

# 不同培养方式对细菌纤维素产量和结构性质的影响

周伶俐 孙东平\* 吴清杭 杨加志 杨树林

(南京理工大学化工学院生物工程系 南京 210094)

**摘 要** 考察了自行筛选的 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 在静置培养和发酵罐培养获得的细菌纤维素(BC)的产量、基本结构和性能的差异。结果表明 静置培养时产纤维素 7.5g/L,产率为 0.052g/L/h,在机械搅拌发酵罐中培养 3d 产量达 3.13g/L 产率达 0.043g/L/h SEM 分析显示静置培养和发酵罐培养得到的纤维素均具有网状结构,但静置获得的纤维素丝带相互缠绕且层状重叠,更加致密,丝带更细;FT-IR 分析知搅拌不改变纤维素的化学结构,但能减弱分子间氢键 和 XRD 结合分析可知静置培养的纤维素具有更高结晶指数,更高  $I_0$  含量和更大晶粒尺寸,但不改变晶型,仍为纤维素 I 型,说明搅拌会干扰纤维素初始纤丝的结晶,有利于形成更小的晶粒和较  $I_0$  稳定的  $I_p$ 。与棉纤维素相比,静置培养获得的纤维素的热稳定性更好,而发酵罐培养获得的纤维素则阻燃性更好。

**关键词** :细菌纤维素 木醋杆菌 结构 培养方式

中图分类号 :Q939.9 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2007)05-0914-04

纤维素是由葡萄糖基通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接起来的大分子,广泛存在于植物、细胞和个别低等动物中。由木醋杆菌合成的细菌纤维素(BC)化学组成上与植物纤维素相同,但与之相比,具有纯度高、结晶度高、重合度高、吸水性强、抗张强度高、生物适应性强等独特的性质,所以细菌纤维素作为一种新型生物材料受到了科学界的广泛关注<sup>[1]</sup>。如今 BC 已成功地应用于食品、生物医学、造纸、声学器材、化妆品、三次采油、膜滤器、具有环保性能的纸杯等领域<sup>[2,3]</sup>。目前通过筛选优良菌种、优化培养基组成、确定合适的发酵工艺条件等方法,可获得高产优质的细菌纤维素。目前合成细菌纤维素有静置培养和动态培养两种方式,其中静置培养所得纤维素产量较高,但其发酵周期长、占地面积大、劳动强度高而不利于今后的工业化生产及产品开发,而动态培养因供氧充足利于菌体生长,发酵周期短、生产效率高,但产量较低<sup>[4]</sup>,而且两种方式产的纤维素的形状、结构、性质差异都较大。因此本文以自行筛选驯化的生产性能稳定的木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)NUST4.2 为出发菌种,探索培养方式对纤维素产量、结构及性质的影响,为今后细菌纤维素的大规模生产提供必要的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** :*Acetobacter xylinum* NUST4.2 由本实验室筛选并保藏。

**1.1.2 培养基** :① 固体培养基 :每升水含葡萄糖 30g,蛋白胨 10g,柠檬酸 1.15g,磷酸氢二钠 2.7g,硫酸镁 0.25g,琼脂

20g,pH 6.0 ② 种子培养液 :每升水含葡萄糖 20g,玉米浆干粉 6g,硫酸铵 6g,磷酸二氢钾 1g,硫酸镁 0.4g,pH 6.0 ③ 发酵培养液 :每升水含葡萄糖 18g,蔗糖 21g,玉米浆干粉 20g,硫酸铵 4g,磷酸二氢钾 2g,硫酸镁 0.4g,pH 6.0。

### 1.2 培养方法

种子培养液中接入斜面菌种后于 29℃、150r/min 摇床中培养 12h,然后按 8%接种量接种于(1)装 100mL 发酵培养液的 500mL 三角瓶中 29℃ 恒温静置培养 6d (2)装 7L 发酵培养液(另加 0.35mL 消泡剂)的 12.8L 机械搅拌发酵罐(比欧 L1523 瑞士)中试验,调整转速 300r/min 维持 pH 5.0 培养温度 29℃ 通气量 3.5L/min 罐压 0.03MPa,培养 3d。各平行试验三组。

