

• 工业生物技术 •

# 木葡糖酸醋杆菌运动相关基因的敲除及对细菌纤维素合成的影响

刘嘉恒<sup>1,2</sup>, 王旭<sup>1,2</sup>, 彭昭君<sup>1,2</sup>, 辛波<sup>1,2\*</sup>, 钟成<sup>1,2\*</sup>

1 天津科技大学 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学 教育部工业发酵微生物重点实验室, 天津 300457

刘嘉恒, 王旭, 彭昭君, 辛波, 钟成. 木葡糖酸醋杆菌运动相关基因的敲除及对细菌纤维素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1856-1867.

LIU Jiaheng, WANG Xu, PENG Zhaojun, XIN Bo, ZHONG Cheng. Knockdown of motility-related genes of *Komagataeibacter xylinus* and its effect on bacterial cellulose synthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1856-1867.

**摘要:** 细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)是由细菌合成的高分子生物聚合物, 具有持水性强、结晶度高、纯度高、稳定性高等优良特性, 广泛应用于食品、医疗、化妆品和功能膜等领域。木葡糖酸醋杆菌(*Komagataeibacter xylinus*)是BC合成研究的模式菌株。在细菌中, 运动相关基因与BC合成有关, 而在木葡糖酸醋杆菌CGMCC 2955中, 尚不清楚运动相关基因的功能及其对BC合成的影响。本研究利用 $\lambda$ -Red重组系统敲除细菌运动相关基因*motA*、*motB*、*mot2A*, 以此构建了敲除菌株*K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A*及双敲菌株*K. x-ΔmotAB*。结果表明: 敲除菌*K. x-ΔmotAB*的BC产量最高, 达到(5.05±0.26) g/L, 与野生型菌株相比, 提高24%左右; 同时, 该菌株合成的BC的孔隙率最低, 达到了54.35%, 并具有更优越的力学性能, 杨氏模量可达5.21 GPa。在木葡糖酸醋杆菌CGMCC 2955中敲除运动相关基因之后, 并未降低BC的产量, 反而促进了BC的合成, 进一步加深了醋杆菌中运动性与BC关系的认知; 并且敲除*motA*和*motB*基因后, 降低了BC的孔隙率并提升了BC的力学性能, 为BC合成及膜结构调节改造提供了参考。

**关键词:** 木葡糖酸醋杆菌; 细菌纤维素; 运动相关基因; 基因敲除

资助项目: 国家自然科学基金(21978219)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21978219).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHONG Cheng, czhong@tust.edu.cn; XIN Bo, xinbo@tust.edu.cn

Received: 2023-10-10; Accepted: 2024-01-08

# Knockdown of motility-related genes of *Komagataeibacter xylinus* and its effect on bacterial cellulose synthesis

LIU Jiaheng<sup>1,2</sup>, WANG Xu<sup>1,2</sup>, PENG Zhaojun<sup>1,2</sup>, XIN Bo<sup>1,2\*</sup>, ZHONG Cheng<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Food Nutrition & Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Ministry of Education), Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer synthesized by bacteria, which possess excellent characteristics such as high water holding capacity, high crystallinity, and high purity. It is widely used in food, medical, cosmetics, and functional films. *Komagataeibacter xylinus* is a model strain used in BC synthesis research. In bacteria, motility-related genes are associated with BC synthesis, whereas in *Komagataeibacter xylinus* CGMCC 2955, the functions of motility-related genes and their effects on BC synthesis are not known. To address this gap, we used the  $\lambda$  Red recombinant system to individually knock out *motA*, *motB*, and *mot2A* respectively, and constructed the knockout strains *K. x- $\Delta$ motA*, *K. x- $\Delta$ motB*, and *K. x- $\Delta$ mot2A*. Additionally, both *motA* and *motB* were disrupted to construct the *K. x- $\Delta$ motAB* mutant. The results demonstrated that knockout strain *K. x- $\Delta$ motAB* exhibited the highest BC yield, reaching (5.05 $\pm$ 0.26) g/L, which represented an increase of approximately 24% compared to wild-type strains. Furthermore, the BC synthesized by this strain exhibited the lowest porosity, 54.35%, and displayed superior mechanical properties with a Young's modulus of up to 5.21 GPa. As knocking out *motA* and *motB* genes in *K. xylinus* CGMCC 2955 did not reduce BC yield; instead, it promoted BC synthesis. Consequently, this research further deepened our understanding of the relationship between motility and BC synthesis in acetic acid bacteria. The knockouts of *motA* and *motB* genes resulted in reduced BC porosity and improved mechanical properties, provides a reference for BC synthesis and membrane structure regulation modification.

**Keywords:** *Komagataeibacter xylinus*; bacterial cellulose; motility-related genes; gene knockout

细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)是指由细菌发酵生产的纤维素,与植物纤维素相比,细菌纤维素独特的纳米结构赋予它一系列独特的特性,如高持水性、高比表面积、高结晶度、高生物相容性、高柔韧性、高亲水性、高纯度(不含木质素和半纤维素)和仿生三维(three-dimensional, 3D)网络等优异性能<sup>[1-4]</sup>。由于这些特点,细菌纤维素广泛应用于生物医学、化妆品、汽车、包装、保健食品、电子和传感器等不同行业<sup>[5-8]</sup>。

细菌纤维素的主要生产菌株是木葡糖酸醋杆菌(*Komagataeibacter xylinus*),该菌由于较高的BC产量,已被用于商业化生产BC<sup>[9]</sup>。BC目前的研究热点,主要集中在产量和结构性能的研究<sup>[10-11]</sup>。近年来,有研究者通过过表达BC合成基因簇,辅因子合成等来增加BC合成;或者通过调控相关基因表达改变BC的结构,扩展其应用<sup>[12-13]</sup>。此外,细胞运动对细菌的生物膜形成具有重要的影响<sup>[14]</sup>。但是,BC合成和运动之间的关系仍不清晰,

