

白肛海地瓜双酶水解物的制备 及其对人皮肤细胞的生长 和胶原蛋白合成的作用

姜春芳,蔡江佳,苏秀榕*

(宁波大学海洋学院,浙江宁波 315211)

摘要:探讨双酶水解海地瓜体壁的工艺条件、水解物对人皮肤纤维母细胞的增殖和胶原合成的作用。通过单因素实验以及正交实验确定白肛海地瓜体壁双酶水解的最适宜工艺条件,超滤和冷冻干燥获得的酶解物,与人皮肤纤维母细胞(CCD-966SK)共培养来探讨其对细胞的增殖以及胶原合成的作用。结果显示:在动物蛋白酶与中性蛋白酶的质量比为3:2、液料比(v/w)为0.25:1、加酶量4%、酶解温度50℃、酶解时间4h的条件下,酶解效果最好;白肛海地瓜体壁酶解物对细胞无毒性,5ku以内的水解产物对促进 CCD-966SK 细胞胶原蛋白合成分泌的效果最为明显。结果表明,用双酶水解工艺水解白肛海地瓜体壁获得的游离总氨基酸含量高,对人皮肤纤维母细胞的增殖生长和胶原蛋白的产生具有促进作用。

关键词:白肛海地瓜,酶水解物,人皮肤纤维母细胞(CCD-966SK),胶原蛋白

Preparation of *Acaudina leucoproata* dual-enzymatic hydrolysates and influence on collagen synthesis of human dermal fibroblasts

JIANG Chun-fang, CAI Jiang-jia, SU Xiu-rong*

(Ningbo University, School of Marine Sciences, Ningbo 315211, China)

Abstract: To elucidate the zymolytic technological conditions of *Acaudina leucoproata* somatic mesoblast, and the effect of hydrolysate on the human dermal fibroblast *in vitro*, the single factor experiment and orthogonal experiment were adopted to determine the optimum conditions of the bi-enzymatic hydrolysis of *Acaudina leucoproata* somatic mesoblast, and then explore the cell proliferation and collagen production of human dermal fibroblast *in vitro* via co-culture with the samples though ultrafiltration and freeze drying into powder after enzymolysis. It showed that the optimum conditions were as follows: the ratio of animal proteinase to neutral protease in every sample was 3:2 by weight, the ratio of distilled water to *Acaudina leucoproata* was 0.25:1 (v/w), the total enzyme concentration was 4%, enzymolysis temperature was 50℃, enzymolysis time was 4h. After co-culture with CCD-966SK cells, the result of the present work implied that the samples with different ranges of molecular weight had no cytotoxicity on CCD-966SK cells, and the molecular weight range of enzymatic hydrolysates on promoting collagen synthesis and secretion most obviously were below 5ku. The results showed that hydrolysis of *Acaudina leucoproata* somatic mesoblast by two enzymes could obtain a higher degree of total amino concentration of amino acid. On the other hand, the hydrolysate could accelerate the cell proliferation and collagen production, which established a basis for operation of *Acaudina leucoproata*.

Key words: *Acaudina leucoproata*; enzymatic hydrolysates; human dermal fibroblasts (CCD-966SK); collagen protein

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)19-0180-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.19.030

收稿日期: 2014-01-13

作者简介: 姜春芳(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品质量与安全。

*通讯作者: 苏秀榕(1956-),女,博士,教授,研究方向:食品科学与工程、生物化学与分子生物学等。

白肛海地瓜也称东海海参,属于棘皮动物门,海参纲,芋参目,尻参科,海地瓜属,广泛分布于我国东部沿海,储量丰富。与日常食用的刺参相比,白肛海地瓜体壁肉质较硬,口感较差,利用率低,但就其营养成分而言,白肛海地瓜含有丰富蛋白质,几乎与刺参相当^[1],体壁富含胶原蛋白,其水解肽更具有多种

