

研究报告

细菌纤维素发酵培养基的优化及超微观结构分析

毋锐琴, 杜双奎, 李志西, 邢晓晖, 邵东燕, 樊艳丽, 李博, 张学良, 布丽君

西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100

摘要: 为了提高细菌纤维素的产量, 本研究对一株氧化葡糖杆菌菌株 J₂ 液体发酵生产细菌纤维素的培养基进行了优化, 并对其代谢的细菌纤维素的超微观结构进行了观察。运用 Plackett-Burman 试验设计法对 8 个相关影响因素的效应进行了评价, 筛选出了有显著效应的 3 个因素: 酵母膏、ZnSO₄、无水乙醇, 其他 5 个因素的影响未达到显著水平 ($P>0.05$)。然后采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计和响应面分析方法 (RSM) 确定了上述三个因素的最佳浓度, 并且以棉纤维素为对照, 运用扫描电镜观察了细菌纤维素的超微观结构, 结果表明: 菌株 J₂ 利用优化后的发酵培养基生产细菌纤维素的产量为 11.52 g/100 mL, 是优化前的 1.35 倍, 电镜照片显示细菌纤维素微纤维直径 $<0.1 \mu\text{m}$, 比棉纤维细很多, NaOH 处理可以除去纤维网络结构中的菌体。

关键词: Plackett-Burman 设计, Box-Behnken 设计, 响应面分析法, 培养基优化, 超微观结构

Optimization of Bacterial Cellulose Fermentation Medium and Observation of Bacterial Cellulose Ultra-micro-structure

Ruiqin Wu, Shuangkui Du, Zhixi Li, Xiaohui Xing, Dongyan Shao, Yanli Fan, Bo Li, Xueliang Zhang, and Lijun Bu

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

Abstract: In order to improve the yield of bacterial cellulose (BC), the fermentation medium of BC-producing strain J₂ (*Gluconobacter*) was optimized, and BC ultra-micro-structure was observed. Initially, Plackett-Burman design was employed to evaluate eight variables which were relevant to BC production. Three statistically significant parameters including yeast extract, ZnSO₄, ethanol were selected and other 5 variables were not significant ($P>0.05$). The optimized levels of three variables were defined by Box-Behnken design and response surface methodology (RSM). BC ultra-micro-structure was observed by scanning electron microscope (SEM) with cotton cellulose as comparison. The results indicated that the BC yield under the optimum fermentation medium was 11.52 g/100 mL, which was as 1.35 times as that under the original fermentation medium. The SEM photos manifested that bacterial cellulose ribbon, with a diameter less than $0.1 \mu\text{m}$, was less than cotton cellulose ribbon. The bacteria inside the cellulose net were eliminated after the NaOH treatment.

Keywords: Plackett-Burman design, Box-Behnken design, response surface methodology, optimization of fermentation medium, ultra-micro-structure

纤维素是地球上最丰富、经济潜力最为巨大的生物聚合物。合成纤维素不是植物所独有的功能,

某些海洋生物也能够合成动物纤维素, 还有若干细菌能以异养方式比植物更高效地产生胞外纤维

Received: March 13, 2008; Accepted: April 7, 2008

Corresponding author: Zhixi Li. E-mail: lzx580721@yahoo.com.cn

素^[1]。为了和其他来源的纤维素相区别,通常把微生物合成的纤维素称为“生物纤维素(Bio-cellulose)”或“细菌纤维素”(Bacterial cellulose,简称BC)^[2,3]。细菌纤维素是由单纯的D-葡萄糖聚合而成,纯度极高,不掺杂任何其他多糖^[4]。它和植物纤维素的化学组成一致,但纤维微观结构存在差异。与一般的植物纤维素相比,细菌纤维素具有许多优良特性,如: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特点^[5]。作为一种新型的微生物合成材料,细菌纤维素已经在很多方面得到广泛应用,例如在外科治疗中作为皮肤代用品,用于治疗烧伤、溃疡以及皮肤移植手术;用于制造超性能的声音振动膜;还可以作为食品添加剂及纸品添加剂等^[6,7]。

尽管细菌纤维素的理化性质及机械性能优于植物纤维素,并已被证明在工业生产中具有广泛的商业应用前景^[8,9],但由于细菌纤维素的产量低,生产成本高,使其应用受到限制。细菌纤维素的生物合成是一个复杂的过程,为了提高其产量可以从多方面入手,寻找适合菌株生长代谢的营养源以及发酵方式是一条可行的途径。