目前在 *K. xylinus* CGMCC 2955 中还没有相关研究。本研究首次探索了 *K. xylinus* CGMCC 2955 菌株中 BC 合成和运动之间的关系。

细菌运动是一种复杂的现象,在生物膜形成过程中起着重要作用。*Komagataeibacter* 属的菌株表现出的运动方式为趋化运动。在革兰氏阴性菌中,细胞运动是形成生物膜的关键因素。多数可运动细菌利用鞭毛进行运动,其中,鞭毛运动蛋白 MotA/MotB 在生物膜形成中发挥重要作用。MotA 和 MotB 是膜结合蛋白,它们形成一种异六聚体 MotA<sub>4</sub>/MotB<sub>2</sub>,对细菌的运动是必不可少的。同时,MotA 和 MotB 也参与了细菌的能量转换,形成质子通道并利用质子动力(proton-motive force, PMF),使流过膜的 H<sup>+</sup>产生旋转。然而,这些蛋白质并不参与运动,而是参与基质穿过外膜的主动运输<sup>[15]</sup>。目前对于细菌运动在 BC 生物合成中的作用知之甚少。Brown 等<sup>[16]</sup>于 1976 年首次观察到木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)中细胞运动率与 BC 的生物合成相关。最近在汉氏驹形杆菌(*Komagataeibacter hansenii*)中研究发现敲除运动相关基因 *motA* 和 *motAB* 后,

BC 形态发生变化并且产量明显减少<sup>[17]</sup>。由此推测,在菌株 *K. xylinus* CGMCC 2955 中,运动相关基因对于 BC 的合成可能也有影响。

基于此,我们首先在 *K. xylinus* CGMCC 2955 菌株中找出了与 *motB* 同源性较高的基因,分别命名为 *motA*、*motB*、*mot2A*,并通过实验室构建的基于  $\lambda$ -Red 重组的基因敲除系统<sup>[18]</sup>,依次构建了敲除菌株 *K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A* 及双敲菌株 *K. x-ΔmotAB*;对敲除菌株进行发酵验证及 BC 结构分析,探究 BC 合成与运动相关基因的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株及质粒

木葡糖酸醋杆菌(*K. xylinus* CGMCC 2955),由工业发酵微生物教育部重点实验室筛选,中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)保藏。本研究构建载体所用菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 。其他菌株及质粒如表 1 所示。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids         | Features   | Source                       |
|------------------------------|--|------------------------------|
| Strains                      |  |                              |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  |  | Preserved in this laboratory |
| <i>K. xylinus</i> CGMCC 2955 |  | Preserved in this laboratory |
| GX01                         | 2955 harboring pRedGx  | Preserved in this laboratory |
| <i>K. x-ΔmotA</i>            |  | This Study                   |
| <i>K. x-ΔmotB</i>            |  | This Study                   |
| <i>K. x-Δmot2A</i>           |  | This Study                   |
| <i>K. x-ΔmotAB</i>           |  | This Study                   |
| Plasmids                     |  |                              |
| pKD3                         | R6K r ori, Amp <sup>R</sup> , FRT-Cm <sup>R</sup> -FRT                           | [19]                         |
| pUC18                        | Cloning vector, pMB1 ori, Amp <sup>R</sup>                                       | Preserved in this laboratory |
| pTrcGx                       | pBBR1 ori, Kan <sup>R</sup> , <i>lacIq-P<sub>trc</sub></i>                       | Preserved in this laboratory |
| pRedGx                       | pBBR1 ori, Kan <sup>R</sup> , <i>lacIq-P<sub>trc</sub>-Red</i>                   | Preserved in this laboratory |
| pFLPGx                       | FRT-pBBR1-FRT, Sm <sup>R</sup> ( <i>aadA</i> ), <i>lacIq-P<sub>trc</sub>-flp</i> | Preserved in this laboratory |

## 1.2 培养基配制

Luria-Bertani (LB)培养基: 在 1 L 水中加入 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母粉和 10 g 氯化钠, 121 °C 灭菌 20 min, 保存备用。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂。

木葡糖酸醋杆菌培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 7.5 g, 磷酸氢二钠 10 g, 加去离子水至 950 mL, 冰醋酸调节 pH 至 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。葡萄糖 25 g/L, 115 °C 灭菌 15 min。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂。

## 1.3 发酵培养

从固体培养基平板上挑取单菌落至液体培养基, 180 r/min、30 °C 培养 24 h。取 1 mL 发酵液转移至含有 4% (体积分数) 纤维素酶 (5 000 U/mL) 的 100 mL 新鲜发酵培养基中, 180 r/min、30 °C 振荡培养 24 h。4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重悬菌体, 将菌体接种至 100 mL 新鲜发酵培养基中, 使  $OD_{600}$  为 0.02。

振荡培养条件为 180 r/min、30 °C, 培养 8 d。静置培养条件为 30 °C, 培养 8 d。

## 1.4 引物

实验中所采用的基于  $\lambda$ -Red 重组的敲除载体为本实验室已构建载体<sup>[18]</sup>。表 2 为本实验所用引物。

## 1.5 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库获取表达鞭毛运动蛋白的基因 *motB* (CCG43153.1) 的氨基酸序列。将氨基酸序列通过 tblastn 与 *K. xylinus* CGMCC 2955 基因组进行分析比对, 获得基因组上与 *motB* (CCG43153.1) 同源性较高的基因序列。

