



## 细菌纤维素合酶的基本特性及作用机理

张凯仁<sup>#</sup>, 李任杰<sup>#</sup>, 柯晶滢, 李骏卓, 孙世静<sup>\*</sup>

南京林业大学材料科学与工程学院, 江苏 南京 210037

张凯仁, 李任杰, 柯晶滢, 李骏卓, 孙世静. 细菌纤维素合酶的基本特性及作用机理[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2194-2208.  
ZHANG Kairen, LI Renjie, KE Jingying, LI Junzhuo, SUN Shijing. Basic characteristics and catalysis mechanism of bacterial cellulose synthase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2194-2208.

**摘要:** 细菌纤维素是一种天然的生物质高分子聚合物。相较于植物纤维素, 其具有更高的纯度和优异的力学性能。有望作为一种绿色的新型高分子材料被广泛应用。细菌纤维素合酶作为合成细菌纤维素的关键酶, 其主导细菌纤维素的合成过程。因此, 对其合成机理的探索有助于实现细菌纤维素大量生产和广泛应用。本文从细菌纤维素合酶的基本特性出发, 综述了菌种筛选、提升产量和合酶的细胞定位等内容; 围绕纤维素合酶的作用机理阐述了体外合成方法的影响因素, 以及利用该方法探究各亚基相关作用的现状。以此探究细菌纤维素合酶的合成机制, 并提出了当前研究中存在的问题。同时, 展望了该领域未来的研究方向, 以期通过对合成机理的探讨为细菌纤维素的大规模应用提供理论基础。

**关键词:** 细菌纤维素; 纤维素合酶; 合成机理; 亚基结构

## Basic characteristics and catalysis mechanism of bacterial cellulose synthase

ZHANG Kairen<sup>#</sup>, LI Renjie<sup>#</sup>, KE Jingying, LI Junzhuo, SUN Shijing<sup>\*</sup>

School of Materials Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

**Abstract:** Bacterial cellulose, a natural biopolymer with higher purity and better mechanical properties than plant cellulose, is expected to be widely used as a new green polymer material.

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20210610); 中国博士后科学基金(2019M661857); 江苏省博士后科研资助计划(2019K073)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210610), the China Postdoctoral Science Foundation (2019M661857), and the Postdoctoral Science Foundation Program of Jiangsu Province (2019K073).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: sunsj@njfu.edu.cn

Received: 2023-11-02; Accepted: 2024-04-07; Published online: 2024-04-10

A variety of bacteria have now been proven to have the ability to produce cellulose, in which bacterial cellulose synthase plays a crucial role. Therefore, understanding the catalysis mechanism of bacterial cellulose synthase is a key to the mass production and broad utilization of bacterial cellulose. This paper reviews the basic properties of bacterial cellulose synthase, including the screening of strains, the enhancement of yield, and the cellular localization of the synthase, aiming to promote the research on the catalysis mechanism of cellulose synthase. Further, based on the mechanism of cellulose synthase, this paper detail the influencing factors of *in vitro* synthesis and review the research progress in the roles of each subunit of this synthesis method. We explore the catalysis mechanism of bacterial cellulose synthase, point out the problems in the current research, and envision the future research directions in this field, with a view to providing a theoretical basis for the large-scale application of bacterial cellulose by deciphering the synthesis mechanism.

**Keywords:** bacterial cellulose; cellulose synthase; synthesis mechanism; subunit structure

纤维素是地球上最丰富的生物聚合物<sup>[1-2]</sup>。天然纤维素主要来源于植物,同时也有少量细菌能够产生纤维素<sup>[3]</sup>。细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)是一种由微生物生产的纳米级胞外多糖<sup>[4]</sup>。相较于植物纤维素,细菌纤维素不含其他植物细胞壁成分,如木质素、半纤维素等,因此具有更高的纯度<sup>[5]</sup>。同时,细菌纤维素具有结晶度高、拉伸强度高、弹性模量大等优点<sup>[6]</sup>,在复合材料制备方面也表现出优良性能<sup>[7-8]</sup>。另外,由于细菌纤维素具有高生物相容性<sup>[9]</sup>,并能够促进伤口愈合<sup>[10]</sup>,在生物医疗领域<sup>[11]</sup>同样具有重要的研究价值。不仅如此,因为细菌生长周期短、繁殖速度快,所以合成纤维素的效率也较高<sup>[12-13]</sup>,在食品、纺织等行业也具有潜在应用价值<sup>[14]</sup>。综上所述,细菌纤维素是一种性能优良的天然有机高分子材料,具有广阔的应用前景<sup>[15-16]</sup>。然而,受制于细菌合成过程难以操控、合成成本高、环境要求严格等因素,目前细菌纤维素难以实现大规模生产<sup>[3,17]</sup>。因此,理解细菌纤维素合成机制对于实现细菌纤维素的大规模合成和应用具有重要的意义<sup>[18]</sup>。

探究纤维素合酶的作用机制是解析细菌纤维素合成机制的关键。然而,现有研究尚不能完

全解析合酶各亚基的功能,以及它们之间的相互作用关系等。因此,本文综述了近年来关于细菌纤维素合酶(bacterial cellulose synthase, Bcs)基本特性与其作用机理的研究。首先,从合成菌种筛选、产量提高方法以及合酶位置 3 个方面总结了细菌纤维素合酶的基本特性。随后,总结了通过体外合成的方法解析合酶作用机制与相互作用关系的进展。通过对目前研究的综述与归纳,为未来深入探讨细菌纤维素合成机制提供必要的基础和知识储备。

## 1 细菌纤维素合酶的基本特性

为探究细菌纤维素合酶的合成机理,需要首先了解该类酶的基本特性。除了解基础信息外,对纤维素合酶基本特性的研究还包括筛选携带该酶的菌种、寻找提高细菌纤维素产量的方法、探索该酶在细胞中的存在位置等。

### 1.1 细菌纤维素合酶的基本特征

细菌纤维素合酶是细菌纤维素合成过程的众多酶组分中作用最为关键的一种特征酶<sup>[19]</sup>。自 1886 年 Brown 首次观察到部分细菌可有效合成纤维素以来<sup>[20]</sup>,对细菌纤维素的研究从未间断。截至目前,研究者围绕细菌纤维素的形态

表征、性能优化和合成应用等方面开展了大量研究<sup>[21-22]</sup>。其中,对合成机制的探究可分为宏观形貌和微观分子 2 个层面。在宏观层面,研究人员在细菌纤维素原纤丝末端细胞膜上发现了排列成直线<sup>[23]</sup>的蛋白颗粒阵列,这被称为终端复合体(*terminal complexes, TCs*),也称纤维素合酶复合体(*cellulose synthase complex, CSC*)<sup>[24]</sup>。CSC 在细菌纤维素的合成过程中发挥重要作用,催化纤维素分子链的形成并使其分泌至细胞外膜<sup>[25]</sup>。在微观层面,分子生物学相关研究表明,CSC 由多种纤维素合酶(*cellulose synthase, Ces*)亚基构成,在细菌中被称为细菌纤维素合酶亚基<sup>[26]</sup>。

