50、150、200、250、300 MPa 六个水平。

(3) 高压诱变处理条件的确定

固定处理温度为 25 ℃,处理压力为 150、200、250 MPa,处理时间为 10、15、20 min,设计两因素三水平全面试验,考察处理压力和处理时间对菌株 J_2 致死率的影响,以确定高压诱变条件。

2.4.3 细菌纤维素高产诱变株的初筛与复筛

从培养 3～5 d 的平板培养基上随机挑取诱变菌株 50 个,分别转接到斜面培养基中活化,随后接种到液体发酵培养基中进行发酵培养,30 ℃恒温培养 7 d,测定各诱变菌株的细菌纤维素产量,选取纤维素产量显著高产于原始菌株 J_2 的诱变菌株做传代培养,连续培养 5 代,测定诱变菌株细菌纤维产量,观察传代过程中诱变菌株生产细菌纤维素的能力。

2.4.4 细菌纤维素膜处理与产量测定

取出培养好的细菌纤维素凝胶膜,用自来水冲洗多次,然后用 0.4%的氢氧化钠溶液煮至白色半透明状,再用蒸馏水冲洗至表面呈中性为止。沥干水分,即为湿膜。将处理好的湿膜于 60 ℃干燥至恒重,

即为干膜。纤维素产量用 g/100 mL 培养液表示[19]。

2.4.5 *发酵培养基的优化*

(1) Plackett-Burman 试验设计

选取葡萄糖/蔗糖、酵母浸出汁、$CaCl_2$、$ZnSO_4$、K_2HPO_4、$MgSO_4$、富马酸、无水乙醇为试验因素,以细菌纤维素湿重为评价指标,设计 Plackett-Burman 试验,因素水平及编码见表 1,数据分析及模型建立用 Design Expert 7.0 版软件完成。

(2) 响应曲面(RSM)试验设计

在 Plackett-Burman 试验的基础上,采用 Box-Behnken 设计对影响高压诱变株 M_{438} 代谢的关键因素做进一步研究,以获得较优的细菌纤维素诱变菌株发酵培养条件。因素水平及编码见表 2,试验方案及结果见表 3。

表 1　$N=12$ 的 Plackett-Burman(PB)试验设计因素水平及编码

Table 1　Level and code of variables for Plackett-Burman design($N=12$)

Factors	Coded levels		Factors	Coded levels	
	−1	1		−1	1
Glucose∶Sucrose	3∶1	5∶1	K_2HPO_4/(%)	0.15	0.25
Yeast juice/(%)	0.50	1.50	$MgSO_4$/(%)	0.50	1.50
$CaCl_2$/(%)	0.10	0.20	Fumaric acid/(%)	0.20	0.40
$ZnSO_4$/(%)	0.15	0.25	Ethanol/(%)	0.10	0.50

表 2　Box-Behnken 试验因素水平及编码

Table 2　Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

Variable	Symbol		Coded levels		
	Coded level	Uncoded level	−1	0	1
Yeast juice/(%)	x_1	Z_1	0.5	1.0	1.5
$MgSO_4$/(%)	x_2	Z_2	0.5	1.0	1.5
Ethanol/(%)	x_3	Z_3	0.1	0.3	0.5

Note:$x_1=(Z_1-1.0)/0.5$;$x_2=(Z_2-1.0)/0.5$;$x_3=(Z_3-0.3)/0.2$

表 3　Box-Behnken 设计方案及细菌纤维素产量

Table 3　Box-Behnken design and experimental value of bacterial cellulose

Trial No.	Yeast juice x_1	$MgSO_4$ x_2	Ethanol x_3	Yield of BC Y/(g/100 mL)	Trial No.	Yeast juice x_1	$MgSO_4$ x_2	Ethanol x_3	Yield of BC Y/(g/100 mL)
1	−1	−1	0	19.90	10	0	1	−1	21.70
2	1	−1	0	22.58	11	0	−1	1	27.82
3	−1	1	0	20.43	12	0	1	1	25.85
4	1	1	0	25.31	13	0	0	0	25.43
5	−1	0	−1	15.15	14	0	0	0	26.95
6	1	0	−1	21.02	15	0	0	0	27.03
7	−1	0	1	24.81	16	0	0	0	25.99
8	1	0	1	29.01	17	0	0	0	27.01
9	0	−1	−1	18.88					