## 1.6 细菌群集运动

将敲除菌株和野生菌株的菌液  $OD_{600}$  调至 0.05, 然后将 2  $\mu$ L 菌液接种到含 0.7% 琼脂粉的 HS 培养皿上, 30 °C 孵育 4 d。每隔 48 h 测量培养物的铺展直径(mm), 并将培养皿放在凝胶成像仪中拍照。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

| Primer | Sequence (5'→3')                           |
|--------|--|
| Cm-U   | GAATTCTCCGTGGACCTGCAGTTCG                  |
| Cm-D   | GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGT                  |
| MBA-U  | CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGTTCTCCGGCTCCATGTTTCG |
| MBA-D  | AGAATTCGGGAACCTTGCCCTGTCTTG                |
| MBB-U  | CCAGCCTACACTATCGACCTGCCGGGTGG              |
| MBB-D  | GGTACCCGGGGATCCCGCGCAGGATGACCTGG           |
| MAA-U  | CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGAGGCCGACGACTGAT      |
| MAA-D  | AGAATTCATCGTGTTCGATGCGC                    |
| MAB-U  | CCAGCCTACACGGCCTTGGCATGCGC                 |
| MAB-D  | GGTACCCGGGGATCCCAATAGGCCTGTGCGCCC          |
| WAA-U  | CAATAGGCCTGTGCGCCCGTTCTCCGGCTCCATGTTTCG    |
| WAA-D  | AGAATTCGGGAACCTTGCCCTGTCTTG                |
| WAB-U  | CCAGCCTACACTATCGACCTGCCGGGTGG              |
| WAB-D  | GGTACCCGGGGATCCCGCGCAGGATGACCTGG           |
| YZA-U  | GCGATCAGGGACACCATTTT                       |
| YZA-D  | CGGTGCCAGTTATATCGTTG                       |
| YZB-U  | CTGGCCGGACCATTGCATGG                       |
| YZB-D  | TTGAGACGGAACCTGGCCCAT                      |
| YZW-U  | CTTGTATGCTGAATGGCGTA                       |
| YZW-D  | CCCTTCGTCCAGGCAGATG                        |

## 1.7 细菌纤维素的提取和处理

发酵结束后,将 BC 从培养基中取出,用蒸馏水多次冲洗以去除表面的培养基及杂质;将细菌纤维素样品浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,每 12-24 h 更换一次 NaOH 溶液,直至残留培养基或菌体彻底去除,BC 膜呈乳白色;用去离子水浸泡并反复清洗至纤维素膜表面 pH 为 7.0。

## 1.8 细菌纤维素质量的测定

按照方法 1.7 对 BC 进行预处理,再将 BC 放于 80 °C 恒温干燥箱中干燥至恒重。BC 的产量表示为: g 纤维素/L 培养基。

## 1.9 葡萄糖浓度的测定

取 1 mL 发酵液,12 000 r/min 离心去除沉淀,稀释 100×后使用 SBA-40E 生物传感器测定葡萄糖的浓度。

## 1.10 BC 性能的特征

### 1.10.1 扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观测 BC 形态

将纯化后的 BC 样品液氮预冻 15 min,使 BC 中的水分完全凝固成冰,迅速转移至真空冷冻干燥机中冻干,确保 BC 中的冰不能溶解,否则 BC 的三维结构将会塌陷。最后将完全干燥的 BC 样品置于干燥皿中备用。

采用场发射扫描电子显微镜,参数为:HV=2.00 kW,spot=4.0,扫描时,将 BC 样品剪成小块并撕去表层,暴露出截面的纤维结构,利用导电胶将样品粘在工作台上,喷金处理后放入扫描电镜上机测试,进行观察并拍照。

### 1.10.2 BC 孔隙率的计算

利用软件对 BC 的 SEM 图像进行处理,首先对原图灰度化处理,随后进行二值化处理,图像中黑色像素点占原图中的百分比,即为所求的孔隙率。运算代码如下:%为得到图形中颜色比例,首先将图片灰度化,接着将图片二值化。

```
P=imread('C:\图片名称.BMP'); %读取图 figure(1), imshow(P); %画出图 P。B=rgb2gray(P); %灰度化。Figure(2), imshow(B)%显示灰度化后的图像。Title('灰度化后的图像')。Value=graythresh(P); %获取阈值。BP=im2bw(P,value); %二值化图形。Figure(3), imshow(BP)。Length(find(BP(B)=0))/length(BP(B))。
```

### 1.10.3 傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)测试

傅里叶红外光谱(FT-IR)可用于测定样品的结构特征和官能团变化。测定前,需将待测 BC 样品进行热干处理,并且 BC 薄膜的表面尽量平整。采用全反射(ATR)模式测定样品,测定时将压干的样品压紧在金刚石检测台上,设置扫描参数为:4 000 cm<sup>-1</sup>-400 cm<sup>-1</sup>的扫描范围,4 cm<sup>-1</sup>的分辨率,扫描次数 32 次,20 °C 的相对温度,65%的相对湿度。