Plackett-Burman 试验设计和响应面分析方法(RSM)具有试验次数少,周期短,求得回归方程精度高等特点,受到越来越多的重视,已成功地应用于发酵培养基、培养条件的优化^[10],但目前应用该方法研究细菌纤维素的报道尚且少见。笔者在前期工作中分离筛选得到一株性能优良的氧化葡萄糖杆菌株 J₂,本研究从优化营养源入手,采用上述两种优化设计方法,对菌株 J₂ 发酵生产细菌纤维素的发酵培养基的诸多营养因素进行了考察和评价,并对其主要因素进行了优化,为进一步研究提供依据^[11]。有研究报道^[12]培养基成分会对细菌纤维素结构及性质产生影响,所以本研究还对菌株 J₂ 生产的细菌纤维素的超微观结构进行了观察研究,为细菌纤维素材料的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器

菌种:菌株 J₂,本实验室从荞麦醋中分离获得。

仪器:超净工作台 AIRTECH(苏净集团安泰公司);PYX-DHS 恒温培养箱(上海市跃进农场医疗仪

器厂);HZS-H 恒温水浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂);FA2004 电子天平(上海精科);JSM-35CF 型扫描电镜(日本电子)。药品试剂均为分析纯。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基

葡萄糖 2%,酵母膏 0.5%,K₂HPO₄0.1%,MgSO₄1.5%,乙醇 1.5%,琼脂 1.7%,pH 自然。

1.2.2 种子培养基

葡萄糖 7%,酵母膏 0.5%,K₂HPO₄0.5%,MgSO₄1.5%,乙醇 2%,pH 自然。

1.2.3 基础发酵培养基

葡萄糖 2%,酵母膏 0.5%,K₂HPO₄0.1%,MgSO₄1.5%,乙醇 1.5%,pH 自然。

1.2.4 优化发酵培养基

碳源 3%(葡萄糖:蔗糖=1:2),酵母膏 0.3%,FeSO₄ 0.4%,ZnSO₄ 0.1%,K₂HPO₄ 0.1%,MgSO₄1%,苹果酸 0.3%,乙醇 0.5%,pH 自然。

1.2.5 培养方法

种子培养:挑取一环活化好的斜面菌种至装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30°C,150 r/min 振荡培养 24 h。

发酵培养:按照 7%的接种量,将种子培养基接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 广口瓶中,8 层纱布封口后,30°C 静置培养 5 d。

1.3 细菌纤维素膜的制备和处理方法

恒温静置培养 5 d 后,在培养液表面产生一层厚厚的细菌纤维素膜,将膜取出后,用水多次冲洗,再将膜浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,80°C 恒温 2 h,至膜呈乳白色半透明状,然后用 0.5%乙酸溶液浸泡,再用蒸馏水冲洗纤维素膜,至 pH 试纸测其表面为中性时,沥干表面水分,即为纤维素湿膜,细菌纤维素产量表示为:g 纤维素湿重/100mL 培养液^[6]。

1.4 细菌纤维素膜的电镜观察

将处理好的细菌纤维素膜,都先用 3%(体积浓度)的戊二醛溶液固定一夜,然后用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,再用体积分数分别为 15%、30%、50%、70%的乙醇依次各浸泡 15 min,再用体积分数分别为 80%、90%、95%的乙醇脱水 20 min,然后用无水乙醇脱水 3 次,每次 30 min,最后用醋酸异戊酯置换 2 次,每次 20 min,临界点干燥后用扫描电子显微镜进行观察。

1.5 试验设计

1.5.1 Plackett-Burman 试验设计

根据微生物代谢生产细菌纤维素的一般影响因素及笔者前期的试验,本研究选取葡萄糖/蔗糖、酵母膏、FeSO₄、ZnSO₄、K₂HPO₄、MgSO₄、苹果酸、无水乙醇为关键影响因素,因素水平及编码见表 1,以细菌纤维素湿重为评价指标,数据分析及模型建立由 Design Expert 软件完成。

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 chosen for Plackett-Burman design

Variable	Symbol	Coded levels	
		-1	1
Glucose/sucrose	X_1	1:3	1:1
Yeast extract	X_2	0.2	0.4
FeSO ₄	X_3	0.3	0.5
ZnSO ₄	X_4	0.05	0.15
K ₂ HPO ₄	X_5	0.05	0.15
MgSO ₄	X_6	0.5	1.5
malic acid	X_7	0.2	0.4
ethanol	X_8	0.3	0.7