细菌纤维素的合成有赖于以该酶为主构成的复合体合成系统。目前,研究最深入的细菌纤维素合成系统是 1991 年 Mayer 等<sup>[27]</sup>提出的环二鸟苷酸 (*cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP*) 系统,该系统基本阐明了细菌纤维素合酶的位置关系和作用机制,并将细菌纤维素的生物合成分为 4 个密切连续步骤:聚合、分泌、组装和结晶<sup>[28]</sup>,在该系统中,碳源底物首先在细胞内经系列酶学转化成为纤维素合成的单元底物尿苷二磷酸葡萄糖 (*uridine diphospho-glucose, UDP-Glc*),该单元底物的合成和降解分别受二鸟苷酸环化酶(*diguanylate cyclase, DGC*)和磷酸二酯酶(*phosphodiesterase, PDE*)影响,未在变构位点上结合 c-di-GMP 的合酶将不具有活性,即 c-di-GMP 起着活化纤维素合酶的关键作用。Morgan 等<sup>[29]</sup>在研究 c-di-GMP 激活细菌纤维素合酶的机理的过程中提出,c-di-GMP 可以改变门控环构象,打开 BcsA 上的活性点位,从而使底物更容易与 BcsA 接触并发生聚合。后续 Liu 等<sup>[30]</sup>对木糖驹形氏杆菌 (*Komagataeibacter xylinus*) 的基因组分析进一步解释了合成过程,c-di-GMP 通过 *GinI/GinR* 基因的群体感应 (*quorum sensing, QS*) 系统调控

BcsA-BcsB 亚基的激活机制,并通过 QS 系统抑制木糖驹形氏杆菌氧化发酵的作用。虽然细菌纤维素合成中的酶学调控过程尚未完全解析,但这一系统至今仍在不断完善。

在自然界中,这类以纤维素合酶为主的复合体合成系统存在于多种微生物中,探究这些微生物中纤维素的合成过程是进一步认识纤维素合酶基础特性的重要方法。

## 1.2 细菌纤维素的合成菌种筛选及产量提高方法

探究能稳定生产细菌纤维素的微生物,是对细菌纤维素合酶研究的原始出发点<sup>[31]</sup>。目前多个菌属都被证实可以稳定产生细菌纤维素,如醋杆菌属 (*Acetobacter*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、气杆菌属 (*Aerobacter*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、八叠球菌属 (*Sarcina*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等 18 个属<sup>[32-33]</sup>。

这些已被确认具有生产纤维素能力的菌属中,醋杆菌具有更为突出的纤维素生产效率,因此围绕醋杆菌属的研究较为深入。随着分类学研究的不断深入,许多菌株经历了重新命名和分类,例如,1997 年 Yamada 等将醋杆菌属部分菌种(典型菌种 *Acetobacter xylinus*) 分离出来并升级为同科的葡糖醋杆菌属 (*Gluconacetobacter*)<sup>[34]</sup>,以及 2013 年从葡糖醋酸杆菌属中进一步分离并建立的驹形氏杆菌属 (*Komagataeibacter*)<sup>[35]</sup>,对这些属的研究也在不断深化。Aydin 等<sup>[36]</sup>筛选了醋杆菌科的典型生态位以分离具有纤维素合成功能的菌属,他们使用 Hestrin-Schramm (HS) 培养基对该菌科进行培养,发现 300 余种被筛菌中只有 9 种能在培养液表面形成生物膜,所筛选的各纤维素合成菌在生化特性上表现为氧化酶阴性、过氧化氢酶阳性,符合驹形氏杆菌属特征;探究该 9 种菌株中产量最高的分离株 P2A 的 16S

rRNA 基因序列, 得出其与汉森氏驹形氏杆菌 (*Komagataeibacter hansenii*) NBRC 14820 相似性为 99.8%, 推测所筛选菌种为相应亚种, 命名为汉森氏驹形氏杆菌 P2A, 该研究为后续纤维素合成菌种筛选提供了一个高效可行的方法。Nie 等<sup>[37]</sup>对比各醋杆菌的发酵过程与所得细菌纤维素生产动力学发现, 经葡萄糖淀粉酶处理的醋杆菌往往有着更高的细菌纤维素产量、产率, 这可能为细菌纤维素的高效生产提供了一种新思路。

目前, 各菌属中能稳定生产纤维素的新菌种仍在不断被发现, 如巴氏醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) MGC-N8819、木糖驹形氏杆菌 (*Komagataeibacter xylinus*) LKN6 等<sup>[38]</sup>。

增大细菌纤维素产量是工业生产研究的重点, 不仅有助于纤维素合酶合成机理的探究, 也是细菌纤维素的大量合成及广泛应用的基础。de Wulf 等<sup>[39]</sup>采用紫外诱变木糖驹形氏杆菌, 通过限制细菌中酮葡萄糖酸盐合成, 从而使更多碳源用于细菌纤维素的合成, 结果显示该菌的纤维素合成产量达到原本的 183%, 取得了较高水平的增长。Bac 等<sup>[40]</sup>构建了破坏 *DGCI* 基因的木糖驹形氏杆菌突变体, 该突变菌株在 5 L 罐式发酵罐中有氧搅拌条件下纤维素产量较野生木糖驹形氏杆菌增加了 36%, 而证明该纤维素合成菌突变体宜在有氧条件培养。Wu 等<sup>[41]</sup>利用高静水压处理诱导木糖驹形氏杆菌构建突变体, 同样提高了细菌纤维素的产量, 但未能解析突变机理。Lu 等<sup>[42]</sup>通过分析驹形氏杆菌属的全基因组, 确定甘油更适合作为该菌属碳源, 使单一碳源下的细菌纤维素产量大幅提高。这些研究均有助于提高细菌纤维素的合成产量。

以上宏观层面对于细菌纤维素合成的研究不仅为其大规模应用提供了有效方法, 也为我们理解细菌纤维素合酶在纤维素合成中的作用奠定了基础。然而, 若要更深入地探究细菌纤维素

合酶的作用机制, 需从微观层面探索其在细菌中的存在形式以及位置信息等, 此类研究对于解析纤维素合酶的具体作用机制至关重要。

### 1.3 细菌纤维素合酶的细胞定位

在 1987 年之前, 人们普遍认为细菌纤维素合酶存在于细胞外膜<sup>[43-45]</sup>。直到 Bureau 等<sup>[46]</sup>发现具有活性的纤维素合酶主要位于细胞质膜上, 在这项研究中研究者利用溶菌酶和胰蛋白酶降解木糖驹形氏杆菌的细胞质膜与外膜之间的连接层, 根据膜上蔗糖密度不同, 用超离心法分离粗膜, 最终检测细胞质膜和外膜上引入的标记物, 确定了纤维素合酶主要存在于细胞质膜上; 通过酶解、甲基化分析以及气相色谱等对产物定性, 并利用凝胶过滤色谱法测定其聚合度, 经 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析表明体外产物是纤维素 II。该研究不仅提出了纤维素合酶的存在部位, 同时提出, 在体外合成纯化过程中, 葡萄糖链聚集可能被破坏, 使其有可能进行反向平行结晶, 即形成 II 型纤维素, 为后续研究提供了改进的方向。

21 世纪初, 一系列基于冷冻断裂技术以及电子显微镜技术的精细结构研究, 使 CSC 的结构与细胞定位进一步明确。CSC 在细胞中被具体定位到 TCs, TCs 中除包含纤维素合酶外, 还有多种其他蛋白质<sup>[47]</sup>, 该复合体沿木糖驹形氏杆菌细胞的纵轴存在, 而且蛋白间具有多种排列方式<sup>[23]</sup>。不同于植物、藻类等生物体中的纤维素合成 TCs, 细菌的 TCs 由纤维素合酶亚基组成, 固定在膜上并穿过细胞膜、周质空间和外膜。2001 年, Kimura 等<sup>[24]</sup>通过十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-冷冻断裂标记法在 TCs 中直接定位特定亚基, 首先确定了 BcsB 在细胞中的存在, 该研究为后续亚基定位相关研究提供了有效方法。Sunagawa 等<sup>[48]</sup>研究表明, 除纤维素合酶外, 纤维素合成的 TCs 中含有的