### 1.3 发酵参数测定

pH 值测定 :使用 PHB5 微机型酸度计;残还原糖测定 :改进的 DNS 法<sup>[5]</sup>。

### 1.4 产物的提纯和产量测定

参见文献<sup>[6]</sup>。

### 1.5 产物结构和热稳定分析

以下测试样品为静置培养和发酵罐培养的产物。

**1.5.1 SEM 分析** :采用 JEOL JSM-6380 LV 电压 15kV 喷金。

**1.5.2 FT-IR 分析** :采用 Bruker EQUINOX55 型遥感 FT-IR 仪,固体 KBr 压片。纤维素  $I_0$  含量  $f_0$  计算参见文献<sup>[7]</sup>。

**1.5.3 X-射线衍射分析** :采用 Bruker D8 ADVANCE X-射线粉末衍射仪(铜靶,  $K_{\alpha}$  射线,  $\lambda = 0.1541\text{nm}$ ),管压 40kV,扫描范围  $5^{\circ} \sim 40^{\circ}$ ,步进扫描,步宽  $2\theta = 0.1^{\circ}$ ,测试 3s。X-射线衍射结晶指数 Cr I 参见文献<sup>[8]</sup> (200)晶面的微晶尺寸由 Scherrer

\* 通讯作者。Tel 86-25-84315256 E-mail :dongpingsun@163.com

作者简介 :周伶俐(1979-)女,江苏人,博士研究生,主要从事生物纳米材料研究。E-mail :zll7912@163.com

收稿日期 :2007-02-05 接受日期 :2007-04-23 修回日期 :2007-06-17

公式计算得到<sup>[9]</sup>。

**1.5.4 热稳定分析:**热重分析:采用日本岛津公司的 Shimadzu TGA-50 型,升温速率 10℃/min,氮气气氛,测试温度范围为 50℃~800℃;差热分析:采用日本岛津公司的 Shimadzu DTA-50 型,升温速率 10℃/min,氮气气氛,测试温度范围为 50℃~800℃。

## 2 结果和分析

### 2.1 静置培养和发酵罐动态培养产的纤维素形态差异性

不同培养方式下得到的细菌纤维素的形态差异很大,静置培养得到的纤维素经纯化处理后为白色半透明膜,形成过程中有分层现象,烘干后成一薄膜。而发酵罐培养得到的纤维素,有絮状物、团块、丝带等,一部分缠绕在发酵罐内部零件上,大多数絮状物分散在发酵液中,经纯化处理后得到白色产物,烘干后成片状。

### 2.2 静置培养和发酵罐培养细菌纤维素的动态变化

图 1 反映了静置培养和发酵罐培养过程的发酵参数变化,从图 1(A)可看出,随着培养时间的延长,第 4 天后还原糖浓度基本不变,而 pH 随着还原糖的消耗在下降,这是因为 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 在产纤维素的同时伴随着葡萄糖酸副产物的产生,不过纤维素产量仍在增加,至第 6 天到达最大产量 7.5g/L,产率为 0.052g/L/h。图 1 中的 B 和 A 区别在于葡萄糖消耗速度更快,说明好氧菌 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 在发酵罐中因供给氧气较静置过程充足而利于生长,而且纤维素合成也加快,但在 66h 后纤维素出现下降趋势,这是由于 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 在较低的还原糖和剪切力的影响下,容易发生变异为不产纤维素的突变菌<sup>[10]</sup>,经试验当残糖在 0.3%~0.5% 时须放罐,培养 3d 产量达 3.13g/L,产率达 0.043g/L/h,说明该菌种在静置和发酵罐中培养都能稳定合成纤维素。但为了提高产量须将在 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 生长过程中充当能源物质和底物的葡萄糖尽可能地转化为纤维素,则可向培养基中添加乙醇作能源物质来替代一部份用来作能源物质的葡萄糖<sup>[11]</sup>,这在后期的实验中已得到证实<sup>[12]</sup>。