2.4.6 *发酵动力曲线测定*

对培养液中的残糖量、残氮量、酸度、菌体密度以及细菌纤维产量进行测定。

残糖、残氮、酸度、菌体密度的测定分别采用蒽酮硫酸比色法[20]、考马斯亮兰法[20]、NaOH 滴定法[20]和比浊法[21]。

3 结果与分析

3.1 超高压处理时间对细菌致死率的影响

超高压处理时间对细菌致死率的影响如图 1 所示。由图 1 可知，随着超高压处理时间的延长，细菌致死率迅速增大。当处理时间达到 15 min 时，细菌致死率达到 95%；当处理时间为 30 min 时，菌株已全部死亡。因此，超高压诱变的处理时间不能高于 30 min。

3.2 超高压处理压力对细菌致死率的影响

超高压处理压力可导致细菌死亡(见图 2)。当固定处理时间为 15 min 时，随着处理压力的增大，细菌致死率迅速增大。当处理压力为 200 MPa 时，菌株致死率达到 95%以上；当处理时间为 300 MPa 时，菌悬液中的菌株致死率达到 100%。

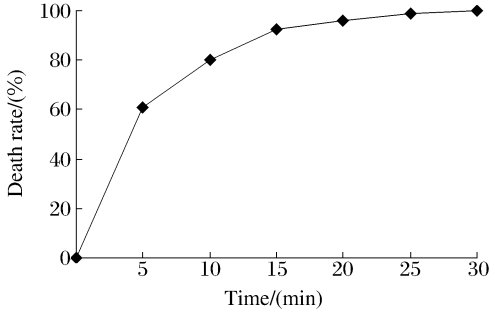


图 1 处理时间-致死率曲线

Fig. 1 The relation between processing time and lethality rate

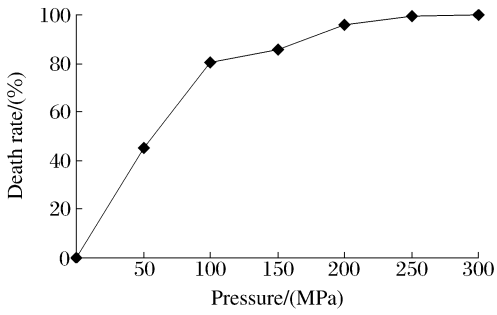


图 2 处理压力-致死率曲线

Fig. 2 The relation between processing pressure and lethality rate

3.3 处理时间与处理压力对致死率的影响

超高压诱变处理时间和压力对菌株生长的影响见图 3，方差分析结果见表 4。

由图 3 可以看出，超高压处理时间与压力对菌株生长有影响。随着处理压力的增大，时间的延长，菌株致死率呈上升趋势，当压力超过 200 MPa、时间超过 15 min 时，致死率达到 95%以上。超高压诱变时处理压力的影响明显高于处理时间的影响(见表 4)。为了筛选出高产且性能优良的诱变株，选择突变率较高(即致死率在 95%以上)的条件为细菌诱变条件。即处理压力为 250 MPa、处理时间 15 min进行超高压诱变处理，以获得诱变株。

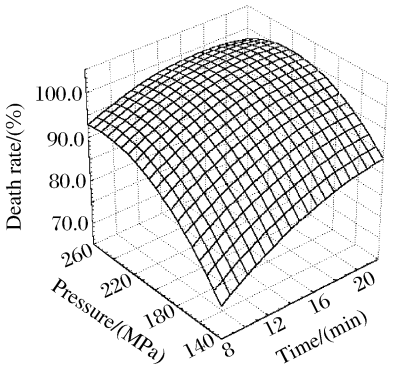


图 3 处理压力与处理时间对菌株致死率的影响

Fig. 3 Effect of processing pressure and time on lethality rate

表 4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	P-value	Significance
Time	86.00	2	43.00	12.80	0.018	*
Pressure	270.80	2	135.40	40.30	0.002	* *
Error	13.44	4	3.36			
Total	370.24	8				

Note: * —$P<0.05$, * * —$P<0.01$.