纤维素互补因子(cellulose complementing factor, Ccp)同样参与合成细菌纤维素,并证实 BcsD 和 Ccp 位于膜上的 TCs 中。此后, Sun 等<sup>[49]</sup>同时使用溶酶菌和洗涤剂剥离木糖驹形氏杆菌的细胞膜,使目的蛋白暴露并采用荧光抗体标记后,在原同属醋杆菌属的 ATCC 53524、ATCC 53264、JCM 9730 三株菌株中都观察到 BcsA 和 BcsD,并且亚基位于呈线性阵列排列的 TCs 中,关于以上 TCs 示意图如图 1(右侧部分)所示。

随着冷冻电镜、免疫荧光标记等技术的应用,关于纤维素合酶的精细结构研究深入到亚基层面,各 Bcs 亚基间相对位置关系以及蛋白质结构研究趋于完善。现有研究对以类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、醋杆菌属、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)等为代表的革兰氏阴性菌亚基结构解析较为完全,其中 BcsA 由 8 个跨膜(transmembrane, TM)片段和 2 个细胞质结构域

组成:一个位于中间的糖基转移酶结构域和一个包含 c-di-GMP 结合 PilZ 结构域的 C 端片段; BcsB 位于外周质中,通过单个跨膜螺旋固定在膜上<sup>[50]</sup>; BcsC 中既含有周质蛋白,也有膜蛋白部分,该蛋白由 19 个四肽重复序列(tetratricopeptide repeat, TPR)结构域形成的 N 端  $\alpha$  螺旋部分和结构类似于外膜蛋白  $\beta$  桶形结构的 C 端部分组成;而 BcsD 是周质蛋白,结构为由 5 个  $\alpha$  螺旋和 4 个  $\beta$  链组成的八聚体,通过 4 个内部通道调节葡聚糖链的聚集<sup>[47,51-53]</sup>。各 Bcs 蛋白质结构与相对位置如图 1 所示。

在同样具备纤维素合成功能的大肠杆菌及其他肠杆菌科中,磷酸乙醇胺(phosphoethanolamine, pEtN)起到修饰周质中纤维素的作用,该作用可能依赖于 BcsB、BcsG 等亚基<sup>[54]</sup>。为深入了解 pEtN 在纤维素生物合成中的作用机理, Acheson 等<sup>[54]</sup>确定了 BcsA、BcsB

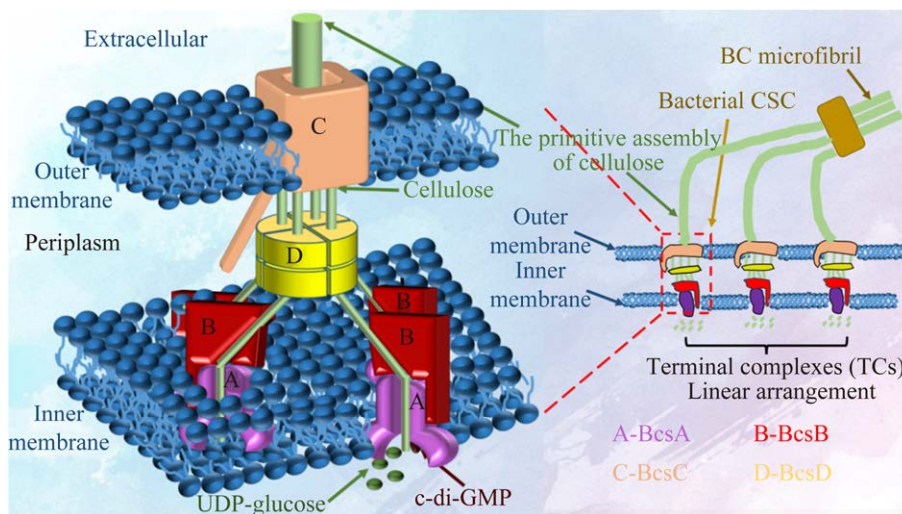


图 1 细菌纤维素合酶(Bcs)主要亚基的跨膜结构示意图<sup>[47,49]</sup> BcsA (PDB: 4HG6)为纤维素合酶亚基 A; BcsB (PDB: 7LBY, 4HG6)为纤维素合酶亚基 B; BcsC (PDB: 6TZK)为纤维素合酶亚基 C; BcsD (PDB: 3A8E)为纤维素合酶亚基 D. BcsA、BcsB、BcsC 和 BcsD 是纤维素合酶复合体 CSC 的主要组成部分, CSC 直线排列构成终端复合体(TCs)

Figure 1 Schematic diagram of the transmembrane structure of major Bcs subunits<sup>[47,49]</sup>. BcsA (PDB: 4HG6) is synthase subunit A; BcsB (PDB: 7LBY, 4HG6) is synthase subunit B; BcsC (PDB: 6TZK) is synthase subunit C; BcsD (PDB: 3A8E) is synthase subunit D. BcsA, BcsB, BcsC, and BcsD are the main components of CSC which are linearly arranged to form TCs.

以及其他几个亚基(BcsG、BcsE、BcsR、BcsQ等)的冷冻电镜结构,推理出其微观上存在的位置关系,并提出 BcsB 具有促进 pEtN 修饰后纤维素向外膜迁移的作用,以及 BcsG 对 pEtN 的催化作用,进一步为亚基结构的解析提供了直接的证据。总体而言,关于纤维素合酶亚基的定位探究仍以 BcsA-D 等关键亚基为主,其他部分亚基的位置信息尚未完全解析。

现有研究在宏观层面集中于对含有细菌纤维素合酶的微生物的筛选以及产量优化方面,在微观层面则深入到各亚基的定位和结构。现已证实细菌纤维素合酶位于终端复合体跨膜结构中,在外膜质膜上均有分布。此外,各主要亚基的相对位置和精细结构也被解析。以上研究成果有助于揭示细菌纤维素合酶内部的结构特征,进而深入理解细菌纤维素合成过程中纤维素合酶的作用机制。

## 2 细菌纤维素合酶的作用机理

细菌纤维素合酶由细菌纤维素合酶亚基构成。因此,想要进一步解析细菌纤维素合酶作用机理需要从亚基出发,明确各亚基在合成中的具体作用。然而,直接在菌体内原位研究亚基功能会受到其他酶的干扰,研究者们常采用体外合成的方法解决该问题。体外合成的首要条件是保持酶的活性,但常受到各种因素的影响,本文综述部分外部影响因素,并提供参考方法,为体外合成条件设定提供指导。总结通过采用体外合成来探究细菌纤维素合酶主要亚基以及其他亚基作用机制的研究进展,以进一步解析细菌纤维素的合成机制。

### 2.1 细菌纤维素的酶法体外合成

自 1886 年细菌纤维素被首次报道以来,生物合成细菌纤维素的方法以传统静态培养为主,该方法存在生产率低以及培养时间长等问

题<sup>[55-56]</sup>,因此体外合成细菌纤维素逐渐进入研究者的视野。另外,因为体外合成可以排除胞体内其他酶与蛋白的干扰<sup>[57]</sup>,探究体外合成过程与产物也是解析纤维素合成机制的重要方法,其中涉及亚基层面的体外合成研究更是对解析 Bcs 亚基结构与功能有着不可或缺的价值。