生物活性功效,同时白肛海地瓜含有一些皂苷和海参多糖^[2]。

目前对于白肛海地瓜水解物的制备方法以及评价指标,多数采用的是酶解法、可溶性氨基态氮,侯付景^[3]等以可溶性氨基态氮为指标,利用复合蛋白酶水解海地瓜,经过正交优化获得较高的氨基酸态氮。有研究表明双酶水解法比单酶水解可以获得更高的水解度^[4-5]。近年,在细胞培养模式上研究海地瓜功能的相关报道很少,本文采用双酶水解法,以游离总氨基酸含量为评价指标,通过单因素实验以及正交实验确定酶解条件,利用超滤和冷冻干燥技术,获得不同分子量的水解物干粉,研究该水解物对人类皮肤纤维母细胞(CCD-966SK)的增殖以及其细胞自身合成分泌胶原蛋白的影响,为白肛海地瓜应用于保健品、食品添加剂等方面提供参考,也为这种生物提供一种高值化利用的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白肛海地瓜活体 浙江省象山隅山岛海域;人类皮肤纤维母细胞 CCD-966SK 台湾食品工业研究所;总氨基酸试剂盒(T-AA) 中国南京建成生物工程研究所;中性蛋白酶(20 万 U/g)、动物蛋白水解酶(20 万 U/g) 中国广西庞博生物工程有限公司;MEM 细胞培养液(Minimum Essential Medium, Earle's)、胎牛血清、非必需氨基酸、丙酮酸钠 Invitrogen 公司;二甲基亚砷 Sigma 公司;WST-1(水溶性四唑盐) Abnova 公司;胶原检测试剂盒 Biocolor 公司。

水浴锅 DKS-11 中国宁波江南仪器;Minispin 小型高速离心机 德国 Eppendorf 公司;TG16-WS 台式高速离心机 中国成都市苏净科学器材有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海地瓜体壁酶解条件

1.2.1.1 单因素实验 将白肛海地瓜解剖去除内脏,清洗干净,取体壁。用绞肉机粉碎,混匀用于以下酶解实验。

采用中性蛋白酶与动物蛋白酶,酶浓度为 2%,酶比例 1:1(w/w, g/g),液料比 3:1(v/w, mL/g),酶解温度分别为 30、40、45、50、55、60 和 70℃,水解 2h,然后 100℃ 灭酶活 5min,冷却后 4500r/min 离心 20min,取上清检测游离总氨基酸含量,考察酶解温度对酶解效果的影响;在最佳酶解温度的前提下,酶浓度为 2%,酶比例 1:1,液料比 3:1,分别酶解 1、2、3、4、5h,灭活方法、离心方法同上,取上清检测游离总氨基酸含量,考察酶解时间对酶解效果的影响;在最佳酶解温度、酶解时间的前提下,酶比例 1:1、液料比 3:1,分别在酶浓度为 0.5%、1%、2%、3%、4% 下酶解,灭活方法、离心方法同上,取上清检测游离总氨基酸含量,考察酶浓度对酶解效果的影响;在最佳酶解温度、酶解时间、酶浓度的前提下,液料比 3:1,酶的比例设定 1:1、1:2、1:3、2:1、2:3、3:1、3:2,灭活方法、离心方法同上,取上清检测游离总氨基酸含量,考察酶比例对酶解效果的影响;在最佳酶解温度、酶

解时间、酶浓度、酶比例的前提下,液料比 0.125:1、0.25:1、0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,灭活方法、离心方法同上,取上清检测游离总氨基酸含量,考察液料比对酶解效果的影响。

1.2.1.2 正交实验 将单因素实验中得出的酶比例、料液比作为固定值,探讨加酶量、温度、时间这 3 个因素,按照正交实验进行酶解,并测定总氨基酸含量。实验设计中的水平及编码表见表 1。

表 1 正交实验因素水平编码表
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A 加酶量(%)	B 温度(℃)	C 时间(h)
1	2	45	3
2	3	50	4
3	4	55	5

1.2.2 超滤制备不同分子量的酶解产物 将最适条件下制备的白肛海地瓜体壁酶解液 8000r/min 离心 10min,上清液利用超滤膜(MILLIPORE, 美国)获得分子量为 1、5、10ku 的样品^[6-7]。

1.2.3 细胞功能实验

1.2.3.1 细胞的增殖 细胞培养:将人类皮肤纤维母细胞 CCD-966SK,以 MEM 培养基(其中含 10% FBS、1% 青-链霉素、1% 非必需氨基酸以及 1% 丙酮酸钠)在 5% CO₂、37℃ 条件下培养,每 2~3d 换液^[8-9]。