3.4　诱变菌株的初筛

随机挑取致死率在 95%以上的培养皿中的诱变菌株 50 株,对其分别进行发酵培养,测定产细菌纤维素能力,其产量分布如图 4 所示。

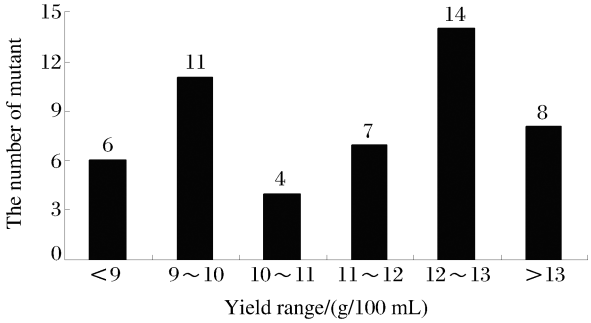


图 4　诱变菌株产量分布

Fig. 4　The yield distribution of mutant

由图 4 可知,菌株 J_2 经超高压诱变处理后,细菌纤维素产量在 9 g/100 mL 以下的有 6 株,9～10 g/100 mL 之间的有 11 株,10～11 g/100 mL之间的有 4 株,11～12 g/100 mL 之间的有 7 株,12～13 g/100 mL 之间的有 14 株,在 13 g/100 mL 以上的有 8 株。因此,选此 8 株高产诱变菌株做遗传稳定性试验,以筛选高产且性能优良的诱变株。

3.5　诱变菌株的复筛

对细菌纤维素产量在 13 g/100 mL 以上的 8 株诱变菌株连续传代培养 5 代,试验结果见表 5。由表 5可以看出,诱变株 M_{143} 和 M_{438} 在传代培养过程中的纤维素产量变异系数明显小于其它菌株,表现出高的遗传稳定性,并在连续传代中,未发生回复突变,且纤维素产量高于诱变前菌株 J_2。由于 M_{438} 的纤维素产量高于 M_{143},且变异系数相对较小,因此选取诱变株 M_{438} 为目标菌株。

表 5　诱变株传代培养结果

Table 5　The results of transmitted generation cultivation of mutant

Strain No.	Yield of waterish BC of each generation/(g/100 mL)					$\bar{x}\pm$SD	Coefficient of variation/(%)
	1	2	3	4	5		
M_{143}	14.21	14.54	13.03	14.75	13.80	14.07±0.68	4.84
M_{148}	13.35	9.30	6.15	11.50	7.66	9.59±2.89	30.14
M_{233}	13.63	9.67	10.30	11.50	4.27	9.87±3.48	35.23
M_{252}	13.02	10.17	4.33	12.97	10.03	10.10±3.54	35.00
M_{351}	13.17	7.92	9.57	4.45	12.87	9.60±3.63	37.85
M_{357}	13.85	10.81	8.10	14.29	6.17	10.64±3.54	33.24
M_{438}	15.58	15.50	16.42	16.04	15.75	15.86±0.38	2.38
M_{471}	14.56	12.48	11.02	6.37	9.41	10.77±3.10	28.82

Note:SD—Standard deviation.

3.6　细菌纤维素发酵培养基组成的筛选

以诱变高产菌株 M_{438} 为试验菌株,以葡萄糖/蔗糖、酵母浸出汁、$CaCl_2$、$ZnSO_4$、K_2HPO_4、$MgSO_4$、富马酸、无水乙醇为考察因素,设计 Plackett-Burman 试验。由试验结果(表 6)分析可以看出 ,酵母浸出汁($P=0.0039$)、$MgSO_4$($P=0.0275$)以及无水乙醇($P=0.0029$)对菌株 M_{438} 发酵生产纤维素有显著或极显著影响,为关键因素,其它 5 个因素的影响未达到显著水平($P>0.05$),在下一步研究中作为条件因素考虑。

3.7　培养基组分与纤维素产量的关系

利用 Design-Expert 软件对 Box-Behnken 试验结果进行二次模型拟合,细菌纤维素产量(Y)对酵母浸出汁(x_1)、$MgSO_4$(x_2)、无水乙醇(x_3)的多元回归模型为

$$Y = 26.48 + 2.20x_1 + 3.84x_3 - 1.20x_2x_3 - 2.75x_1^2 - 1.68x_2^2 - 1.24x_3^2$$