### 1.10.4 BC 拉伸强度测定

样品预处理:将事先处理好的 BC 样品使用纸页成型器压干至恒重。

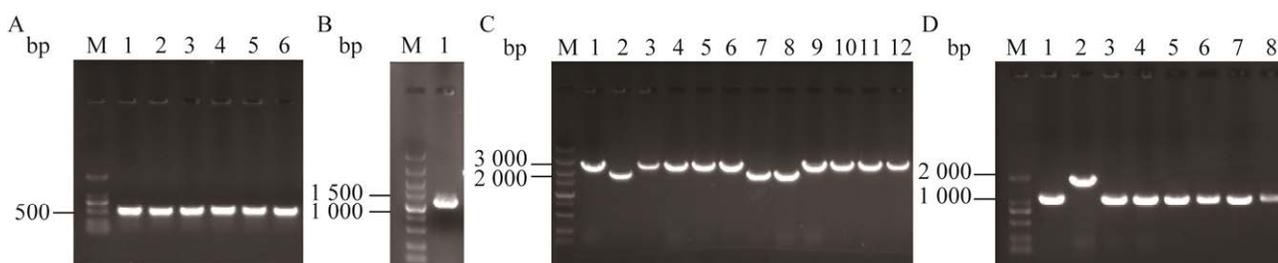
力学性能测定:将压干的 BC 样品切成 15 mm 宽的长条形试样,用纸张厚度测试仪测量样品厚度,用 CMT4503 微机控制电子万能试验机对样品进行力学性能测试。实验参数设置为:5 mm/min 拉伸速度,L<sub>0</sub>=25 mm 标距,0 N 初始试验力。拉伸强度以  $\sigma_t$  表示,计算公式: $\sigma_t=F/bd$ 。式中: $\sigma_t$  为拉伸强度,MPa;F 为伸长断裂时所受的最大力,N;b 为试样宽度,mm;d 为试样厚度,mm。将压干至恒重的 BC 样品剪裁成宽 15 mm 的长条形样品,采用厚度测定仪测定样品厚度,再采用抗张强度测定仪测定其最大力和断裂伸长率。拉伸速度为 5 mm/min。杨氏模量计算公式: $E=F \times L / (\Delta L \times a \times b)$ 。式中:E 为杨氏模量,GPa;F 为最大力,N;L=0.1 m; $\Delta L$  为断裂伸长量,m;a=0.01 m;b 为膜厚,m。

## 2 结果与分析

### 2.1 运动相关基因敲除菌株的构建

利用基于  $\lambda$ -Red 重组的基因敲除系统将 *K. xylinus* CGMCC 2955 基因组中注释的 *motA* (3 123 207–3 124 253 bp)、*mot2A* (3 271 674–3 272 444 bp)以及比对获取的 *motB* (3 124 277–3 125 242 bp)进行敲除。以 *K. xylinus* CGMCC 2955 基因组为模板,分别以表 2 的相关引物对 MAA-U/MAA-D 扩增基因 *motA* 的上游同源臂 500 bp、MAB-U/MAB-D 扩增基因 *motA* 的下游同源臂 500 bp、MBA-U/MBA-D 扩增基因 *motB* 的上游同源臂 500 bp、MBB-U/MBB-D 扩增基因 *motB* 的下游同源臂 500 bp、WAA-U/WAA-D 扩增基因 *mot2A* 的上游同源臂 500 bp 和 WAB-U/WAB-D 扩增基因 *mot2A* 的下游同源臂

500 bp, 基因 *motAB* 的上、下游同源臂分别为基因 *motA* 的上游同源臂和基因 *motB* 的下游同源臂(图 1A)。以 pKD3 质粒为模板,Cm-U 和 Cm-D 为引物扩增氯霉素抗性基因(图1B)。将上述基因片段以及 *Bam*H I 酶切的 pUC18 载体,进行纯化回收,并将上游同源臂、氯霉素抗性基因、下游同源臂以及载体片段进行重组连接,将重组连接成功的质粒电转化到 GX01 菌株(含 pRedGx 质粒)。在待敲除基因上游同源臂上游、下游同源臂下游设计引物 YZA-U/YZA-D、YZB-U/YZB-D、YZW-U/YZW-D, 扩增出目的条带(图 1C)。将载体 pFLPGx (含壮观霉素抗性基因)转化到正确的转化子中,由于 pFLPGx 质粒与 pRedGx 质粒具有相同的复制子,从而将 pRedGx 质粒丢失。将成功消除 pRedGx 质粒的转化子转接到液体培养基中,添加 IPTG 诱导 FLP 翻转酶表达,



**图 1 敲除菌株的构建** A: PCR 扩增同源臂片段电泳图. M: DNA Marker; 1、2: *motA* 上下游同源臂; 3、4: *motB* 上下游同源臂; 5、6: *mot2A* 上下游同源臂. B: PCR 扩增氯霉素片段电泳图. M: DNA Marker; 1: 氯霉素抗性基因 *Cm<sup>R</sup>*. C: 转化子单菌落 PCR 验证电泳图. M: DNA Marker; 1–3: 含氯霉素抗性基因的 *K. x-ΔmotA*; 4–6: 含氯霉素抗性基因的 *K. x-ΔmotB*; 7–9: 含氯霉素抗性基因的 *K. x-Δmot2A*; 10–12: 含氯霉素抗性基因的 *K. x-ΔmotAB*. D: 丢失抗性基因的菌落 PCR 验证电泳图. M: DNA Marker; 1、2: *K. x-ΔmotA*; 3、4: *K. x-ΔmotB*; 5、6: *K. x-Δmot2A*; 7、8: *K. x-ΔmotAB*

Figure 1 Construction of knockout strains. A: Electrophoretic image of homologous arm fragment amplified by PCR. M: DNA Marker; 1 and 2: The upstream and downstream homology arms of *motA*; 3 and 4: The upstream and downstream homology arms of *motB*; 5 and 6: The upstream and downstream homology arms of *mot2A*. B: Electrophoretic image of chloramphenicol fragment amplified by PCR. M: DNA Marker; 1: The chloramphenicol resistance gene *Cm<sup>R</sup>*. C: The electrophoretic map was verified by PCR for a single colony of inverters. M: DNA Marker; 1–3: *K. x-ΔmotA* containing chloramphenicol resistance genes; 4–6: *K. x-ΔmotB* containing chloramphenicol resistance genes; 7–9: *K. x-Δmot2A* chloramphenicol-containing resistance genes; 10–12: *K. x-ΔmotAB* chloramphenicol-containing resistance genes. D: PCR validation electrophoretogram of colonies with loss of resistance genes. M: DNA Marker; 1 and 2: *K. x-ΔmotA*; 3 and 4: *K. x-ΔmotB*; 5 and 6: *K. x-Δmot2A*; 7 and 8: *K. x-ΔmotAB*.