1.5.2 响应曲面(RSM)试验设计

筛选出显著影响细菌纤维素产量的因素后,采用 Box-Behnken 设计,对显著影响因素作进一步研究,以期获得较优的细菌纤维素发酵培养基。由 Plackett-Burman 试验结果确定酵母膏、ZnSO₄、无水乙醇是影响细菌纤维素发酵培养基的显著因素。因此将这三个因素作为 Box-Behnken 设计所要考察的变量,因素水平及编码见表 2,试验方案见表 4,表 4 中的试验结果为 3 次试验的平均值。

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 extract	x_1	X_1	0.2	0.3	0.4
ZnSO ₄	x_2	X_2	0.05	0.1	0.15
Ethanol	x_3	X_3	0.3	0.5	0.7

the relation between coded level and uncoded level satisfied following equations:

$$x_1=(X_1-0.3)/0.1; x_2=(X_2-0.1)/0.05; x_3=(X_3-0.5)/0.2$$

2 结果与分析

2.1 影响细菌纤维素发酵培养基主要因素的筛选

以葡萄糖/蔗糖、酵母膏、FeSO₄、ZnSO₄、K₂HPO₄、MgSO₄、苹果酸、无水乙醇为考察因素,按照 Plackett-Burman 设计进行了 12 组试验。对试验结果进行分析认为(表 3),影响菌株 J₂ 发酵生产细菌纤维素的显著因素为酵母膏 ($P=0.0051$), ZnSO₄ ($P=0.0228$), 无水乙醇 ($P=0.0017$)。因此选择这 3 个因素作为影响菌株 J₂ 代谢生产细菌纤维素的关键因素,进一步研究它们对菌株发酵代谢的影响,其它 5 个因素影响未达到显著水平,在下一步的研究中不予考虑。

表 3 Plackett-Burman 试验主效应分析

Table 3 analysis of the main effects for the Plackett-Burman design

Variable	Coefficient estimate	T value	P value	Significance
Intercept	9.67	-	-	
Glucose/sucrose	0.11	0.81	0.4795	
Yeast extract	1.04	7.39	0.0051	**
FeSO ₄	0.046	0.33	0.7622	
ZnSO ₄	-0.61	-4.32	0.0228	*
K ₂ HPO ₄	0.18	1.25	0.3000	
MgSO ₄	0.45	3.22	0.0504	
Malic acid	-0.052	-0.37	0.7349	
Ethanol	1.50	10.69	0.0017	**

** $P=0.01$, * $P=0.05$

2.2 发酵培养基的优化

2.2.1 培养基与产量关系的二次方程的建立

在 Plackett-Burman 试验的基础上,对影响菌株 J₂ 代谢生产细菌纤维素的关键因素按照 Box-Behnken 设计进行了 17 组试验,其结果见表 4。利用 Design-Expert 软件对表 4 数据进行二次多项式拟合,获得细菌纤维素产量(Y)对自变量酵母膏(x_1), ZnSO₄(x_2), 无水乙醇(x_3)的多元回归方程: $Y=9.38+0.78x_1+1.36x_3-0.97x_1^2-0.60x_2^2-0.44x_3^2-0.42x_2x_3$

从该方程的方差分析可知(表 5),该模型极显著 ($P=0.0001$),失拟项不显著 ($P=0.1968$),预测值与真实值之间具有高度的相关性 ($R^2=0.9724$),仅有 6.3% 的变异不能由该模型解释 ($R_{Adj}^2=0.9370$),说明该模型与实际拟合良好,可以用于细菌纤维素发酵的分析和预测。从回归方程系数显著性检验可知(表 6),在模型参数中, x_3 对细菌纤维素产量的影响极显著,

x_1 , x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 对细菌纤维素产量的影响显著, x_2 和 x_3 之间的交互作用对细菌纤维素产量的影响显著, x_2 , x_1 和 x_3 , x_1 和 x_2 之间的交互作用对细菌纤维素产量的影响不显著。

表 4 Box-Behnken 设计及细菌纤维素产量的实测值与预测值

Table 4 Box-Behnken design and experimental and predicted value of bacterial cellulose