回归模型显著性检验结果(表 7)表明,该模型高度显著($P=0.000\,1$),不失拟 ($P=0.194\,9$),预测值与实测值之间具有高度相关性($R^2=0.972\,6$)。该模型拟合良好,可用于高压诱变株 M_{438} 细菌纤维素发酵的分析和预测。回归系数显著性检验结果(表 8)表明,x_1、x_3、x_1^2、x_2^2 对细菌纤维素产量的影响高度显著,x_3^2、x_2 和 x_3 互作 x_2x_3 对细菌纤维素产量的影响显著,x_2、x_2 和 x_1、x_3 和 x_1 之间的互作影响不显著。

表 6 Plackett-Burman 试验主效应分析

Table 6 Analysis of the main effects for the Plackett-Burman design

Factors	t	P-value	Significance	Factors	t	P-value	Significancece
Glucose/Sucrose	1.48	0.235 4		K_2HPO_4	0.72	0.523 2	
Yeast juice	8.10	0.003 9	* *	$MgSO_4$	4.03	0.027 5	*
$CaCl_2$	−0.59	0.597 0		Fumaric acid	0.34	0.755 7	
$ZnSO_4$	−3.17	0.050 6		Ethanol	9.05	0.002 9	* *

Note: * —$P<0.05$, * * —$P<0.01$.

表 7 回归模型方差分析

Table 7 ANOVA for the regression model

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	P-value
Model	221.87	9	24.65	27.56	0.000 1
Residual	6.26	7	0.89		
Lack of fit	4.10	3	1.37	2.54	0.194 9
Pure error	2.16	4	0.54		
Total	228.13	16			

表 8 回归系数显著性检验

Table 8 Regression coefficients significance

Variable	Coefficient	Standard error	t	P-value	Significance
Intercept	26.48	0.42	—	—	
Yeast juice (x_1)	2.20	0.33	43.47	0.000 3	* *
$MgSO_4$ (x_2)	0.52	0.33	2.37	0.167 4	
Ethanol(x_3)	3.84	0.33	131.99	< 0.000 1	* *
x_1^2	−2.75	0.46	35.51	0.000 6	* *
x_2^2	−1.68	0.46	13.31	0.008 2	* *
x_3^2	−1.24	0.46	7.20	0.031 4	*
x_1x_2	0.55	0.47	1.35	0.282 7	
x_1x_3	−0.42	0.47	0.77	0.407 9	
x_2x_3	−1.20	0.47	6.43	0.038 9	*

Note: * —$P<0.05$, * * —$P<0.01$.

对回归模型极值求解,当 $x_1=0.5$、$x_2=-0.14$、$x_3=0.98$ 时,细菌纤维素的预测最大产量为 29.29 g/100 mL。由 Box-Behnken 试验因素水平编码公式 $x_1=(Z_1-1.0)/0.5$、$x_2=(Z_2-1.0)/0.5$、$x_3=(Z_3-0.3)/0.2$ 计算出的各因素实际水平取值分别为酵母浸出汁为 1.25%、$MgSO_4$ 为 0.93%、无水乙醇为 0.50%。为验证模型预测的准确性和有效性,在极值点条件下进行试验,实测细菌纤维素产量为 28.99 g/100 mL,与预测结果没有显著差异,为优化前的 1.84 倍(15.75 g/100 mL),是超高压诱变之前菌株 J_2 产量(10.76 g/100 mL)的 2.694 倍。

3.8　细菌纤维素菌株发酵培养基响应面分析

根据模型方程作响应曲面(图 5、图 6)。图 5 表明,当培养基中酵母浸出汁浓度取零水平时,$MgSO_4$ 和无水乙醇的交互作用对细菌纤维素产量有显著影响($P=0.038\,9$)。由图 5 可以看出,随着 $MgSO_4$ 浓度的提高,细菌纤维素的产量呈现先增加后减少的趋势;随着无水乙醇浓度的提高,细菌纤维素的产量亦呈增加趋势。当无水乙醇浓度较高时,$MgSO_4$ 对细菌纤维素产量的影响较大,无水乙醇浓度较低时,$MgSO_4$ 对细菌纤维素产量的影响较小。当 $MgSO_4$ 浓度为 1%、无水乙醇浓度为 0.5%时,细菌纤维素的产量最高。