#### 2.1.1 细菌纤维素体外合成概述

早在 20 世纪 50 年代,关于细菌纤维素体外合成的尝试就已开始。1958 年,Glaser<sup>[58]</sup>使用木糖驹形氏杆菌部分破碎细胞以 UDP-Glc 作为糖基受体,实现了首次体外合成细菌纤维素,但是该体系产率较低,产物结构脆弱,较天然纤维素有很大差异。随着对纤维素合成机制理解的逐渐加深,研究者开始重视纤维素合酶在合成过程中的作用。1985 年,Lin 等<sup>[59]</sup>使用洋地黄皂苷透化细胞膜的方法提取出木糖驹形氏杆菌中的纤维素合酶,并将其用于构建体外合成体系,以葡萄糖为底物,所得产物呈簇状,倾向于横向上链与链的相互缠结,产生小而粗的纤维素聚合体。该团队用高度纯化的纤维二糖水解酶 I 标记体外合成的簇状纤维,通过两者的特异性结合确定该产物为纤维素,该体系是利用纤维素合酶体外合成纤维素产物的首次尝试。

涉及亚基层面体外合成研究同样开始于 20 世纪 80 年代,基于当时相对完善的大肠杆菌纤维素合酶复合体基因研究,Kumamoto 等<sup>[60]</sup>利用纯化后大肠杆菌合酶亚基 SecB (后经基因组分析推测与 BcsB 同源<sup>[61]</sup>)进行体外合成,尽管未得到结构完整的纤维素产物,但酶活性分析结果表明该亚基直接参与大肠杆菌胞外多糖合成的过程;该研究证实了利用部分细菌纤维素合酶亚基在体外合成中保留纤维素合酶活性的可能性。对于醋杆菌,随着 20 世纪 90 年代醋杆菌各 Bcs 亚基被发现,Bcs 亚基结构、作用研究开始逐渐清晰。然而,细菌纤维素合酶中关键亚基 BcsA、

BcsB在体外合成中的详细作用直到2013年才被 Omadjela 等<sup>[62]</sup>发现, 该研究通过 Bcs 亚基异源表达实现体外合成纤维素, 首次解析了 BcsA、BcsB 的结晶结构, 为后续通过体外合成纤维素解析亚基功能的研究提供依据。

在过去研究的基础上, Imai 等<sup>[63]</sup>将木糖驹形氏杆菌中的 BcsA 和 BcsB 在大肠杆菌中重建, 验证了 BcsA、BcsB 以及合成 c-di-GMP 的二鸟苷酸环化酶对于保留纤维素合酶合成活性的重要性。该体系中纤维素产物由携带木糖驹形氏杆菌 BcsA、BcsB 基因载体的大肠杆菌中直接获得, 可以稳定合成出较为完整的微纤丝产物, 因此产率较以往体外合成有较大提升; 此外, 以该体系体外合成出的产物结晶结构区别于天然的纤维素 I 晶体形式, 更接近于纤维素 II 型结构, 这也是截至目前大部分体外合成体系的共同点。事实上, 如何使体外合成产物保留完整纤维素结构, 尤其是结晶结构, 一直是困扰研究者们的问题之一。

为分析结晶纤维素合成的方式, 2016 年 Du 等<sup>[64]</sup>通过分别与 BcsA、BcsB 同源的汉森氏驹形氏杆菌的纤维素合酶 AcsA、AcsB 亚基构建 AcsAB 四聚体异源表达系统, 经透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)测试分析合成产物结构, 发现即使在保留 AcsAB 活性的情况下产物也不具备完整的结晶结构, 这表明完整的线性排列的末端复合物将纤维素挤压至外膜的机制可能是合成结晶纤维素的关键因素之一。同样地, 为解析体外合成中结晶结构差异的原因, 2019 年 Tajima 等<sup>[65]</sup>利用原位小角 X 射线散射(small angle X-ray scattering, SAXS)技术对合成过程中产物变化进行拟合分析, 由此得出结论, 对于体外合成, 纤维素 II 型结晶结构的产生分为至少 2 个步骤, 分别是所合成的纤维素分子聚集体在反应体系中分散, 以及分散至临界点后的分子链重新聚集成 II 型结构, 目前尚无法

证明该过程是体外合成产物结构差异的原因, 但这是对纤维素体外合成机制的进一步解析, 有重要理论价值。

### 2.1.2 体外合成的外部影响因素

在体外合成的过程中, 外界条件同样会对合成效果产生显著影响。有研究者从其他可能对合成体系产生的影响因素入手, 如纤维素合酶的提取方法、培养环境、外部因子等, 尝试通过改变体外合成条件的方式提升体外合成产物的产量、优化产物结构。

从菌体中提取所需蛋白的方法差异会直接影响提取细菌纤维素合酶的纯度和活性<sup>[66]</sup>, 进而影响体外合成效率与产物。为探究提高合酶活性的提取方式, Hashimoto 等<sup>[67]</sup>利用烷基麦芽糖苷作为洗涤剂提取木糖驹形氏杆菌细胞膜上的纤维素合酶, 发现该洗涤剂提取的纤维素合酶合成活性明显高于膜上的纤维素合酶。对在洗涤剂提取液中直接进行合成后的产物进行 XRD 分析后发现, 体外产物的平面晶体尺寸大于一般的丝光纤维素, 而且具有更高的结晶度, 结晶结构为纤维素 II 型; 测定该产物聚合度大于 45, 这表明在不影响纤维素合酶功能的前提下, 该提取方法可能会改变纤维素产物的结晶结构, 这可能是由于洗涤剂的存在使主导纤维素结晶的亚基 BcsC、BcsD 的机制改变, 导致产物表现为纤维素 II 型。

此外, 温度、离心、pH 等培养环境对体外合成也有着不可忽视的影响。Penttilä 等<sup>[57]</sup>从木糖驹形氏杆菌中成功提取出纤维素合酶, 进行了纤维素的体外合成研究, 得出了细菌培养过程和纤维素合成过程的最佳温度; 通过对合成体系差速离心发现, 引入足够强度的外力会显著影响纤维素合酶的作用, 降低纤维素的产量, 并且差速离心会使得合成纤维素的平均聚合度比静态条件小; 同时, 电镜结果也表明, 超速离心后, 合成的纤维素在形态上明显更加松散, 这可能是由

于超速离心过程中纤维素合酶复合体结构发生改变,与预期结果一致。所得纤维素产物的结晶型检测结果表明这 2 种反应条件并不会导致纤维素结晶型变化,产物均为纤维素II型。Li 等<sup>[68]</sup>通过加入不同缓冲液调节汉森木糖驹形氏杆菌静态培养的初始 pH,对比各组产量,得出 pH 为 5.0 时细菌纤维素的产率有明显提高,并且该条件下产物的力学性能较高。

外界条件的改变会对细菌内纤维素的原位合成过程及产物产生影响,该影响可能也会作用于体外合成,分析环境条件与产物的关系也可推导细菌纤维素合成机理,但这些条件是否直接作用于细菌纤维素合酶还有待进一步研究。Kouda 等<sup>[69]</sup>探究了二氧化碳/氧气压力对细菌纤维素生产的影响,发现氧气分压对于细菌纤维素的产量影响不大,但氧气浓度降低带来的二氧化碳的分压增大却会抑制细菌纤维素的生成速率。Zhou 等<sup>[70]</sup>探究了添加海藻酸钠对木糖驹形氏杆菌生产细菌纤维素的影响,发现海藻酸钠的加入会提升细菌纤维素的产率和产量,但 XRD 结果表明加入海藻酸钠后细菌纤维素的结晶度和晶体尺寸有所下降。这可能是由于海藻酸钠会缩短细胞的滞后期,并且阻止纤维素发生团聚,改变纤维素的结晶结构。此外,烟草胺、乙醇和有机酸等物质的浓度也会对合成产物造成影响<sup>[71-72]</sup>。这些外界因子对细菌纤维素合酶生产纤维素过程的作用机制仍需进一步探究。