对细胞增殖的作用:按照每孔 1 × 10⁴ 个 CCD-966SK 细胞接种于 96 孔板,并加入样品(以含 10% 胎牛血清的 MEM 全培养液配制),每孔总体积 100μL。48h 后,每孔加 8μL 的水溶性四唑盐 WST-1,2h 后于 450nm 处测吸光值,并计算细胞相对存活率:

细胞相对存活率(%) = (A_{样品} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) × 100

1.2.3.2 胶原蛋白的合成 胶原蛋白的含量采用胶原蛋白检测试剂盒^[10-11](Sircol Collagen assay)测定。取 20μL 细胞的上清培养液(以相同量的培养液作为对照组),依次加入 20μL 的 0.5mol/L 的醋酸以及 100μL 的染色液于 1.5mL 的离心管中,室温下混合反应 30min。以 15000r/min、4℃ 离心 20min 后,去除上清液。再加入 100μL 的碱试剂,振荡 1min 左右使沉淀完全溶解。取 100μL 于 540nm 处测吸光值。将标准蛋白依次稀释成 0、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5mg/mL 的浓度,方法同上,制作标准曲线。

取 96 孔板,每孔接入 6 × 10⁴ 个 CCD-966SK 细胞,并加入不同浓度的酶水解物样品(以不含胎牛血清的 MEM 培养液配制),每孔总体积 120μL(不含胎牛血清)。72h 测胶原蛋白含量。

取 24 孔板,每孔接入 6 × 10⁴ 个/mL 的 CCD-966SK 细胞,并加入浓度为 10mg/mL 和 0.1mg/mL 的样品(以无 FBS 的 MEM 培养液配制),每孔总体积 1mL(不含胎牛血清)。空白组为不加胎牛血清的 MEM 培养液,对照组为含细胞的不加胎牛血清的 MEM 培养液。分别测定第 0d、第 2d、第 4d、第 8d、第 12d 的胶原蛋白浓度。

1.3 数据分析方法

数据采用 SAS 软件 (One-way ANOVA)、GraphPad Prism 5 分析并绘制成图。

2 结果与讨论

2.1 酶解温度对酶解效果的影响

图 1a 结果显示,随着温度的升高,游离总氨基酸含量逐渐升高,50℃时达到最大值,然后随着温度的升高,游离氨基酸含量逐渐减少,至 60℃ 时,趋于平缓,这是因为过高的温度会使蛋白酶分子结构发生改变,酶活力降低或使酶失活。因此最适宜酶解温度选择 50℃。

2.2 酶解时间对酶解效果的影响

如图 1b 结果显示,随着酶解时间的延长,酶解液中的游离总氨基酸含量持续增加,但在 4h 时增加减缓趋势,所测定的游离总氨基酸含量与 5h 时基本持平,曲线趋于平缓,而两个时间段相差 1h,出于时间因素考虑,选择 4h 为最适宜酶解时间。

2.3 酶浓度对酶解效果的影响

如图 1c 所示,总酶浓度在 0.5% 到 2% 时,酶解液中的游离总氨基酸含量持续增加,之后开始出现减缓趋势,3% 与 4% 时的游离总氨基酸含量基本持平,基于成本因素考虑,选择酶浓度为 3%。

2.4 酶的比例对酶解效果的影响

研究结果如图 1d。动物蛋白酶与中性蛋白酶的质量比为 1:3 时的游离总氨基酸含量最少,而在 3:2 时的酶解液游离总氨基酸含量最高,平均 249.649 μmol/mL。两者的数据差异明显,一方面可能是由于动物蛋白酶可以特异性水解的肽键在白肛海地瓜内含量较多,使得动物蛋白酶可以水解较多的底物,而相对的中性蛋白酶可以特异性水解的肽键较少,这使得当动物蛋白酶与中性蛋白酶的酶比例最小为 1:3 时,所得的酶解效果最差;另一方面,游离氨基酸含量是最终两种酶共同作用于底物的结果,其中的酶解机制复杂,酶比例为 3:2 时恰恰使两种酶作用下获得最佳水解效果,相比之下,酶比例为 1:3 时的酶解效果最差。因此选择含量最高的 3:2 作为动物蛋白酶与中性蛋白酶的质量比。