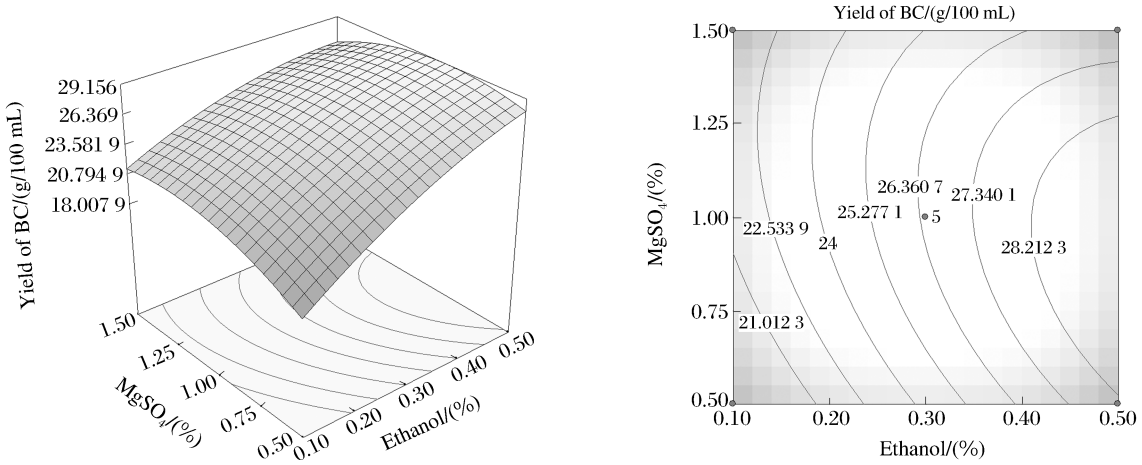


图 5　$MgSO_4$ 及无水乙醇交互影响细菌纤维素产量的响应曲面图及等高线图

Fig. 5　Response surface polt and contour plot for the interaction effects of $MgSO_4$ and ethanol on the yield of BC

图 6 为 $MgSO_4$ 取零水平时,酵母浸出汁和无水乙醇对细菌纤维素产量的影响。可以看出,随着酵母浸出汁浓度的升高,细菌纤维素的产量呈现先增加后减少的趋势。当无水乙醇浓度较高时,酵母浸出汁对细菌纤维素产量的影响较大。在试验水平范围之内,细菌纤维素产量随着无水乙醇浓度的升高而增加。当无水乙醇浓度在 0.5%、酵母浸出汁浓度在 1%～1.25%范围内时,细菌纤维素产量达到最大,但二者的交互作用影响未达到显著水平($P=0.407\,9$)。

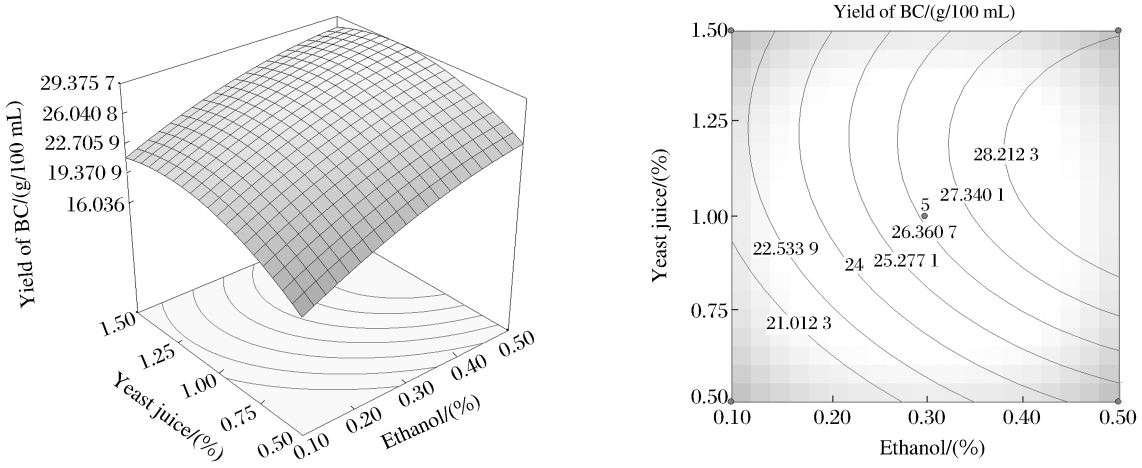


图 6　酵母浸出汁和无水乙醇对细菌纤维素产量的影响响应曲面图及等高线图

Fig. 6　Response surface polt and contour plot for the effects of yeast juice and ethanol on the yield of BC