由于 FLP 翻转酶具有特定的识别位点(Flip recognition target, FRT), 并将 FRT 位点间的序列消除, 因此可以达到丢失 pFLPGx 质粒以及整合到基因组中的氯霉素抗性基因的目的。在不含抗生素的平板中能够生长, 但在含有壮观霉素和氯霉素平板中无法生长的转化子, 即为 pFLPGx 载体以及  $Cm^R$  抗性基因成功消除的菌株, 如图 1D 所示。并将其分别命名为 *K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A* 和 *K. x-ΔmotAB*。

## 2.2 群集运动

细菌在高密度下会发生群集运动, 在相应培养基上出现以接种点为中心向外蔓延的生长区域, 生长区域直径越大, 表明细菌的群集运动能力越强<sup>[20]</sup>。对比数据(图 2)发现, 野生型菌株的生长区域直径大于敲除菌株; 与野生型菌株相比, *K. x-ΔmotA*、*K. x-Δmot2A*、*K. x-ΔmotAB* 分别表现出约 24%、17%和 26%的运动性降低, 说明 *motA*、*mot2A* 基因的缺失影响了 *K. xylinus* CGMCC 2955 菌株的群集运动能力。这些结

果表明 *motA* 和 *motB* 参与木葡糖酸醋杆菌的运动。

## 2.3 敲除运动相关基因的木葡糖酸醋杆菌发酵性能分析

由于 *K. xylinus* CGMCC 2955 更适合静态下产 BC, 因此在该菌中利用静态发酵生产 BC 并测定其产量, 而利用动态发酵能够更好、更便于监测运动相关基因对菌体生长的影响。我们将 *K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A*、*K. x-ΔmotAB* 和野生菌株进行静态发酵和动态发酵, 具体分析其发酵性能。由图 3 可知, 发酵的 0-72 h 为菌体生长的对数生长期, 此时发酵液中含有大量的葡萄糖, 菌体利用葡萄糖脱氢酶将大量葡萄糖转化为葡萄糖酸。由于发酵液中葡萄糖酸逐渐积累, 发酵液 pH 迅速下降, 并在 72 h 左右达到最低, 72 h 后, 由于葡萄糖含量降低, 且葡萄糖酸的累积导致发酵液过酸, 菌体生长速度略微下降, 此时菌体消耗葡萄糖的速度大于葡萄糖酸的合成速度, 发酵液 pH 开

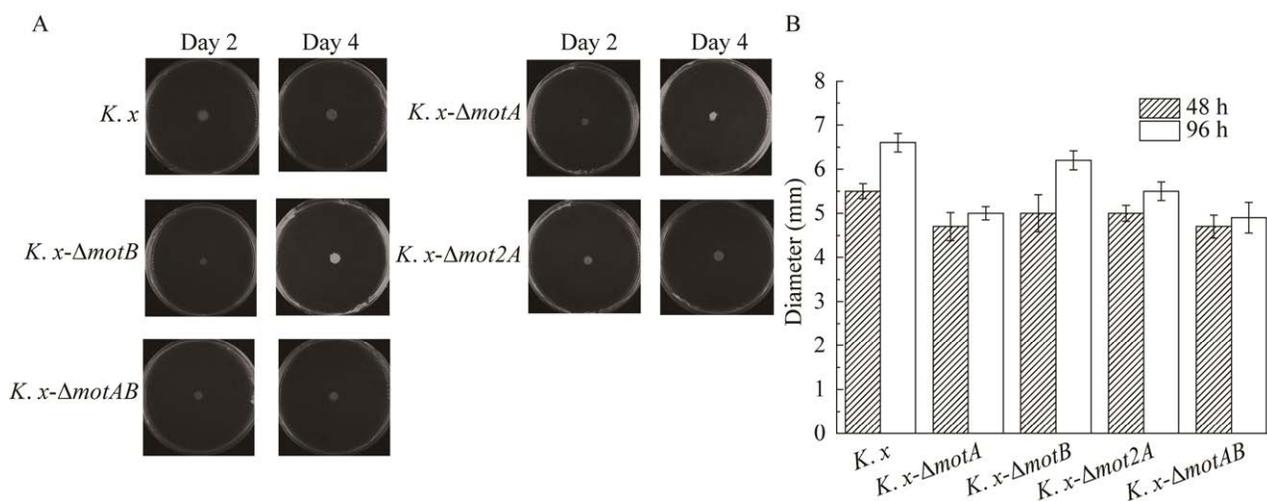


图 2 敲除菌株与对照菌的群集运动能力的测定 A: 平板上形成的菌落的实例照片. 在培养的第 2 天和第 4 天拍摄的图像. B: 测量菌落在第 2 天和第 4 天的直径(mm)

Figure 2 Determination of the swarm motility of knockout strains versus control strains. A: Example photos of colonies formed on plates. Images taken on days 2 and 4 of culture. B: The diameter (mm) of the colony was measured on day 2 and day 4.