## 2.2 细菌纤维素合酶主要亚基的作用

上述体外合成技术的发展,为纤维素合酶亚基的研究提供了便利,各亚基在纤维素合成过程中所发挥的作用具有一定差异。其中 BcsA 和 BcsB 是保留纤维素合成活性所需的最基本亚基。因此围绕 BcsA 和 BcsB 这 2 个关键亚基的相关研究较为完善<sup>[73-74]</sup>。

现有研究认为, BcsA 可以调整合成后纤维

素分子链的聚合度,并在细菌内膜上形成跨膜孔隙的一个合成亚基; BcsB 是一种大型膜外蛋白,通过 C 端产生跨膜的螺旋并镶嵌于内膜上, BcsB 不仅能参与纤维素链的跨质膜转运,还能调控纤维素合酶的活性,它通过两端的纤维素结合结构域(cellulose-binding domain, CBD)进而引导合成的纤维素分子穿过外膜<sup>[50]</sup>。此外,在某些特殊的纤维素合成菌中, BcsA 和 BcsB 还能融合成一条单一的多肽链<sup>[75]</sup>。

在 Omadjela 等<sup>[62]</sup>的研究中,研究者使用从类球红细菌中提取的 BcsA 和 BcsB 复合物,在体外构建了纤维素合酶异源表达系统;发现只有当 2 个亚基位于同一细胞膜上时,所构建出的表达体系才能保留纤维素合酶活性,具有合成纤维素的功能;另外在该研究中,研究者截短了 BcsB 的 N 端,并将其继续与 BcsA 引入倒置膜囊(inverted membrane vesicles, IMV)中协同表达,分析复合物的活性,发现大部分被截短的 BcsB 能继续与 BcsA 协同催化合成纤维素。虽然 BcsA 也需要 BcsB 进行活化,但只有 BcsB 的跨膜螺旋对于整个合酶的催化活性是必要的,被截取的 N 端复合体和 BcsA 的作用可能是稳定了 BcsB 的跨膜区域,促使纤维素合酶保持了催化活性。这项研究除了清晰地表明了 BcsA 和 BcsB 两者在合成纤维素中不可或缺的作用以外,还发现了 BcsA 与 BcsB 这 2 个亚基间的协同作用。

为进一步解释 BcsA、BcsB 这 2 个关键亚基的作用, Sajadi 等<sup>[76]</sup>分别将木糖驹形氏杆菌的 BcsA、BcsB 和 BcsAB 这 3 种基因扩增克隆到大肠杆菌中进行了异源表达,并在重组大肠杆菌细胞外合成出纤维素纤丝产物,通过定量分析比较各组体外合成产物与野生型大肠杆菌自身合成纤维素量的差异,测得重组 BcsA 和 BcsB 产物量与大肠杆菌对照组所得纤维素量大致相同,仅有重组 BcsA-B 产生纤维素的量与野生型相比有



所增加,这表明 2 个亚基必须同时位于膜上才能成功合成出功能化合物,并且 BcsA 和 BcsB 可能连接至同一个多肽中;还将含 BcsA、BcsB 的重组体产物与野生型大肠杆菌纤维素进行红外光谱结果对比分析,结果表明,与野生型相比,重组体产生的纤维素结晶指数变化不大,这证明在体外合成的纤维素结晶过程中 BcsA 和 BcsB 亚基并未发生作用。

此后, BcsA 和 BcsB 的协同作用生产机理逐渐明确。Su 等<sup>[77]</sup>将木糖驹形氏杆菌中的细菌纤维素合酶基因 *BcsAB* 克隆到特定载体中,生成质粒 pBcsAB,将该质粒引入到丝状蓝细菌中进行异源表达,利用钙荧光白染色后与异硫氰酸荧光素酯(fluorescein 5-isothiocyanate, FITC)偶耦联,标定纤维素存在的位置。对纤维素进行水解后测定水解后葡萄糖的含量,结果表明携带 *BcsAB* 基因的菌株总葡萄糖含量明显高于对照组,而且光合速率和生长速率均有所提高,证明 BcsA、BcsB 基因在纤维素合成中起到调节作用。

总之,在细菌纤维素合酶各亚基中, BcsA、BcsB 这 2 个主要亚基在纤维素合成中具有不可替代的关键作用,并且两者之间可以产生协同作用。BcsA 调整纤维素分子链聚合度,形成跨膜孔隙,而 BcsB 参与纤维素链的跨质膜转运,并调控合酶活性。尽管这 2 个亚基可能不直接参与纤维素结晶,但它们在体外合成过程中是必需的。这些研究深化了对细菌纤维素合酶亚基在纤维素合成中作用的理解。

### 2.3 其他亚基在纤维素合成过程中的作用

尽管 BcsA、BcsB 的作用不可或缺,但其他亚基同样在细菌纤维素合成过程中发挥着差异性作用,并且不同菌株来源的细菌纤维素合酶基因组以及操纵子类型也存在差异。综合已有报道可知,操纵子类型可以分为 4 类:以 *BcsA-D* 这 4 种基因为主的 I 型,代表菌株为醋杆菌;以 BcsA-C 为主不含有 BcsD 的 II 型,常见于大肠杆

菌等菌种内;仅含有 BcsA、BcsB、BcsZ 的 III 型,多存在于蚕豆农杆菌属(*Agrobacterium fabrum*)等菌体内;以及仅含有 BcsA 的 IV 型,存在于部分藻类中<sup>[78]</sup>。在研究比较深入的 I 型 *BcsA-D* 操纵子类型中, BcsA 聚合葡萄糖为链状分子, BcsB、BcsC、BcsD 与分泌、组装、结晶过程相关<sup>[78]</sup>。理解其他亚基的作用机制也是理解与掌握天然细菌纤维素合成中所必须关注的研究内容。

为探究 BcsD 亚基的具体作用, Sajadi 等<sup>[79]</sup>将木糖驹形氏杆菌中的 *BcsD* 基因进行 PCR 扩增并插入表达载体,生成质粒后在大肠杆菌细胞内进行异源表达,将大肠杆菌培养 24 h 后测定吸光度,结果显示重组菌与野生型无显著差异,两者所生产纤维素的量大致相同;另外该研究中重组体和野生型生产的纤维素的红外光谱以及 X 射线衍射结果表明,重组体产物的结晶指数高于野生菌株产物;这表明 *BcsD* 基因的作用是参与纤维素的结晶,而不过多参与纤维素合成。Kondo 等<sup>[80]</sup>研究了 BcsD 和 BcsAB 核心复合物的相互作用,结果表明二者存在蛋白质-蛋白质的直接相互作用(基态)和通过产物纤维素的间接相互作用(活性态)的转化,这种动态转化的行为可用于调节纤维素链的结晶过程。Hu 等<sup>[53]</sup>也曾经构建了所测的 BcsD 的三维八聚体模型。在 Acheson 等<sup>[54]</sup>通过冷冻电镜构建纤维素合酶各个亚基结构的研究结果表明, BcsA 与 BcsB 六聚体可能与 2 个 BcsG 拷贝相关; BcsA 可通过其 C 端 Pilz 结构域与 BcsE 和 BcsQ-R 复合物这 2 种复合体相互作用,并且它们都可以刺激生物体外纤维素的合成。此外, Sun 等<sup>[81]</sup>对纤维素合酶不同基因位点突变并对其异源表达产物进行分析,进而判断各突变基因的功能,发现半胱氨酸(cysteine, Cys) 308 周围的巯基和芳香烃之间的相互作用是保证纤维素体外合成活性的关键,进一步揭示了纤维素合酶部分基因在活细胞中的作用。其余相关纤维素合酶亚基的作用见表 1<sup>[82-86]</sup>。