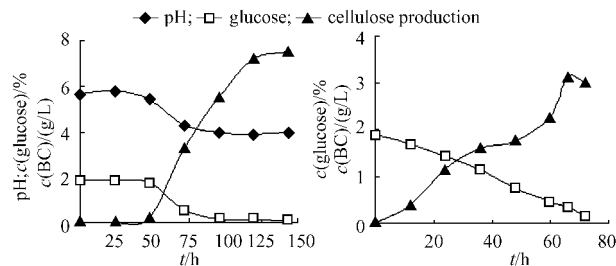


图 1 静置培养(A)和发酵罐培养(B)得到的细菌纤维素的动态变化

Fig.1 Dynamics of cellulose synthesis in static culture (A) and in the stirred tank reactor (B)

### 2.3 静置培养和发酵罐培养的细菌纤维素的结构性差异

#### 2.3.1 SEM 分析

图 2 是两种培养方式下所产的细菌纤维素的扫描电镜照片,发现两者均为许多纤维丝带相互缠绕而形成的网络结构,丝带宽度大约 10nm~80nm,但丝带和网状结构有明显差异,静置培养的纤维素丝带相互缠绕且层次重叠、更加致密,丝带宽度较细,而发酵罐培养的丝带较粗,且高度延伸。

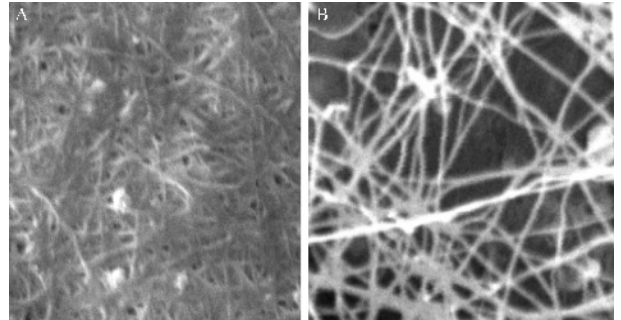


图 2 静置培养(A, 10000×)和发酵罐培养(B, 10000×)得到的细菌纤维素的 SEM 照片

Fig.2 Scanning electron micrographs of BC produced in static culture (A, 1000×) and in the stirred tank reactor (B, 10000×)

#### 2.3.2 FT-IR 和 XRD 分析

对静置培养和发酵罐培养 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 所产纤维素进行红外扫描(图 3),两种方式得到的纤维素组成基本一致,但 3400cm<sup>-1</sup> 和 1060cm<sup>-1</sup> 左右区域图谱有较大不同,静置培养得到的细菌纤维素由于分子间氢键类型多数目多,表现在 3417cm<sup>-1</sup> 处分裂为许多小肩峰,1058cm<sup>-1</sup> 的峰较为平缓,而发酵罐培养得

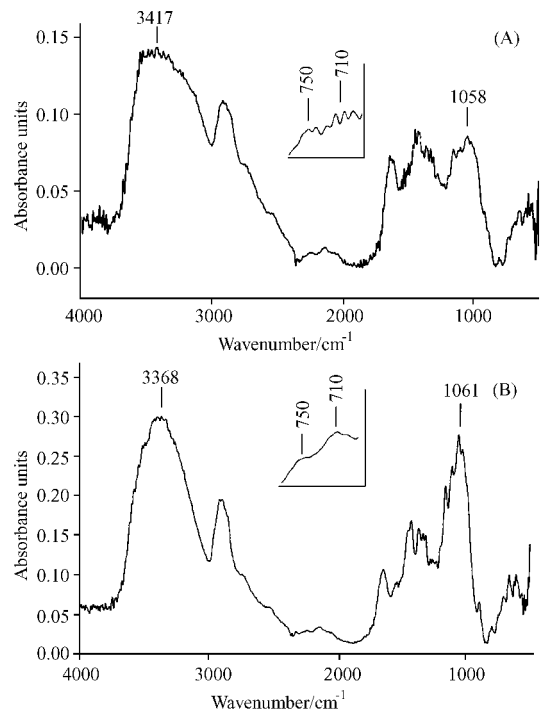


图 3 静置培养(A)和发酵罐培养(B)得到的细菌纤维素的 FT-IR 图谱

Fig.3 FT-IR spectra of BC produced in static culture (A) and in the stirred tank reactor (B)