3.9 细菌纤维素菌株发酵动力学曲线

在前期研究[16]的基础上，选取 9％的接种量，将诱变菌株 M_{438} 种子液接种于优化好的发酵培养基中，30 ℃静置培养 11 d，培养过程中菌体生长、残糖、残氮、产细菌纤维素以及酸度的变化见图 7。

由图 7 可以看出，菌体在培养 2 d 后，进入对数生长期，在第 7 天 进入稳定期，菌体密度达到最大值；菌体在生长的第 2 天开始代谢产生纤维素，在第 2 天到第 7 天之间，纤维素产量增长很快，在第 7 天趋于稳定，产量增长缓慢；发酵液的总糖和总氮在培养的前 2 天消耗慢，当菌体进入对数生长期以后，消耗速度开始加快，残糖和残氮在第 9 天降到最小值，随后变化缓慢；菌体在生长过程中，会将葡萄糖转化为葡萄糖酸，培养液中的酸度在整个培养过程中有增大趋势。综合考虑，发酵培养的最佳天数是 7 d。

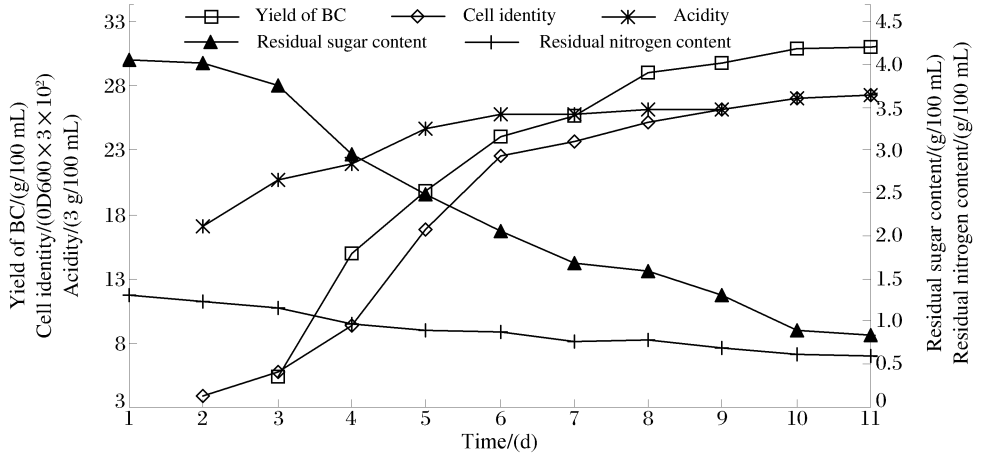


图 7 液体发酵动力学曲线

Fig. 7 The curves of liquid fermentation kinetics

4 结 论

超高压诱变压力对细菌纤维素菌株生长的影响大于时间的影响。细菌纤维素菌株高压诱变条件为压力 250 MPa、时间 15 min、温度 25 ℃。经超高压诱变处理，获得产纤维素能力高、遗传稳定性好的诱变菌株 M_{438}，其纤维素产量是 15.75 g/100 mL，为诱变前的 1.485 倍，表明超高压技术用于细菌纤维素菌株诱变育种是可行性。

采用 Placket-Burman 试验设计，筛选出了影响诱变菌株 M_{438} 发酵生产细菌纤维素的关键因子是酵母浸出汁、$MgSO_4$ 和无水乙醇。通过响应面法建立细菌纤维素菌株发酵培养基组分与产量之间的回归模型为，$Y = 26.48 + 2.20x_1 + 3.84x_3 - 1.20x_2x_3 - 2.75x_1^2 - 1.68x_2^2 - 1.24x_3^2$，该模型高度显著，拟合性好，可用于实际预测。

优化的发酵培养基为碳源 5％(葡萄糖：蔗糖为 4：1)、酵母浸出汁 1.25％、$CaCl_2$ 0.15％、$ZnSO_4$ 0.2％、K_2HPO_4 0.2％、$MgSO_4$ 0.93％、富马酸 0.3％、无水乙醇浓度 0.5％。利用此培养基培养诱变的细菌纤维素菌株 M_{438}，其纤维素产量是优化前的 1.84 倍，是超高压诱变之前的 2.69 倍。

References:

[1] Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1991, 55(1): 35-58.