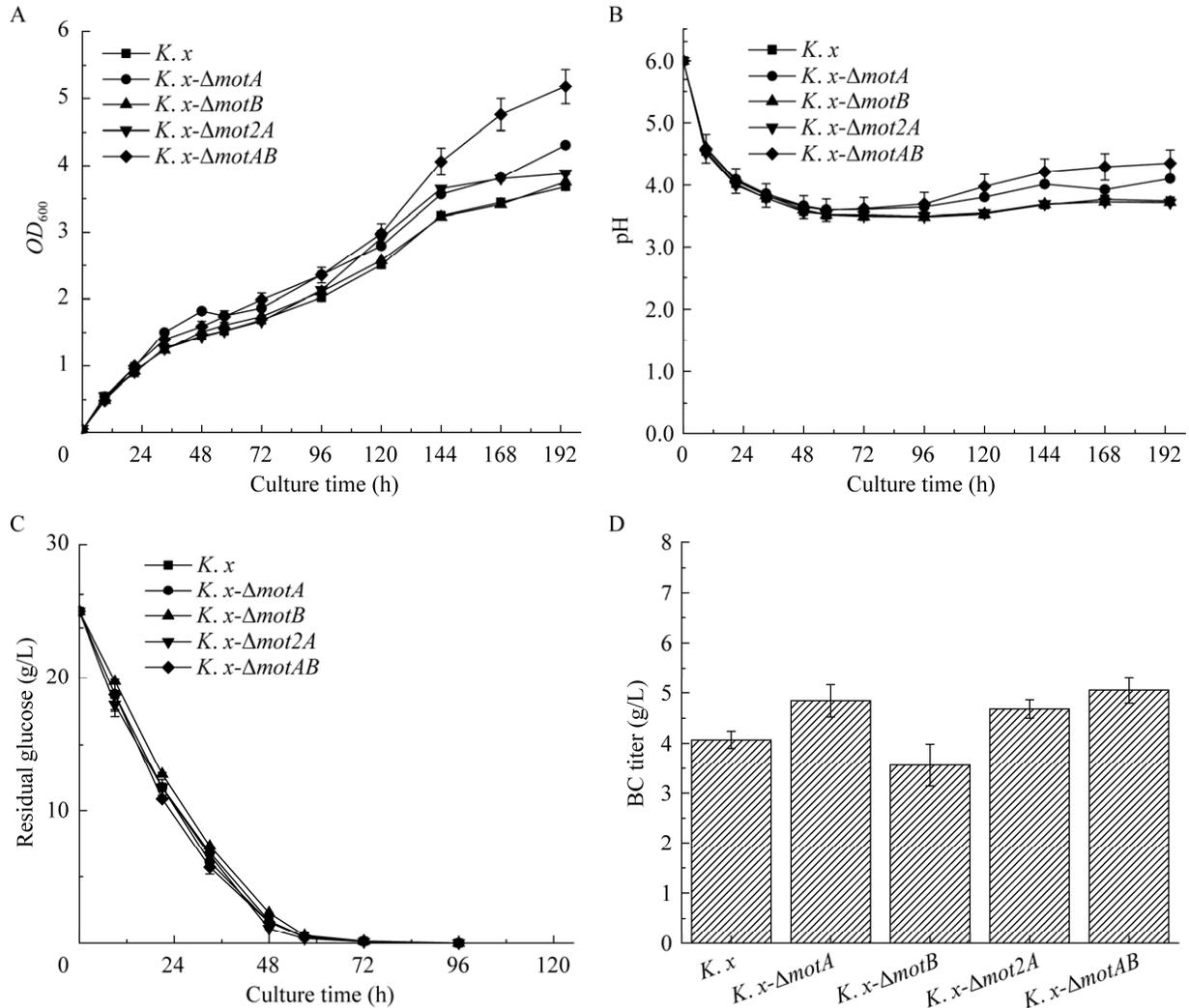


图3 振荡培养条件下敲除菌株与对照菌的发酵性能差异 A: 菌株的生长曲线. B: pH变化曲线. C: 培养基中残糖变化曲线. D: 菌株的BC产量

Figure 3 Differences in fermentation performance between knockout strains and control bacteria under oscillation culture. A: Growth curve of strains. B: pH change curve. C: Residual sugar change curve in the medium. D: BC yield of strains.

始上升, 在 144 h 后达到最高点, 并维持稳定直至发酵结束。发酵结束时, 野生型菌株的  $OD_{600}$  维持在 3.68, 而 4 株敲除菌的  $OD_{600}$  分别为 4.31、3.76、3.89、5.18, 均高于野生型菌株; *K. x* 和 *K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A* 的发酵液 pH 维持在 3.7 左右, 敲除菌 *K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotAB* 的 pH 则在 4.0–4.5 之间。并且, 与野生型菌株相比, 敲除基因 *motA*、*mot2A*、*motAB* 后, BC 产量都

得到提高, 而敲除基因 *motB* 后, BC 产量略有降低。说明运动相关基因的敲除能够影响木葡糖酸醋杆菌合成 BC 的能力。

## 2.4 BC 材料表征

### 2.4.1 傅里叶红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱(FT-IR)可用于分析 BC 的官能团及化学键性质, 分析结果如图 4 所示。3 344  $\text{cm}^{-1}$  附近出现的吸收峰是 O-H 键的伸缩

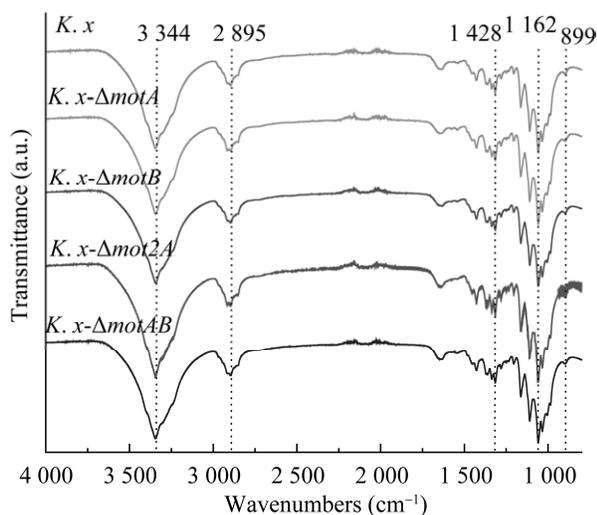


图4 菌株 *K. x*、*K. x-ΔmotA*、*K. x-ΔmotB*、*K. x-Δmot2A* 和 *K. x-ΔmotAB* 合成纤维素的红外光谱图

Figure 4 Infrared spectra of cellulose synthesized by strains *K. x*, *K. x-ΔmotA*, *K. x-ΔmotB*, *K. x-Δmot2A*, and *K. x-ΔmotAB*.