到的细菌纤维素在  $3368\text{cm}^{-1}$  处的波形变窄, 类似单峰, 在  $1061\text{cm}^{-1}$  处的峰明显加强, 这说明搅拌会造成分子间氢键大为减弱。据资料<sup>[13]</sup>报道  $I_a$  的含量可通过 FT-IR 测量, 即将  $500\text{cm}^{-1} \sim 900\text{cm}^{-1}$  区域进行扩大, 采用  $710\text{cm}^{-1}$  和  $750\text{cm}^{-1}$  处的峰强来计算  $I_a$  的含量, 原理是  $750\text{cm}^{-1}$  和  $710\text{cm}^{-1}$  处的峰对应  $I_a$  和  $I_b$  晶型的特征, 而且这两个峰的吸光度与  $I_a$  和  $I_b$  晶型的含量成一定比例, 由此计算出两种培养方式得到的细菌纤维素的  $I_a$  含量见表 1。另有报道<sup>[7]</sup>, 比较 XRD 图谱上的 (110) 面和 (100) 面衍射角之差也能反映  $I_a$  和  $I_b$  晶型含量的多少, 本试验中静置的两晶面衍射角之差为  $2^\circ$ , 而发酵罐是  $1.6^\circ$  (图 4), 同样证实了静态得到的纤维素的  $I_a$  含量较高。

从图 4 能看出两种培养方式下产的细菌纤维素具有类似天然纤维的结构, 均为纤维素 I 型, 有 3 个衍射峰, 即 (100) (110) (200), 但从 (200) 衍射峰强度可看出静置产的纤维素具有更高的结晶指数, 另外结晶指数和 (200) 面的晶粒尺寸计算结果见表 1, 发现静置培养得到的纤维素的结晶指数、晶粒尺寸和  $I_a$  含量均高于发酵罐培养的, 说明搅拌干扰了细菌纤维素的结晶过程, 有利于形成更小尺寸的微纤维, 并诱导  $I_b$  的产生, 因  $I_b$  较  $I_a$  稳定, 因此搅拌能改变纤维素的超分子结构。

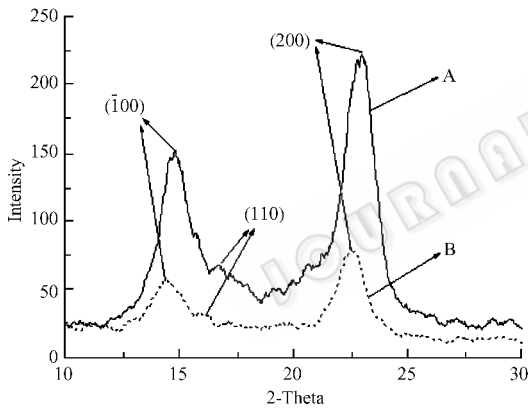


图 4 不同培养方式下得到的细菌纤维素的 XRD 图谱

Fig.4 X-ray diffraction patterns of BC produced in static culture (A) and in the stirred tank reactor (B)

表 1 不同培养方式下得到的细菌纤维素的  $I_a$  含量和晶体结构参数

Table 1 The fraction of cellulose  $I_a$  and crystal structural parameters of BC produced in different culture mode

Structural parameters	Cellulose $I_a$ /f <sub>a</sub>	Cr I / %	Crystallite size/nm
In static culture	0.87	83.8	6.00
In the stirred tank reactor	0.61	73.9	5.47

#### 2.4 静置培养和发酵罐培养细菌纤维素的热稳定性的差异

从热重曲线和差热曲线可得知两种纤维素热裂解分为两个阶段 (图 5), 在低温时, 主要发生纤维素的解聚和脱水反应, 同时生成左旋葡聚糖, 左旋葡聚糖会继续分解为小分子, 如呋喃、醛、酮、芳香烃等, 同时有剩炭形成, 炭的生成可抑制分解反应<sup>[14]</sup>。静置培养得到的纤维素的分解温度是