Trial No.	Yeast extract	ZnSO ₄	Ethanol	Yield of BC (g/100 mL)	
				Experimental values	Predicted values
1	-1	-1	0	7.05	7.05
2	1	-1	0	8.00	8.22
3	-1	1	0	7.24	7.02
4	1	1	0	8.97	8.97
5	-1	0	-1	5.37	5.68
6	1	0	-1	7.45	7.54
7	-1	0	1	8.79	8.70
8	1	0	1	10.28	9.97
9	0	-1	-1	6.69	6.38
10	0	1	-1	7.69	7.59
11	0	-1	1	9.86	9.95
12	0	1	1	9.16	9.47
13	0	0	0	9.01	9.38
14	0	0	0	9.55	9.38
15	0	0	0	9.58	9.38
16	0	0	0	9.21	9.38
17	0	0	0	9.57	9.38

表 5 细菌纤维素发酵培养基多元二次方程方差分析表
Table 5 ANOVA for the regression equation of cultivation for bacterial cellulose

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value
Model	27.85	9	3.09	27.44	0.0001
Lack of Fit	0.52	3	0.17	2.52	0.1968
Pure Error	0.27	4	0.068		
Total	28.64	16			

分别对方程各自变量(x_1 、 x_2 、 x_3)求极值, 得到极值点为: $x_1=0.310$, $x_2=-0.151$, $x_3=1$, 相当于酵母膏 0.33%, ZnSO₄0.09%, 无水乙醇 0.7%。在此最优条件下, 预测细菌纤维素的最大产量为 10.42 g/100 mL。为验证模型的准确性和有效性, 用预测的最优发酵培养基进行发酵试验, 得到实际细菌纤维素产量为 11.52 g/100 mL, 进一步证明该模型能预见实际发酵情况, 细菌纤维素产量是优化前的(8.52 g/100mL) 1.35 倍。

2.2.2 细菌纤维素发酵培养基响应面交互作用分析与优化

根据模型方程所作的响应曲面图及等高线图见图 1~3。通过该组动态图可评价试验因素对细菌纤维素产量的两两交互作用, 以及确定各个因素的最佳水平范围。

图 1 显示了酵母膏位于中心水平时, ZnSO₄ 和无水乙醇的交互作用对细菌纤维素产量的影响。从其等高线图可以直观地看出此两因素的交互作用显著。等高线的形状可以反映出交互效应的强弱大小, 圆形表示两交互作用不显著, 椭圆形表示两交互作

表 6 细菌纤维素发酵培养基回归方程系数显著性检验

Table 6 Regression coefficients and their significance of the cultivation for bacterial cellulose

Variable	Coefficient estimate	Standard error	T value	P value	Significance
Intercept	9.38	0.15	-	-	
x_1 -yeast extract (%)	0.78	0.12	6.52	0.0001	**
x_2 -ZnSO ₄ (%)	0.18	0.12	1.53	0.1604	
x_3 -ethanol (%)	1.36	0.12	11.39	<0.0001	**
x_1^2	-0.97	0.16	-5.90	0.0002	**
x_2^2	-0.6	0.16	-3.62	0.0056	**
x_3^2	-0.44	0.16	-2.66	0.0262	*
x_1x_2	0.19	0.17	1.16	0.2844	
x_1x_3	-0.15	0.17	-0.89	0.4052	
x_2x_3	-0.42	0.17	-2.51	0.0335	*

** $P=0.01$, * $P=0.05$

用显著^[13]。从图 1 可以看出,随着 ZnSO₄浓度的提高,细菌纤维素的产量呈现先增加后减少的趋势,当 ZnSO₄浓度为 0.1%时,细菌纤维素产量达到本次试验中的最大值。随着无水乙醇浓度的提高,细菌纤维素的产量呈现增加的趋势,当乙醇浓度达到 0.7%时,细菌纤维素产量达到本次试验中的最大值。而且当无水乙醇浓度较高时,ZnSO₄对细菌纤维素产量的影响较大,无水乙醇浓度较低时,ZnSO₄对细菌纤维素产量的影响较小。当 ZnSO₄浓度为 0.1%,无水乙醇浓度为 0.7%时,细菌纤维素的产量可以达到本次试验的最大值以上。

图 2 显示了 ZnSO₄位于中心水平时,酵母膏和无水乙醇的交互作用对细菌纤维素产量的影响。从其等高线图可以看出此两因素对细菌纤维素产量的影响不显著,随着酵母膏浓度的升高,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,酵母膏对细菌纤维素产量的影响较大,当无水乙醇浓度较低时,酵母膏对细菌纤维素产量的影响较小。在试验因素水平范围之内,细菌纤维素产量随着无水乙醇浓度的升高而增加。由图 2 可知,当无水乙醇浓度在 0.7%,酵母膏浓度在 0.3%~0.35%范围内时,细菌纤维素产量达到本次试验的最大值。