振动引起的； $2895\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是C-H键伸缩振动产生的； $1428\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰是 $\text{CH}_2$ 的对称弯曲振动引起的； $1162\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰是C-O-C不对称伸缩振动产生的； $899\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰是 $\beta$ -1,4-糖苷键的特征峰。运动相关基因敲除菌合成的BC的振动峰与野生型菌株合成的BC的振动峰相同，表明

运动相关基因的敲除并未对BC造成化学结构的改变。

#### 2.4.2 扫描电镜分析

通过SEM扫描电镜研究了敲除运动相关基因对BC三维网状结构的影响。如图5所示，敲除运动相关基因对其合成的纤维丝网状结构的影响并不是特别显著，但较大影响了BC的孔隙率。本研究通过灰度法计算了运动相关基因敲除菌株发酵所得BC的孔隙率，如图5所示，对照菌株*K. x*的孔隙率为67.27%，与之相比，*K. x-ΔmotB*所产的BC的孔隙率降低，仅为61.69%，*K. x-ΔmotA*所产的BC的孔隙率为56.14%，*K. x-Δmot2A*所产的BC的孔隙率为65.85%，*K. x-ΔmotAB*所产的BC的孔隙率为54.35%。由此证明，敲除运动相关基因降低了BC的孔隙率。

#### 2.4.3 BC的力学性能分析

将压干处理的BC样品进行拉伸测试，由测试得到的最大力、断裂伸长率和BC厚度计算其杨氏模量。由表3可知，*K. x-Δmot2A*运动敲除菌株合成的BC的杨氏模量显著提高，比野生型菌株*K. x*显著提高了59%。由此证明，运动相关基因的敲除对BC结构性能提升具有直接相关性。

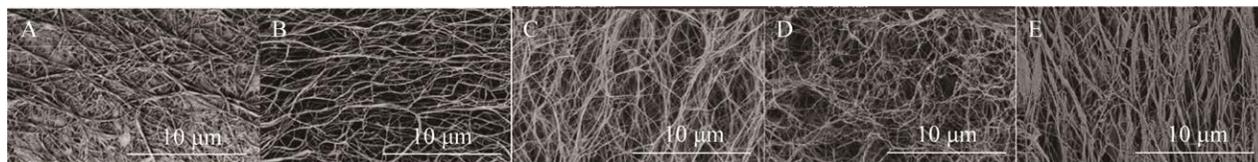


图5 运动相关基因敲除菌及野生型菌SEM电镜图 A: *K. x*来源的BC. B: *motB*敲除菌株来源的BC. C: *motA*敲除菌株来源的BC. D: *mot2A*敲除菌株来源的BC. E: *motAB*敲除菌株来源的BC

Figure 5 SEM images of exercise-related gene knockout bacteria and wild-type bacteria. A: BC from *K. xylinus* CGMCC 2955. B: BC from the *motB* knockout strain. C: BC from the *motA* knockout strain. D: BC from the *mot2A* knockout strain. E: BC from the *motAB* knockout strain.

表 3 不同菌株所合成 BC 的机械性能分析  
Table 3 Mechanical properties of BC synthesized by different strains

| Strains            | Tensile strength (MPa) | Young's modulus (GPa) |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>K. x</i>        | 105.12±1.08            | 3.96±0.43             |
| <i>K. x-ΔmotA</i>  | 212.25±4.33            | 5.77±0.28             |
| <i>K. x-ΔmotB</i>  | 169.63±3.25            | 4.54±0.31             |
| <i>K. x-Δmot2A</i> | 270.44±2.11            | 6.28±0.12             |
| <i>K. x-ΔmotAB</i> | 184.14±5.28            | 5.21±0.13             |

### 3 讨论与结论

本研究通过敲除木葡糖酸醋杆菌中运动相关基因,探究了细菌运动对 BC 合成及结构的影响。*motA*、*motB*、*mot2A* 基因的敲除导致木葡糖酸醋杆菌的运动性降低,在铜绿假单胞菌和沙门氏菌也报道过相似的结果,铜绿假单胞菌中抑制 *motA* 基因表达,对菌株的运动有抑制作用<sup>[21]</sup>;沙门氏菌的  $\Delta$ *motB* 突变体表现出极弱的泳动能力<sup>[22]</sup>。有研究表明,运动参与许多不同微生物的生物膜形成<sup>[23-24]</sup>。敲除基因 *motB* 后,BC 产量略有降低,这与 *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582<sup>[17]</sup>中的研究结果相似。而敲除基因 *motA*、*mot2A*、*motAB* 后,BC 产量都得到提高;尤其是运动能力最弱的 *K. x-ΔmotAB*,BC 产量达到 (5.05±0.26) g/L,相比野生型提高了 24%。综上所述,菌株的运动能力能够影响木葡糖酸醋杆菌合成 BC 的能力。

BC 的纤维结构、纤维密度和机械性能是影响细胞生物材料间相互作用的关键因素<sup>[25]</sup>。因此,进一步对 4 株敲除菌的 BC 结构进行表征分析,相较于野生型,敲除菌的 BC 孔隙率有不同

程度降低,双敲菌株 BC 孔隙率仅为 54.35%,比野生型降低 12.92%;这在作为伤口敷料时,对药物的渗透能力起着决定性因素<sup>[26]</sup>。生物材料机械性能的评估是医学和外科手术的关键问题,生物材料较高的机械稳定性,可以确保植入物的高可靠性<sup>[17]</sup>,而杨氏模量(E)与材料的刚度直接相关<sup>[5]</sup>,材料的杨氏模量越大,越不容易发生形变。因此将压干处理的 BC 样品进行拉伸测试,结果发现其力学性能更具优势,敲除菌杨氏模量显著提高,双敲菌最高可达 5.21 GPa,比野生型提高了 31.6%。