2.5 液料比对酶解效果的影响

结果见图 1e 所示,游离总氨基酸含量随着液料比的增加逐渐提高,而水与海地瓜的比例为 0.25:1 时游离氨基酸总量要显著高于其他 7 组,随后随着液料比的增加,游离氨基酸含量逐渐降低,其中 5:1 组含量最少,这可能是由于加水量过多和过少易使酶与海地瓜碎块接触的面积减少,使酶解不彻底^[4]。因此最适宜液料比选择 0.25:1。

2.6 正交实验优化设计结果

基于上述单因素实验结果,在动物蛋白酶与中性蛋白酶的质量比为 3:2,液料比为 0.25:1 的条件下,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计探讨温度、时间、加酶量对游离总氨基酸含量的影响,以确定最适宜酶解反应条件。从表 2 中可以看出,极差 R 以温度最高,因此三个因素中酶解温度对样品产生游离总氨基酸

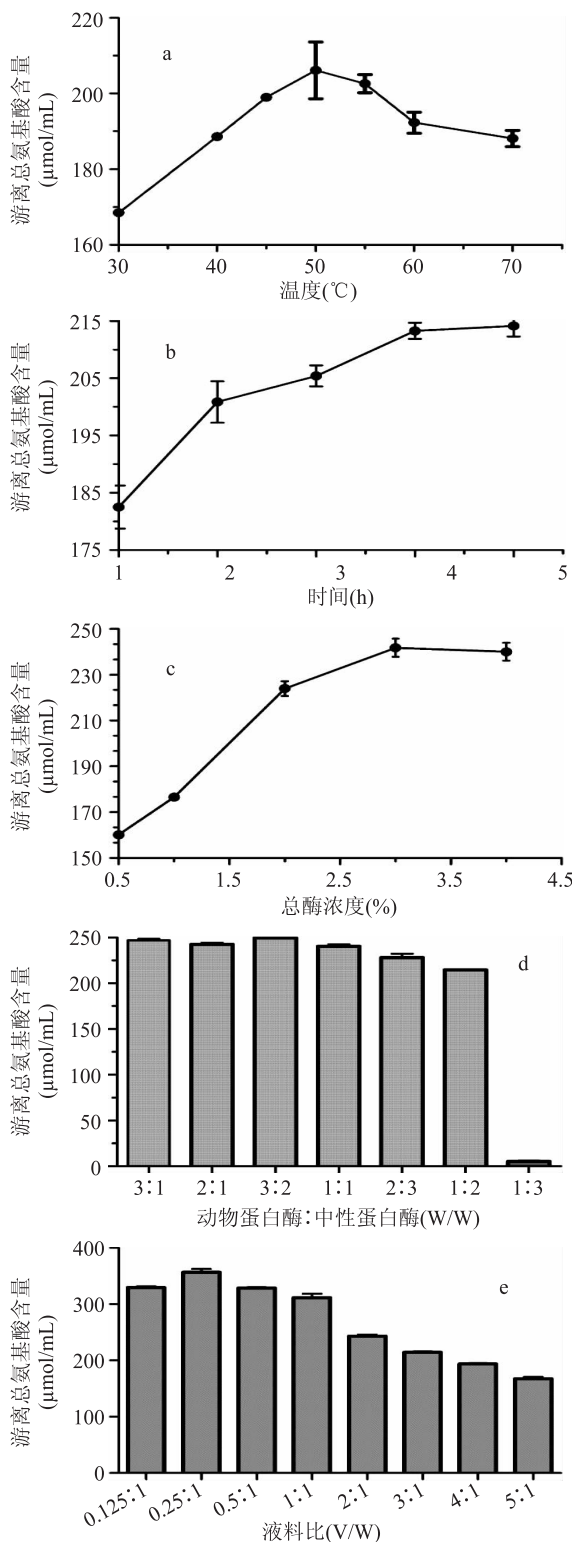


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of single-factor experiments

的影响最大,其次是加酶量、酶解时间。正交表中得出的最适宜酶解条件为 $A_3B_2C_2$,即加酶量 4%、温度 50℃、时间 4h,与单因素实验分析结果基本一致。

2.7 超滤结果

在最适条件下制备白肛海地瓜体壁酶水解物,利用超滤截留小于 1、5、10ku 的多肽,再加上未用超滤处理的酶解液原液,总共 4 个样本,依次标为 CP1、CP2、CP3、CP4,并将这 4 个样本冷冻干燥获得干粉。