[2] Ma C Z, Gu Z R. Biological and Physicochemical Properties and Commercial Application of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* [J]. Acta Agriculture Shanghai, 2001, 17(4): 93-98. (in Chinese)

马承铸,顾真荣. 细菌纤维素生物理化特性和商业用途 [J]. 上海农业学报,2001,17(4):93-98.

[3] Tan Y J,Hong F,Shao Z Y. Bacterial Cellulose Application in Foods [J]. China Biotechnology,2007,27(4):126-131. (in Chinese)
谭玉静,洪　枫,邵志宇. 细菌纤维素在食品中的应用 [J]. 中国生物工程杂志,2007,27(4):126-131.

[4] Pu H Y,Chen Y Q. Bacterial Cellulose and Its Application in Food Industry [J]. Journal of Cereals and Oils,2005,(9):16-17. (in Chinese)
蒲海燕,陈宇前. 细菌纤维素及其在食品工业中的应用 [J]. 粮食与油脂,2005,(9):16-17.

[5] Song H N,Zhang Y Q,Guo H Q. Bacterial Cellulose the Applications and Prospect on Papermaking [J]. Journal of Guangxi University,2004,29(1):73-76. (in Chinese)
宋海农,张远秋,郭华清. 细菌纤维素在造纸工业中的应用和展望 [J]. 广西大学学报(自然科学版),2004,29(1):73-76.

[6] Sanchavanakit N,Sangrungraungroj W,Aomongkolgit R,et al. Growth of Human Keratinocytes and Fibroblasts on Bacterial Cellulose Film [J]. Biotechnology Prog,2006,22(4):1194-1199.

[7] Ma X,Chen S W,Wang R M,et al. Nanometer Biomaterial Cellulose for Accelerating Skin Wound Healing in Rats [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2006,10(37):45-48. (in Chinese)
马　霞,陈世文,王瑞明,等. 纳米材料细菌纤维素对大鼠皮肤创伤的促愈作用 [J]. 中国临床康复,2006,10(37):45-48.

[8] Nguyen V T,Gidley M J,Dykes G A,et al. Potential of a Nisin-Containing Bacterial Cellulose Film to Inhibit *Listeria monocytogenes* on Processed Meats [J]. Food Microbiology,2008,25(3):471-478.

[9] Wang S L,Wu X Z,Hao L H,et al. Mutation Effect of Ultra High Pressure on Industrialized Microbe [J]. China Biotechnology,2005,25(6):7-9. (in Chinese)
王岁楼,吴晓宗,郝莉花,等. 超高压在工业微生物诱变选育中的应用初探 [J]. 中国生物工程杂志,2005,25(6):7-9.

[10] Gao X,Li J,Ruan K C. Barotolerant *E. coli* Induced by High Hydrostatic Pressure [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica,2001,33(1):79-84. (in Chinese)
高　翔,李　炯,阮康成. 高压力诱变的耐压大肠杆菌 [J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33(1):77-81.

[11] Silva J L,Luan P,Glaser M,et al. Effects of Hydrostatic Pressure on a Membrane-Enveloped Virus:High Immunogenicity of the Pressure-Inactivated Virus [J]. J Virology,1992,66(4):2111-2117.

[12] Wang S L,Wu X Z,Hao L H,et al. Mutation Effect of Ultra High Pressure on Microbe [J]. Acta Microbiologica Sinica,2005,45(6):970-973. (in Chinese)
王岁楼,吴晓宗,郝利花,等. (超)高压对微生物的影响及其诱变效应探讨 [J]. 微生物学报,2005,45(6):970-973.

[13] Wang S L,Li G F,Wang Q B,et al. Mutagenic Effect of UV Radiation and Ultra High Pressure on Strains Producing Laccase [J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry,2005,20(3):39-42. (in Chinese)
王岁楼,李国富,王琼波,等. 紫外和超高压诱导漆酶产生菌变异的对比研究 [J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2005,20(3):39-42.