$317^\circ\text{C}$ , 发酵罐培养得到的纤维素的分解温度是  $264^\circ\text{C}$ , 棉纤维素的分解温度是  $288^\circ\text{C}$ <sup>[15,16]</sup>。静置条件 (A): 两个阶段分别是在温度  $217^\circ\text{C} \sim 401^\circ\text{C}$  之间失重 74.2%,  $401^\circ\text{C} \sim 536^\circ\text{C}$  之间失重 15.5%, 而发酵罐条件 (B): 在温度  $160^\circ\text{C} \sim 378^\circ\text{C}$  之间失重 57.5%,  $378^\circ\text{C} \sim 689^\circ\text{C}$  之间失重 30.2%。棉纤维素: 在温度  $223^\circ\text{C} \sim 382^\circ\text{C}$  之间失重 68%,  $382^\circ\text{C} \sim 529^\circ\text{C}$  失重 28%。从 DTA 曲线来看, 静置培养得到的纤维素与棉纤维<sup>[15]</sup>的第二阶段的放热都非常集中, 为一尖锐的高峰, 而发酵罐培养得到的纤维素的第二阶段的放热效应明显变小, 而且移向高温方向, 说明发酵罐培养得到的纤维素在第一阶段生成的左旋葡聚糖减少, 而形成的剩炭成分相对较多, 这表明静置培养得到的纤维素的热稳定性较好, 发酵罐培养的纤维素的阻燃性较好。

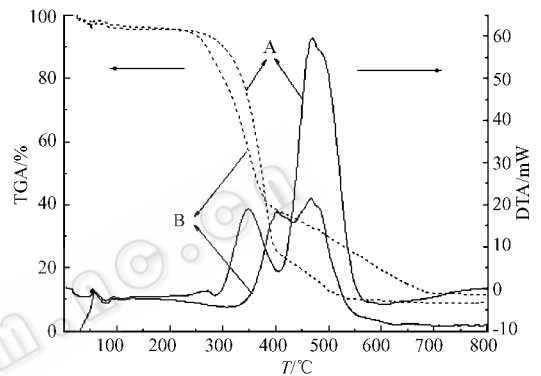


图 5 静置培养 (A) 和发酵罐培养 (B) 得到的细菌纤维素的 TG 和 DTA 曲线

Fig.5 TG and DTA curve of BC produced in static culture (A) and in the stirred tank reactor (B). --- TG curve; — DTA curve.

### 3 结论

*Acetobacter xylinum* NUST4.2 在静置培养 6d 时产纤维素  $7.5\text{g/L}$ , 产率为  $0.052\text{g/L/h}$ , 发酵罐中 3d 产量达  $3.13\text{g/L}$ , 产率达  $0.043\text{g/L/h}$ , 说明该菌株适合静置培养, 但在发酵罐中也能稳定生产纤维素, 关于发酵罐中发酵工艺参数的确定在研究中; 另外 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 在不同培养方式下发酵得到的纤维素的结构差别很大, 尽管搅拌并没有改变纤维素丝带的网状结构、化学结构以及与天然纤维素相同的晶型——纤维素 I 型, 但却干扰了 BC 的微观结构, 即: 静置培养的纤维素丝带相互缠绕且层状重叠、更加致密, 丝带更细, 富含  $I_a$ , 具有更高结晶指数、更大的晶粒尺寸, 静置培养得到的纤维素具有良好的热稳定性, 发酵罐培养得到的纤维素具有良好的阻燃性。本实验中的 *Acetobacter xylinum* NUST4.2 能在发酵罐中稳定产细菌纤维素, 为今后的产业化生产提供一定的基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 贾士儒, 欧兹宇, 傅强. 新型生物材料——细菌纤维素. 食品与发酵工业, 2000, 27(1): 54-58.
- [2] Jonas R, Farah LF. Production and application of microbial