表2 正交实验表分析结果
Table 2 Results of orthogonal experiment

序列	A	B	C	游离总氨基酸 含量(μmol/mL)
1	1	1	1	322.3757
2	1	2	2	355.2426
3	1	3	3	318.0051
4	2	1	2	340.9071
5	2	2	3	373.774
6	2	3	1	345.4525
7	3	1	3	340.7322
8	3	2	1	370.802
9	3	3	2	351.0468
k ₁	331.8745	334.6717	346.2101	
k ₂	353.3779	366.6062	349.0655	
k ₃	354.1937	338.1681	344.1704	
R	22.3192	31.9345	4.8951	
最佳	A ₃ 4%	B ₂ 50℃	C ₂ 4h	

2.8 对 CCD-966SK 细胞增殖的影响

由图2可以看出,在细胞接种量为 1×10^4 个/孔、共培养 48h 的条件下,除了浓度为 1mg/mL 的样品 CP4 在相对存活率上没有显示出增殖的效果外,其他样品均显示出促进 CCD-966SK 细胞增殖的能力。其中添加了 0.1mg/mL CP3 的实验组,它的相对存活率(156.232%)显著高于其他组。而在高浓度 1mg/mL 时,CP1、CP2、CP3、CP4 均显示出较低的细胞相对存活率。可能由于加入高浓度的样品使细胞的渗透压发生改变,从而在一定程度上抑制了细胞的增殖,CP4 又是未用超滤处理的酶解产物原液,所含的大分子物质较多,也使浓度为 1mg/mL 时的 CP4 样品组呈现出抑制细胞增殖的现象。周怡昆^[12]等对外周神经雪旺细胞的研究发现短期高糖可通过高渗透压抑制 RSC96 雪旺细胞的增殖。有研究显示一些水解物在一定条件下可提高细胞活力,促进细胞增殖。Kwon^[13]等将含大豆蛋白水解物的无血清培养基培养家蚕细胞,结果表明含 0.5% 水解物的无血清培养基可使家蚕细胞的密度提高至 1.1×10^7 细胞/mL。

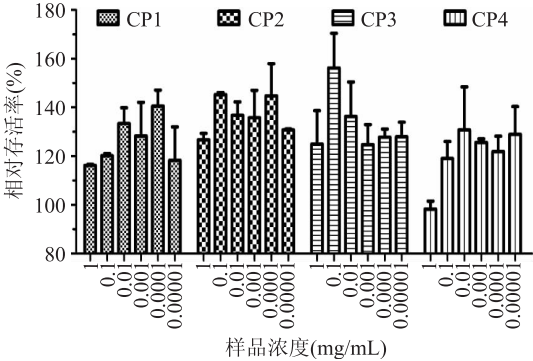


图2 白肛海地瓜酶水解物对 CCD-966SK 的增殖作用
Fig.2 Effects of *A.leucoproata* enzymatic hydrolysates on proliferation function of CCD-966SK

2.9 促进 CCD-966SK 细胞合成胶原蛋白

皮肤组织中的胶原蛋白是维持皮肤弹性的主要

因子之一,同时也主导细胞与细胞间黏着、细胞增殖及分化。皮肤纤维母细胞具有分泌胶原蛋白及胞外基质以维持皮肤弹性的功能,并且可分泌胶原蛋白至胞外,在此基础上,可研究皮肤细胞胶原蛋白的合成情况。

传统的培养基通常含有血清,可以为细胞提供多种营养物质,促进细胞的生长,还可保护细胞使其免受一些损伤,但也有一些缺点,如批次间差异大、成分不明确等,在某些程度上加大了实验的误差。本研究中的胶原蛋白实验采用无血清培养基,排除了血清对细胞合成胶原蛋白的影响,也更加体现出白肛海地瓜酶水解物对于促进 CCD-966SK 细胞合成胶原蛋白的作用。