表 1 细菌纤维素合酶相关亚基

Table 1 Bacterial cellulose synthase subunits

Subunit protein	Manipulator type	Function
BcsA	I, II, III, IV	Catalytic subunit A of cellulose synthase
BcsB	I, II, III	Catalytic subunit B of cellulose synthase (periplasmic space)
BcsC	I, II, III	Catalytic subunit C of cellulose synthase (spans periplasm and extracellular membrane)
BcsD	I	Catalytic subunit D of cellulose synthase
BcsE	II	Cytoplasmic subunit E of cellulose synthase (binding to c-di-GMP)
BcsF	II	Subunits anchoring the cell membrane
BcsG	II	Contains four TM fragments and an AlkP domain
BcsQ-R	I, II	The complex is an NTPase associated with ParA/MinD
BglX	Ia	Beta-glucosidase, glycosylase, hydrolase family 3, secretory type
BcsH	Ia	Cellulose-supplemented protein A (specific to <i>Bacillus acetobacter</i> )
BcsL	IIIa	For acetyl transfer
BcsM	IIIa	Dependent aminohydrolase, deacylation of glucose residues
BcsT	III	Membrane protein (8 TM fragments) containing glycosyltransferase structural domains

其他目前未知具体作用的亚基(BcsO、BcsP、BcsK、BcsN、BcsS、BcsU 和 BcsV 等)未在表中列出

Other subunits (BcsO, BcsP, BcsK, BcsN, BcsS, BcsU, and BcsV, etc.) are not listed in this table for which the specific role is currently unknown.

综上所述,目前利用细菌纤维素合酶亚基层面研究中,主要探讨各亚基的结构定位及其在合成过程中的具体作用。其中, BcsA 和 BcsB 这 2 个关键亚基的作用及它们之间的协同作用相关研究取得了较大进展,但关于其他亚基的结构和功能仍有探索空间<sup>[87]</sup>。随着细菌纤维素合酶各个亚基冷冻电镜结构研究的日渐完善,相信在未来各个亚基之间的相互作用可以进一步被解析。在细菌体内直接分析亚基功能难度较大,因此研究者们常使用构建异源表达体系实现体外合成的方式反推亚基的功能,而实现高效率的体外合成细菌纤维素也是研究纤维素合成机制的最终应用目的。

### 3 问题与展望

在当前对细菌纤维素合酶合成机理的探究中,各主要 Bcs 亚基的结构、相对定位已经得到确认,各 Bcs 亚基在合成中的作用机制也被初步发现。在可预见的一段时间内,继续研究 Bcs

亚基的功能进而解析细菌纤维素合成机制仍是当前该领域研究的主要重心。排除胞体其他干扰的异源表达是解析亚基作用机制的主要方法,此方面研究经过多年发展已取得较大进展,体外重构纤维素合酶活性的表达体系所必备条件(BcsA、BcsB 亚基以及 c-di-GMP 等)被解析。尽管如此,目前 Bcs 亚基异源表达体外合成体系所得产物在结构上相比于天然纤维素有较大差异,具体表现在聚合度、结晶结构差异等,这方面尚未得到清晰明确的解释。通过优化方案构建更加有效的合成体系来提升产物产率、优化产物结构也是近年研究的重点方向之一。随着亚基作用机制的进一步解析,一些其他非关键亚基对合成的作用被发现。利用体外合成将多个亚基共同重构或许是一个可行的选择。相信在纤维素合酶的机理解析方面未来会取得更多有意义的进展。

### 参考文献

- [1] 刘振东, 赵淑举, 蒋苏, 张古玥. 植物纤维素合酶复合体组装与运输研究进展[J]. 植物生理学报, 2020,

- 56(9): 1757-1764.
- LIU ZD, ZHAO SJ, JIANG S, ZHANG GY. Assembly and trafficking of the cellulose synthase complex in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(9): 1757-1764 (in Chinese).
- [2] ZAINAL SH, MOHD NH, SUHAILI N, ANUAR FH, LAZIM AM, OTHAMAN R. Preparation of cellulose-based hydrogel: a review[J]. *Journal of Materials Research and Technology*, 2021, 10: 935-952.
- [3] 朱晓东, 杜昀怡, 原续波, 赵瑾, 侯信. 细菌纤维素的最新研究进展[J]. *高分子通报*, 2022(5): 17-26.
- ZHU XD, DU YY, YUAN XB, ZHAO J, HOU X. Recent progress on bacterial cellulose[J]. *Polymer Bulletin*, 2022(5): 17-26 (in Chinese).
- [4] 李国辉. 细菌纤维素纤维复合材料的制备及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2017.
- LI GH. Preparation of bacterial cellulose fiber composites and their applications[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2017.
- [5] MARTIRANI-VONABERCRO SM, PACHECO-SÁNCHEZ D. Bacterial cellulose: a highly versatile nanomaterial[J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(6): 1174-1178.
- [6] SKVORTSOVA ZN, GROMOVYKH TI, GRACHEV VS, TRASKIN VY. Physicochemical mechanics of bacterial cellulose[J]. *Colloid Journal*, 2019, 81(4): 366-376.
- [7] 洪帆, 宋洁, 白洁, 杜冰, 郑环达, 郑来久. 细菌纤维素的功能化改性研究进展[J]. *精细化工*, 2021, 38(12): 2377-2384.
- HONG F, SONG J, BAI J, DU B, ZHENG HD, ZHENG LJ. Research progress on functional modification of bacterial cellulose[J]. *Fine Chemicals*, 2021, 38(12): 2377-2384 (in Chinese).
- [8] 李昭锋, 曹潇, 朱杰, 陈思谦, 李琳. 细菌纤维素在植物细胞壁结构与功能研究中的应用及进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 263-271.
- LI ZF, CAO X, ZHU J, CHEN SQ, LI L. Advances in bacterial cellulose in the study of the structure and function of plant cell wall[J]. *Food Science*, 2020, 41(19): 263-271 (in Chinese).
- [9] CAÑAS-GUTIÉRREZ A, OSORIO M, MOLINA-RAMÍREZ C, ARBOLEDA-TORO D, CASTRO-HERAZO C. Bacterial cellulose: a biomaterial with high potential in dental and oral applications[J]. *Cellulose*, 2020, 27(17): 9737-9754.
- [10] HORUE M, SILVA JM, BERTI IR, BRANDÃO LR, BARUD HDS, CASTRO GR. Bacterial cellulose-based materials as dressings for wound healing[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 424.
- [11] RATHINAMOORTHY R. Recent trends in the development of smart bacterial cellulose wound dressings[J]. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 2022, 47(1): 30-44.
- [12] WASIM M, MUSHTAQ M, KHAN SU, FAROOQ A, NAEEM MA, KHAN MR, SALAM A, WEI QF. Development of bacterial cellulose nanocomposites: an overview of the synthesis of bacterial cellulose nanocomposites with metallic and metallic-oxide nanoparticles by different methods and techniques for biomedical applications[J]. *Journal of Industrial Textiles*, 2022, 51(2): 1886S-1915S.
- [13] AKHTAR S, SHAHID AA, SHAKOOR S, AHMED M, IFTIKHAR S, USMAAN M, SADAQAT S, LATIF A, IQBAL A, RAO AQ. Tissue specific expression of bacterial cellulose synthase (*Bcs*) genes improves cotton fiber length and strength[J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2023, 328: 111576.
- [14] 杨依维, 刘玉飞, 何敏. 细菌纤维素的制备及在食品中的应用进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2022, 30(3): 45-51.
- YANG YW, LIU YF, HE M. Progress on the preparation of bacterial cellulose and its application in food[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2022, 30(3): 45-51 (in Chinese).
- [15] QIU KY, NETRAVALI AN. A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites[J]. *Polymer Reviews*, 2014, 54(4): 598-626.
- [16] SALIHU R, FOONG CY, ABD RAZAK SI, KADIR MRA, YUSOF AHM, MAT NAYAN GH. Overview of inexpensive production routes of bacterial cellulose and its applications in biomedical engineering[J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2019, 53(1/2): 1-13.
- [17] PEDERSEN GB, BLASCHEK L, FRANDBSEN KE, NOACK LC, PERSSON S. Cellulose synthesis in land plants[J]. *Molecular plant*, 2023, 16(1): 206-231.
- [18] 赵鑫, 熊健力, 任叶琳, 杨家鑫, 李伟, 韩雪容. 细菌纤维素合成与鉴定研究综述[J]. *化工进展*, 2020, 39(S2): 262-268.
- ZHAO X, XIONG JL, REN YL, YANG JX, LI W, HAN XR. Review on synthesis and identification of bacterial cellulose[J]. *Chemical Industry and*