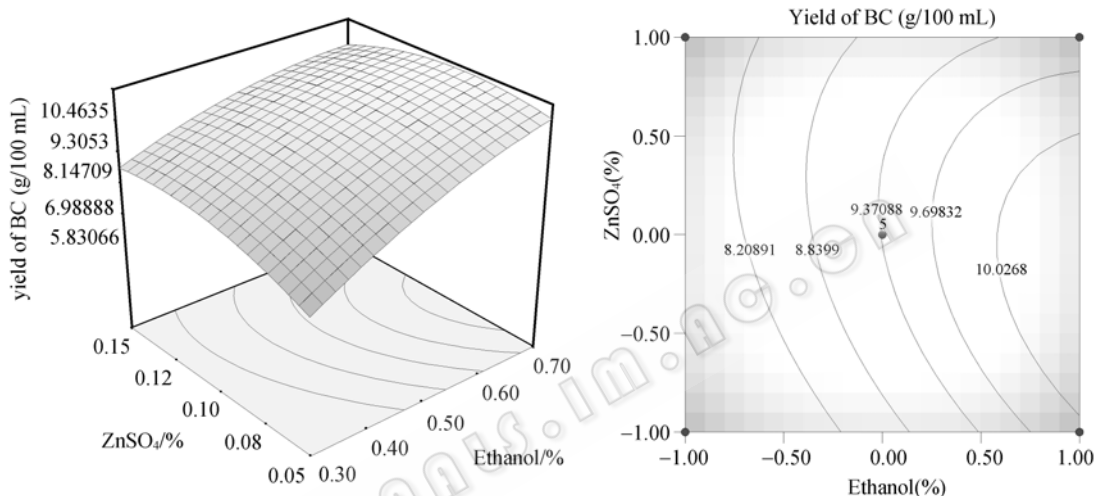


图 1 ZnSO₄及无水乙醇交互影响细菌纤维素产量的响应曲面图及等高线图

Fig. 1 Response surface plot and contour plot for the interaction effects of ZnSO₄ and ethanol on the yield of BC

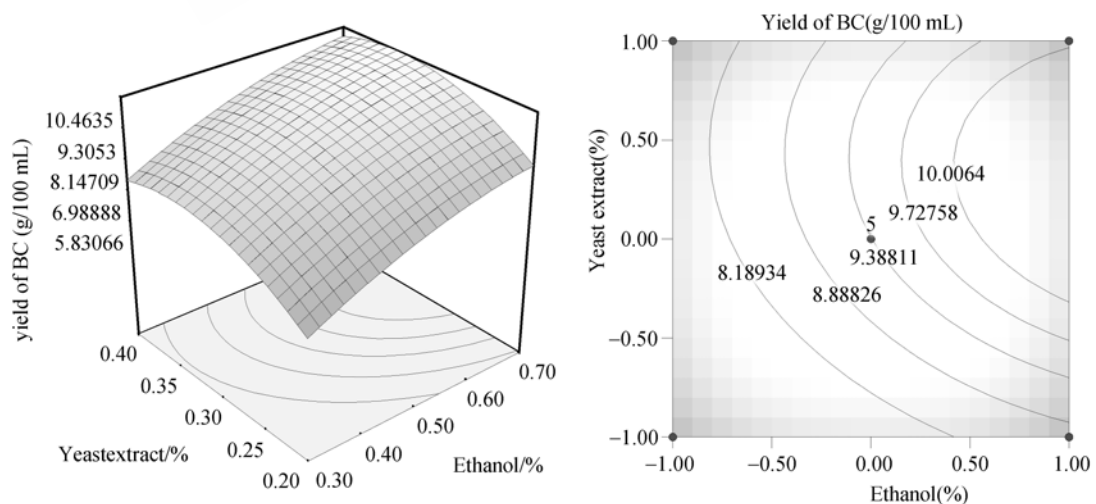


图 2 酵母膏及无水乙醇交互影响细菌纤维素产量的响应曲面图及等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour plot for the interaction effects of yeast extract and ethanol on the yield of BC