图3中的直线图为胶原蛋白标准曲线, $y = 1.5683x + 0.0592$, $R^2 = 0.9915$,柱状图显示了不同浓度的白肛海地瓜酶水解物对 CCD-966SK 细胞合成胶原蛋白的情况。图3表明在细胞浓度为 6×10^4 个/孔,培养 72h 后,酶水解物明显促进了 CCD-966SK 细胞合成胶原蛋白,浓度为 1mg/mL 和 0.01mg/mL 的组中所测得的胶原含量相对较高,其中尤其以加了 1mg/mL CP2 组的胶原量最为明显,与空白组相比差异显著。穆源浦^[14]等研究一种深海鱼类中精制提炼的鱼蛋白提取物对人体皮肤水分、油分的调节作用,结果显示该提取物具有保持皮肤水分作用,可在一定程度上改善人体的皮肤状况。由图4可以得出,在第8d,实验组表现出明显的促进作用,各组细胞培养上清液中的胶原蛋白含量要显著高于其他时间组。在 CP1、CP2、CP3、CP4 四个样品中,无

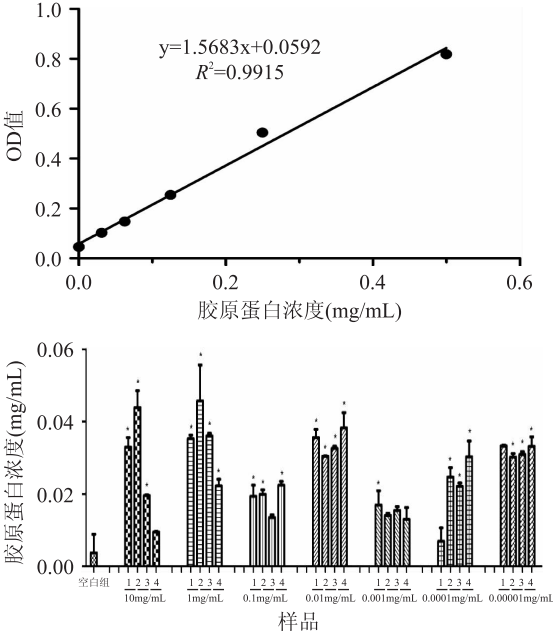


图3 不同浓度的白肛海地瓜酶水解物对 CCD-966SK 细胞合成胶原蛋白的影响

Fig.3 Effects of different concentration of *A.leucoproata* enzymatic hydrolysates on stimulating collagen protein synthesis of CCD-966SK cells
注:1、2、3、4 分别代表酶水解液样品 CP1、CP2、CP3、CP4;
*:与空白组比较有显著性差异($p < 0.05$)。

论是浓度 1mg/mL 还是 0.01mg/mL, CP4 所测得的胶原蛋白含量与其他组相比都是最少的, 其次是 CP3, 而加了 CP2 组的胶原量最高。因此, 相对其他分子量范围而言, 在 5ku 以内的水解产物对 CCD-966SK 细胞胶原蛋白合成分泌的影响最大。

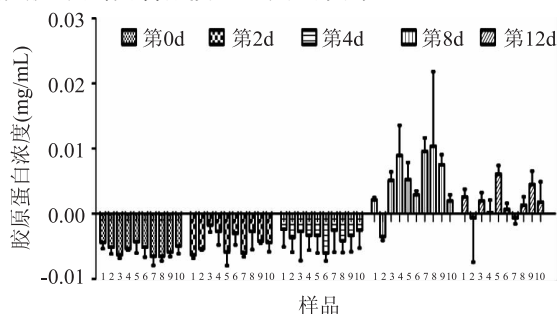


图4 白肛海地瓜酶水解物对 CCD-966SK 细胞胶原蛋白合成的影响

Fig.4 Effects of *A.leucoproata* enzymatic hydrolysates on stimulating collagen protein synthesis of CCD-966SK cells
注, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 分别代表空白组、对照组、1mg/mL 的 CP1、1mg/mL 的 CP2、1mg/mL 的 CP3、1mg/mL 的 CP4、0.01mg/mL 的 CP1、0.01mg/mL 的 CP2、0.01mg/mL 的 CP3、0.01mg/mL 的 CP4。

3 结论

通过单因素实验及正交实验, 确定在动物蛋白酶与中性蛋白酶的质量比为 3:2、液料比(水:海地瓜碎块)为 0.25:1 的条件下, 双酶水解海地瓜体壁碎块的最适宜工艺条件为: 加酶量 4%、酶解温度 50℃、酶解时间 4h。将在此最适宜工艺条件下制成的酶解液制成不同分子量范围的粉末状水解物, 这些水解产物对 CCD-966SK 细胞无毒性, 均可在一定浓度范围内促进细胞增殖、增加胶原蛋白的合成, 同时, 相对其他分子量范围而言, 在 5ku 以内的粉末状水解产物对 CCD-966SK 细胞胶原蛋白合成分泌的影响最大。白肛海地瓜水解物的制备工艺简单, 原料价格低廉, 在食品相关领域具有一定的开发前景。

参考文献

[1] 徐彩云, 苏秀榕, 李妍妍, 等. 海地瓜的营养成分及其降血脂功能[J]. 营养学报, 2009, 31(4): 384-387.