[14] Wang H,Shen S L,Li Z H,et al. High Pressure-Induced Changes of Physico-Chemical Properties and Mutagenesis in *Aspergillus Oryza* [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics,2008,22(3):259-263. (in Chinese)
王　华,申斯乐,李志慧,等. 高压对米曲霉理化性质影响及诱变的研究 [J]. 高压物理学报,2008,22(3):259-263.

[15] Wu R Q,Li Z X,Shao D Y,et al. Screening and Primary Identification of Bacterial Cellulose Producing Strain [J]. China Brewing,2008,(10):37-38. (in Chinese)
毋锐琴,李志西,邵东燕,等. 高产细菌纤维素菌株的分离及初步鉴定 [J]. 中国酿造,2008,(10):37-38.

[16] Wu R Q,Du S K,Li Z X,et al. Optimization of Bacterial Cellulose Fermentation Medium and Observation of Bacterial Cellulose Ultra-Micro-Structure [J]. Chinese Journal of Biotechnology,2008,24(6):1068-1074. (in Chinese)
毋锐琴,杜双奎,李志西,等. 细菌纤维素发酵培养基的优化及超微观结构分析 [J]. 生物工程学报,2008,24(6):1068-1074.

[17] Guo W Q,Ren N Q,Wang X J,et al. Optimization of Culture Conditions for Hydrogen Production by *Ethanoligenens Harbinense* B49 Using Response Surface Methodology [J]. Bioresource Technology,2008,100(3):1192-1196.

[18] Banik R M, Santhiagu A, Upadhyay S N, et al. Optimization of Nutrients for Gellan Gum Production by *Sphingomonas Paucimobilis* ATCC-31461 in Molasses Based Medium Using Response Surface Methology [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 792-797.

[19] Sheu F, Wng C L, Shyu Y T. Fermentation of *Monascus purpureus* on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus*-nata Complex [J]. J Food Sci, 2000, 65(2): 342-345.

[20] Dalian Polytechnic University, Zhengzhou University of Light Industry. Food Analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006: 100-216. (in Chinese)
大连轻工学院, 郑州轻工学院. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 100-216.

[21] Yang G. Microbiology Experiment [M]. Beijing: Science Press, 2004: 159-170. (in Chinese)
杨 革. 微生物学试验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 159-170.

Breeding of Bacterial Cellulose Strain Induced by Ultra-High Pressure and Optimization of Fermentation Medium

DU Shuang-Kui, LI Zhi-Xi, WU Rui-Qin, YANG Jia-Ping

(*College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling* 712100, *China*)

Abstract: In order to obtain high-yield strains of bacterial cellulose(BC), the primary bacterial cellulose strain was induced by ultra-high pressure. Plackett-Burman design was employed to evaluate variables which were relevant to yield of BC which was produced by strain induced by ultra-high-pressure. Fermentation medium composition was optimized through Box-Behnken experiment. The results show that mutagenic pressure and time on the strain of bacterial cellulose have significant or extremely significant influence. The mutagenic conditions of BC strain are pressure of 250 MPa, time of 15 min, and temperature of 25 ℃. The mutagenic strain M_{438} with high cellulose production capacity and genetic stability is obtained through the ultra-high pressure treatment. The key factors affected bacterial cellulose production of mutation strain M_{438} are yeast juice, $MgSO_4$, and anhydrous ethanol. The optimistic fermentation medium is as follows, carbon source 5%(glucose : sucrose = 4 : 1), yeast juice 1.25%, $CaCl_2$ 0.15%, $ZnSO_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4$ 0.93%, fumaric acid 0.3%, and ethanol 0.5%. BC yield of M_{438} cultured with optimized fermentation medium is as 1.84 times as that cultured with the initial fermentation medium, and is as 2.69 times as that of the unmutant strain. Ultra-high pressure technology for mutation breeding of bacterial cellulose strain is feasible. BC producing capacity of M_{438} can be significantly improved through fermentation medium optimization.

Key words: bacterial cellulose strain; ultra-high pressure mutagenesis; fermentation medium; fermentation