本研究结果证实:木葡糖酸醋杆菌中运动相关基因敲除,尤其是 *motA* 及 *motB* 双敲除可提升菌株 BC 产量,提升 BC 力学性能。本研究加深了醋酸菌中 BC 合成与运动相关性的认知,为优化 BC 合成及调控膜结构提供了理论基础。

### REFERENCES

- [1] KLEMM D, HEUBLEIN B, FINK HP, BOHN A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(22): 3358-3393.
- [2] ZHANG H, YE C, XU N, CHEN CT, CHEN X, YUAN FS, XU YH, YANG JZ, SUN DP. Reconstruction of a genome-scale metabolic network of *Komagataeibacter nataicola* RZS01 for cellulose production[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7911.
- [3] de ANDRADE ARRUDA FERNANDES I, PEDRO AC, RIBEIRO VR, BORTOLINI DG, OZAKI MSC, MACIEL GM, HAMINIUK CWI. Bacterial cellulose: from production optimization to new applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 2598-2611.
- [4] RASPOR P, GORANOVIĆ D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, 28(2): 101-124.

- [5] MONIRI M, BOROUMAND MOGHADDAM A, AZIZI S, ABDUL RAHIM R, BIN ARIFF A, ZUHAINIS SAAD W, NAVADERI M, MOHAMAD R. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering[J]. *Nanomaterials*, 2017, 7(9): 257.
- [6] LIU M, LIU LP, JIA SR, LI SQ, ZOU Y, ZHONG C. Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6266.
- [7] SVENSSON A, NICKLASSON E, HARRAH T, PANILAITIS B, KAPLAN DL, BRITTBERG M, GATENHOLM P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(4): 419-431.
- [8] CAVKA A, GUO X, TANG SJ, WINESTRAND S, JÖNSSON LJ, HONG F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 1-10.
- [9] GORGIEVA, TRČEK. Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(10): 1352.
- [10] 王学洋, 钟成, 崔吉晓, 杨颖, 胡晓慧, 辛波. 细菌纤维素/功能化石墨烯复合材料的制备及抗菌研究[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(3): 299-306.  
WANG XY, ZHONG C, CUI JX, YANG Y, HU XH, XIN B. Preparation and antimicrobial properties of bacterial cellulose/functionalized graphene composites[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(3): 299-306 (in Chinese).
- [11] 王哲, 钟成, 赵雪晴, 赵翔军, 李博. 微波辅助法制备细菌纤维素-纳米银(BC-AgNps)复合材料及其表征[J]. *生物加工过程*, 2023, 21(1): 25-31.  
WANG Z, ZHONG C, ZHAO XQ, ZHAO XJ, LI B. Preparation and characterization of bacterial cellulose-silver nanoparticles (BC-AgNps) composites[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2023, 21(1): 25-31 (in Chinese).
- [12] KHALIL AS, COLLINS JJ. Synthetic biology: applications come of age[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5): 367-379.
- [13] SINGH A, WALKER KT, LEDESMA-AMARO R, ELLIS T. Engineering bacterial cellulose by synthetic biology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9185.
- [14] HÖLSCHER T, BARTELS B, LIN YC, GALLEGOS-MONTERROSA R, PRICE-WHELAN A, KOLTER R, DIETRICH LEP, KOVÁCS ÁT. Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(23): 3695-3708.
- [15] BASU A, VADANAN SV, LIM S. A novel platform for evaluating the environmental impacts on bacterial cellulose production[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 5780.
- [16] BROWN RM Jr, WILLISON JH, RICHARDSON CL. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1976, 73(12): 4565-4569.
- [17] JACEK P, KUBIAK K, RYNGAJŁŁO M, RYTCAK P, PALUCH P, BIELECKI S. Modification of bacterial nanocellulose properties through mutation of motility related genes in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582[J]. *New Biotechnology*, 2019, 52: 60-68.
- [18] 刘伶普. 敲除葡萄糖脱氢酶和强化葡萄糖转运对细菌纤维素生物合成的影响及作用机制研究[D]. 天津: 天津科技大学博士学位论文, 2021.  
LIU LP. Effects and mechanism of knock-out of the glucose dehydrogenase and enhancement of glucose transportation for bacterial cellulose biosynthesis[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [19] DATSENKO KA, WANNER BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [20] 陈先意, 曲绍轩, 骆昕, 李辉平, 林金盛, 蒋宁, 侯

- 立娟, 马林, 刘慧芹. 生防细菌 MS82 中 GGDEF 结构域基因对生物被膜形成及运动性的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(11): 104-108.
- CHEN XY, QU SX, LUO X, LI HP, LIN JS, JIANG N, HOU LJ, MA L, LIU HQ. Effects of GGDEF domain gene in biological control bacteria MS82 on biofilm formation and motility[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(11): 104-108 (in Chinese).
- [21] 胡建娥, 夏云. 肽核酸体外抑制铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜形成的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 5.
- HU JE, X Y. Inhibitory effect of peptide nucleic acid on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *in vitro*[J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(3): 5 (in Chinese).
- [22] 宋静. 沙门氏菌的泳动机制研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2019.
- SONG J. Study on the mechanism of regulation of the mobility of *Salmonella*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [23] MERRITT PM, DANHORN T, FUQUA C. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 8005-8014.
- [24] PRATT LA, KOLTER R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 285-293.
- [25] BERTI FV, RAMBO CR, DIAS PF, PORTO LM. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix[J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(8): 4684-4691.
- [26] 张淑敏. 细菌纤维素/金属杂化纳米酶复合材料的构建及抗菌应用研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2022.
- ZHANG SM. Construction and antibacterial application of bacterial cellulose/metal hybrid nanoenzyme composite[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)