(上接第 179 页)

为代表的酶活力处于较高水平。在生产中, 可考虑实施恒底物浓度补料, 甚至在维持底物浓度处于恒定条件下, 进行连续化操作。

参考文献

[1] 傅亮, 易九龙, 陈思谦, 等. 木醋杆菌分批补料发酵法生产广式米醋[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 202-204.
[2] 徐莹. 发酵食品学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2010: 142.
[3] 傅亮, 陈思谦, 易九龙, 等. 细菌纤维素膜对木醋杆菌发酵生产广式米醋的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 123-125.

[2] 蔡彬新, 吴成业, 刘淑集. 海地瓜多糖提取条件的优化和脱蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 194-196.

[3] 侯付景, 苏秀榕, 李妍妍, 等. 海地瓜的酶水解液的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2009, 31(7): 181-184.

[4] 王霞, 苏秀榕, 丁进锋, 等. 响应面法优化双酶水解黄鳍金枪鱼胰脏的工艺研究[J]. 现代食品科, 2010, 26(11): 1229-1233.

[5] 洪鹏志, 杨萍, 曾少葵, 等. 黄鳍金枪鱼头蛋白酶解条件的研究[J]. 食品科技, 2007(3): 100-103.

[6] 李锦生, 傅晓琴, 李冰, 等. 功能性生物活性物质超滤分离纯化技术的研究现状与进展[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 174-179.

[7] 宋永相, 孙溢, 王跃军, 等. 海洋活性胶原肽的抗氧化性及对酪氨酸酶的抑制作用初步分离研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 7-13.

[8] Schneider L A, Dissemond J, Brenneisen P, et al. Adaptive cellular protection against UVA-1-induced lipid peroxidation in human dermal fibroblasts shows donor-to-donor variability and is glutathione dependent[J]. Archives of Dermatological Research, 2006, 297: 324-328.

[9] Molinari J, Ruszova E, Velebny V, et al. Effect of advanced glycation endproducts on gene expression profiles of human dermal fibroblast[J]. Biogerontology, 2008, 9: 177-182.

[10] Rodríguez-Rodríguez P, Arribas S M, López de Pablo A L, et al. A simple dot-blot-Sirius red-based assay for collagen quantification[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405: 6863-6871.

[11] Abreu E L, Arribas S M, Murray M M. Storage conditions do not have detrimental effect on allograft collagen or scaffold performance[J]. Cell and Tissue Banking, 2009, 10: 333-340.

[12] 周怡昆, 薛耀明. 高糖通过高渗透压改变 PAX3 基因表达抑制 RSC96 雪旺细胞增殖[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2013, 38(4): 60-64.

[13] Kwon M S, Dojima T, Park E Y. Use of plant-derived protein hydrolysates for enhancing growth of Bombyx mori (silkworm) insect cells in suspension culture[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2005, 42(1): 1-7.

[14] 穆源浦, 李晓瑜, 包大跃. 鱼蛋白对皮肤水份、油份的调节作用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(3): 6-8.

[4] 傅亮, 易九龙, 陈思谦, 等. 传统广式米醋中醋酸菌的分离与鉴定[J]. 中国调味品, 2012, 37(6): 57-60.

[5] Willis A. Wood: Methods in Enzymology[M]. Washington, D C: Academic Press, 1982: 450-451.

[6] 何川, 章登正, 张俊, 等. 重铬酸钾-DNS 比色法测定发酵液中乙醇含量[J]. 生命科学研究, 2013, 17(1): 1-4.

[7] 马霞, 贾士儒, 关凤梅, 等. 有机酸对木醋杆菌合成细菌纤维素的影响规律[J]. 纤维素科学与技术, 2003, 11(1): 34-37.

[8] Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55(1): 35-39.