- Engineering Progress, 2020, 39(S2): 262-268 (in Chinese).
- [19] 杨礼富. 细菌纤维素研究新进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 95-98.  
YANG LF. New progress in bacterial cellulose research[J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 95-98 (in Chinese).
- [20] BROWN AJ. XLIII. On an acetic ferment which forms cellulose[J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1886, 49: 432-439.
- [21] BROWN RM Jr. The biosynthesis of cellulose[J]. Food Hydrocolloids, 1987, 1(5/6): 345-351.
- [22] ANANDHARAJ M, LIN YJ, RANI RP, NADENDLA EK, HO MC, HUANG CC, CHENG JF, CHANG JJ, LI WH. Constructing a yeast to express the largest cellulosome complex on the cell surface[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(5): 2385-2394.
- [23] ITOH T, KIMURA S. Immunogold labeling of terminal cellulose-synthesizing complexes[J]. Journal of Plant Research, 2001, 114(4): 483-489.
- [24] KIMURA S, CHEN HP, SAXENA IM, BROWN RM Jr, ITOH T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5668-5674.
- [25] 王珊珊, 韩永和, 林志蓉, 李敏. 细菌纤维素的生物合成机理、理化性质及应用研究进展[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2021, 37(3): 1-9.  
WANG SS, HAN YH, LIN ZR, LI M. Research progress on biosynthesis mechanisms and physicochemical properties of bacterial cellulose and its application[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2021, 37(3): 1-9 (in Chinese).
- [26] LEI L, LI SD, GU Y. Cellulose synthase complexes: composition and regulation[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 22711.
- [27] MAYER R, ROSS P, WEINHOUSE H, AMIKAM D, VOLMAN G, OHANA P, CALHOON RD, WONG HC, EMERICK AW, BENZIMAN M. Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(12): 5472-5476.
- [28] 黄青云, 张党权, 谷振军, 田华. 纤维素合成酶及其在基因工程中的应用[J]. 经济林研究, 2009, 27(2): 131-136.  
HUANG QY, ZHANG DQ, GU ZJ, TIAN H. Cellulose synthase and its application in genetic engineering[J]. Nonwood Forest Research, 2009, 27(2): 131-136 (in Chinese).
- [29] MORGAN JLW, McNAMARA JT, ZIMMER J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2014, 21(5): 489-496.
- [30] 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(1): 6266.
- [31] 李婷婷, 赵鑫, 任叶琳, 任佳楠, 韩雪容. 细菌纤维素合成菌的筛选、鉴定及其产物结构和性质表征[J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 35-39.  
LI TT, ZHAO X, REN YL, REN JN, HAN XR. Screening and identification of cellulose-synthesis bacterium and its product structure and property characterization[J]. China Brewing, 2021, 40(2): 35-39 (in Chinese).
- [32] AUGIMERI RV, VARLEY AJ, STRAP JL. Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: lessons learned from diverse biofilm-producing proteobacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 169282.
- [33] LI GH, WANG L, DENG Y, WEI QF. Research progress of the biosynthetic strains and pathways of bacterial cellulose[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(1): kuab071.
- [34] YAMADA Y, HOSHINO K, ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(8): 1244-1251.
- [35] YAMADA Y, YUKPHAN P, VU HTL, MURAMATSU Y, OCHAIKUL D, TANASUPAWAT S, NAKAGAWA, Y. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013; 63(1): 1-5.
- [36] AYDİN YA, AKSOY ND. Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose

- producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1065-1075.
- [37] NIE WX, ZHENG X, FENG W, LIU Y, LI YD, LIANG XL. Characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter pasteurianus* MGC-N8819 utilizing lotus rhizome[J]. *LWT*, 2022, 165: 113763.
- [38] YANTI NA, AHMAD SW, MUHIDDIN NH, AHMAD NUR RAMADHAN LO, SURIANA, WALHIDAYAH T. Characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* strain LKN6 using Sago liquid waste as nutrient source[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2021, 24(3): 335-344.
- [39] de WULF P, JORIS K, VANDAMME EJ. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1996, 67(4): 376-380.
- [40] BAE SO, SUGANO Y, OHI K, SHODA M. Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(3): 315-322.
- [41] WU RQ, LI ZX, YANG JP, XING XH, SHAO DY, XING KL. Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconoacetobacter xylinus* strain[J]. *Cellulose*, 2010, 17(2): 399-405.
- [42] LU TF, GAO HL, LIAO BW, WU JJ, ZHANG W, HUANG J, LIU MY, HUANG J, CHANG ZY, JIN MF, YI ZF, JIANG DM. Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 232: 115788.
- [43] 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.
- [44] COOPER D, MANLEY RS. Cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. I. Low molecular weight compounds present in the region of synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, 381(1): 78-96.
- [45] ZAAR K. Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the Gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1979, 80(3): 773-777.
- [46] BUREAU TE, BROWN RM. *In vitro* synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *Acetobacter xylinum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(20): 6985-6989.
- [47] TAJIMA K, IMAI T, YUI T, YAO M, SAXENA I. Cellulose-synthesizing machinery in bacteria[J]. *Cellulose*, 2022, 29(5): 2755-2777.
- [48] SUNAGAWA N, FUJIWARA T, YODA T, KAWANO S, SATOH Y, YAO M, TAJIMA K, DAIRI T. Cellulose complementing factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 607-612.
- [49] SUN SJ, IMAI T, SUGIYAMA J, KIMURA S. CesA protein is included in the terminal complex of *Acetobacter*[J]. *Cellulose*, 2017, 24(5): 2017-2027.
- [50] MORGAN JLW, STRUMILLO J, ZIMMER J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation[J]. *Nature*, 2013, 493(7431): 181-186.
- [51] KEISKI CL, HARWICH M, JAIN S, NECULAI AM, YIP P, ROBINSON H, WHITNEY JC, RILEY L, BURROWS LL, OHMAN DE, HOWELL PL. AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin[J]. *Structure*, 2010, 18(2): 265-273.
- [52] WHITNEY JC, HAY ID, LI CH, ECKFORD PDW, ROBINSON H, AMAYA MF, WOOD LF, OHMAN DE, BEAR CE, REHM BH, HOWELL PL. Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13083-13088.
- [53] HU SQ, GAO YG, TAJIMA K, SUNAGAWA N, ZHOU Y, KAWANO S, FUJIWARA T, YODA T, SHIMURA D, SATOH Y, MUNEKATA M, TANAKA I, YAO M. Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(42): 17957-17961.
- [54] ACHESON JF, HO R, GOULARTE NF, CEGELSKI L, ZIMMER J. Molecular organization of the *E. coli* cellulose synthase macro complex[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2021, 28(3): 310-318.
- [55] BROWN AJ. LXII: further notes on the chemical action of *Bacterium acetii*[J]. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1887, 51: 638-643.