- [ 3 ] Klemm D, Schumann D, Udhardt U, *et al.* Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci*, 2001, **26**: 1561 – 1603.
- [ 4 ] Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, *et al.* Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, **29**: 189 – 195.
- [ 5 ] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [ 6 ] 欧斌宇, 贾士儒, 马 霞. 细菌纤维素发酵培养基的优化. *食品与发酵工业*, 2004, **29**(1): 18 – 22.
- [ 7 ] Czaja W, Romanowicz D, Brown RM. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 2004, **11**: 403 – 411.
- [ 8 ] Mharyan A, Llagostera AP, Karmhag R, *et al.* Moisture sorption by cellulose powders of varying crystallinity. *Int J Pharm*, 2004, **269**: 433 – 442.
- [ 9 ] 张俐娜, 薛 奇, 莫志深, 等. 高分子物理近代研究方法. 湖北 武汉大学出版社, 2003.
- [ 10 ] Ross P, Mayer R, Beziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev*, 1991, **55**(1): 35 – 58.
- [ 11 ] Son HJ, Kim HG, Kim KK, *et al.* Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource Technol*, 2003, **86**: 215 – 219.
- [ 12 ] 周伶俐, 孙东平, 吴清杭, 等. *Acetobacter xylinum* NUST4 合成细菌纤维素发酵条件的优化. *微生物学通报*, 2005, **32**(6): 96 – 99.
- [ 13 ] Imai T, Sugiyama J. Nanodomains of  $I_{\alpha}$  and  $I_{\beta}$  cellulose in algal microfibrils. *Macromolecules*, 1998, **31**: 6275 – 6279.
- [ 14 ] Farooq AA, Price D, Milnes GJ. Use of gas chromatographic analysis of volatile products to investigate the mechanism underlying the influence of flame retardants on the pyrolysis of cellulose in air. *Polym Degrad Stab*, 1991, **33**: 155 – 170.
- [ 15 ] 蔡正千. 热分析. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [ 16 ] 刘振海, 崑山立子. 分析化学手册——第八分册: 热分析. 第二版. 北京: 化学工业出版社. 1999.

## Influence of culture mode on bacterial cellulose production and its structure and property

ZHOU Ling-li, SUN Dong-ping\*, WU Qing-hang, YANG Jia-zhi, YANG Shu-lin

(Bioengineering Department, Institute of Chemical Engineering, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094, China)

**Abstract:** *Acetobacter xylinum* NUST4.2 has been applied in the studies to examine the production, structure and thermal property of bacterial cellulose (BC) produced in stationary culture and in the stirred tank reactor. These differences are as follows: BC yield reached 7.5g/L in stationary culture for 6 days and its productivity was 0.052g/L/h. BC production reached 3.13g/L in the stirred tank reactor for 72h and its productivity was 0.043g/L/h. SEM showed that there was almost no difference between network structure built of entangled cellulose ribbons produced in static culture and in the reactor. But the cellulose ribbons produced in static culture were a much more entangled and denser network with curved and overlapping cellulose ribbons in comparison with that one produced in the stirred tank reactor. Also the thickness of the cellulose ribbons seems to differ between the two BC samples, with the one from static culture distinguished by the slightly thinner ribbons. FT-IR revealed that there was no effect of stirring on the chemical structure of BC, but intermolecular hydrogen bond of cellulose was weakened. Furthermore, BC synthesized in static culture displayed  $I_{\alpha}$ -rich cellulose. XRD results indicated that no remarkable change in the cellulose crystallographic form of the BC samples. Nevertheless, BC produced in static culture was characterized by a higher crystallinity, higher  $I_{\alpha}$  content and higher crystalline size than cellulose that was produced in the reactor. All of these results revealed that stirring in the reactor interfere strongly in the process of nascent microfibrils crystallization, favoring the formation of smaller size microfibrils and increased  $I_{\beta}$ , the more stable allomorph. Compared with cotton cellulose, the changes of thermal decomposition behavior in the BC samples were that BC produced in static culture displayed better thermal stability, but BC produced in the stirred reactor displayed better flame retarding.

**Keywords:** bacterial cellulose; *Acetobacter xylinum*; structure; culture mode

\* Corresponding author. Tel 86-25-84315256; E-mail zlongpingsun@163.com

Received: 5 February 2007/Accepted: 23 April 2007/Revised: 17 June 2007