- [56] SHEZAD O, KHAN S, KHAN T, PARK JK. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 173-180.
- [57] PENTTILÄ PA, SUGIYAMA J, IMAI T. Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized *in vitro* by bacterial cellulose synthases[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 656-666.
- [58] GLASER L. The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1958, 232(2): 627-636.
- [59] LIN FC, BROWN RM Jr, COOPER JB, DELMER DP. Synthesis of fibrils *in vitro* by a solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*[J]. Science, 1985, 230(4727): 822-825.
- [60] KUMAMOTO CA, CHEN L, FANDL J, TAI PC. Purification of the *Escherichia coli secB* gene product and demonstration of its activity in an *in vitro* protein translocation system[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(4): 2242-2249.
- [61] SOFIA HJ, BURLAND V, DANIELS DL, PLUNKETT G, BLATTNER FR. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(13): 2576-2586.
- [62] OMADJELA O, NARAHARI A, STRUMILLO J, MÉLIDA H, MAZUR O, BULONE V, ZIMMER J. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for *in vitro* cellulose synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(44): 17856-17861.
- [63] IMAI T, SUN SJ, HORIKAWA Y, WADA M, SUGIYAMA J. Functional reconstitution of cellulose synthase in *Escherichia coli*[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(11): 4206-4213.
- [64] DU J, VEPACHEDU V, CHO SH, KUMAR M, NIXON BT. Structure of the cellulose synthase complex of *Gluconacetobacter hansenii* at 23.4 Å resolution[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155886.
- [65] TAJIMA H, PENTTILÄ PA, IMAI T, YAMAMOTO K, YUGUCHI Y. Observation of *in vitro* cellulose synthesis by bacterial cellulose synthase with time-resolved small angle X-ray scattering[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 765-777.
- [66] WANG J, TAVAKOLI J, TANG YH. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods: a review[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 219: 63-76.
- [67] HASHIMOTO A, SHIMONO K, HORIKAWA Y, ICHIKAWA T, WADA M, IMAI T, SUGIYAMA J. Extraction of cellulose-synthesizing activity of *Gluconacetobacter xylinus* by alkylmaltoside[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(17): 2760-2768.
- [68] LI ZF, CHEN SQ, CAO X, LI L, ZHU J, YU HP. Effect of pH buffer and carbon metabolism on the yield and mechanical properties of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(3): 429-438.
- [69] KOUUDA T, NARITOMI T, YANO H, YOSHINAGA F. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(2): 124-127.
- [70] ZHOU LL, SUN DP, HU LY, LI YW, YANG JZ. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(7): 483-489.
- [71] SON HJ, KIM HG, KIM KK, KIM HS, KIM YG, LEE SJ. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions[J]. Bioresource Technology, 2003, 86(3): 215-219.
- [72] TODA K, ASAKURA T, FUKAYA M, ENTANI E, KAWAMURA Y. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(3): 228-231.
- [73] CHEN HP, BROWN RM. Immunochemical studies of the cellulose synthase complex in *Acetobacter xylinum*[J]. Cellulose, 1996, 3(1): 63-75.
- [74] HILTON MA, MANNING HW, GÓRNIK I, BRADY SK, JOHNSON MM, ZIMMER J, LANG MJ. Single-molecule investigations of single-chain cellulose biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(40): e2122770119.
- [75] SAXENA IM, KUDLICKA K, OKUDA K, JR BROWN RM. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose

- crystallization[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(18): 5735-5752.
- [76] SAJADI E, FATEMI SSA, BABAEIPOUR V, DELDAR AA, YAKHCHALI B, ANVAR MS. Increased cellulose production by heterologous expression of *bcsA* and *bcsB* genes from *Gluconacetobacter xylinus* in *E. coli* Nissle 1917[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(12): 2023-2034.
- [77] SU HY, LEE TM, HUANG YL, CHOU SH, WANG JB, LIN LF, CHOW SH. Increased cellulose production by heterologous expression of cellulose synthase genes in a filamentous heterocystous cyanobacterium with a modification in photosynthesis performance and growth ability[J]. *Botanical Studies*, 2011, 52(3): 265-275.
- [78] NOJIMA S, FUJISHIMA A, KATO K, OHUCHI K, SHIMIZU N, YONEZAWA K, TAJIMA K, YAO M. Crystal structure of the flexible tandem repeat domain of bacterial cellulose synthesis subunit C[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13018.
- [79] SAJADI E, BABAIPOUR V, DELDAR AA, YAKHCHALI B, FATEMI SSA. Enhancement of crystallinity of cellulose produced by *Escherichia coli* through heterologous expression of *bcsD* gene from *Gluconacetobacter xylinus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(9): 1395-1401.
- [80] KONDO T, NAKAMURA Y, NOJIMA S, YAO M, IMAI T. The BcsD subunit of type I bacterial cellulose synthase interacts dynamically with the BcsAB catalytic core complex[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(23): 3069-3086.
- [81] SUN SJ, HORIKAWA Y, WADA M, SUGIYAMA J, IMAI T. Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfur-arene interaction as key to catalysis[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 434: 99-106.
- [82] UMEDA Y, HIRANO A, ISHIBASHI M, AKIYAMA H, ONIZUKA T, IKEUCHI M, INOUE Y. Cloning of cellulose synthase genes from *Acetobacter xylinum* JCM 7664: implication of a novel set of cellulose synthase genes[J]. *DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 1999, 6(2): 109-115.
- [83] ALZARI PM, SOUCHON H, DOMINGUEZ R. The crystal structure of endoglucanase C<sub>elA</sub>, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*[J]. *Structure*, 1996, 4(3): 265-275.
- [84] ANDERSON AC, BURNETT AJN, HISCOCK L, MALY KE, WEADGE JT. The *Escherichia coli* cellulose synthase subunit G (BcsG) is a Zn<sup>2+</sup>-dependent phosphoethanolamine transferase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(18): 6225-6235.
- [85] MAZUR O, ZIMMER J. Apo- and cellopentaose-bound structures of the bacterial cellulose synthase subunit BcsZ[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(20): 17601-17606.
- [86] FANG X, AHMAD I, BLANKA A, SCHOTTKOWSKI M, CIMDINS A, GALPERIN MY, RÖMLING U, GOMELSKY M. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(3): 439-452.
- [87] ABIDI W, TORRES-SÁNCHEZ L, SIROY A, KRASTEVA PV. Weaving of bacterial cellulose by the Bcs secretion systems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(2): fuab051.