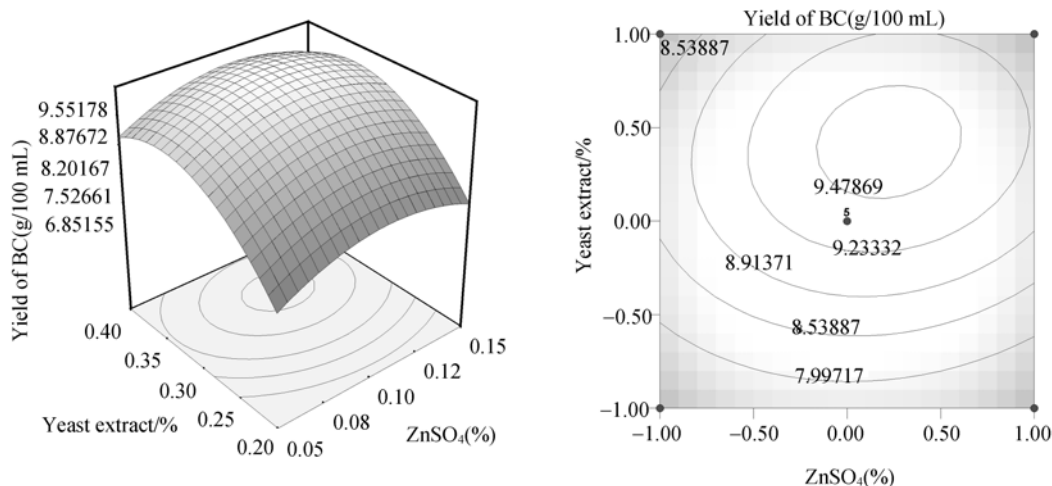


图 3 酵母膏及 ZnSO₄ 交互影响细菌纤维素产量的响应曲面图及等高线图

Fig. 3 Response surface plot and contour plot for the interaction effects of yeast and ZnSO₄ on the yield of BC

图 3 显示了无水乙醇位于中心水平时, 酵母膏和 ZnSO₄ 的交互作用对细菌纤维素产量的影响。从其等高线图可以直观的看出此两因素的交互作用不显著。当酵母膏浓度较低时, ZnSO₄ 对细菌纤维素产量的影响不大, 当酵母膏浓度较高时, ZnSO₄ 对细菌纤维素产量的影响呈现先增大后减少的趋势; 随着酵母膏浓度的增大, 细菌纤维素产量先增大后减少。

2.3 细菌纤维素微观结构

以棉纤维为对照, 利用扫描电子显微镜对菌株 J₂ 以优化后的发酵培养基生产的细菌纤维素的超微观结构进行观察, 结果如图 4~6:

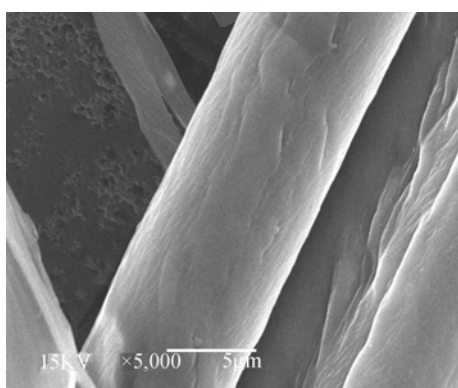


图 4 棉纤维照片

Fig. 4 Microscopic picture of cotton cellulose(5000×)

从这组图上可以直观地看出, 细菌纤维素纤维的直径比棉纤维要细很多, 而且超微纤维相互缠绕, 组成了一定的超微纤维网, 这种结构就决定了

细菌纤维素具有一些非凡的特性, 比如: 很强的亲水性和良好的透水性能, 为其实际应用提供了理论依据。从图 5 和图 6 可以得出结论: 细菌纤维素膜表面及膜内部分布着大量菌体, 利用 1.3 的方法处理细菌纤维素膜, 可以除去膜上附带的菌体, 得到更为纯净的细菌纤维素膜, 以利于进一步加工利用。

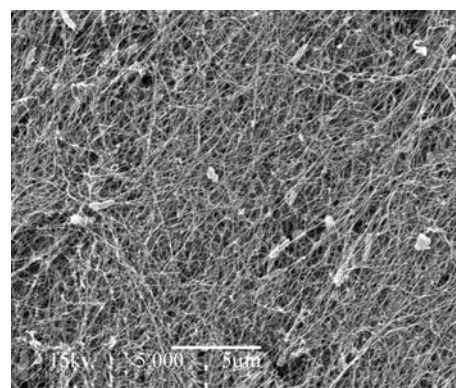


图 5 NaOH 处理后的细菌纤维素膜照片

Fig. 5 Microscopic picture of bacterial cellulose treated by NaOH (5000×)

3 结论

3.1 本研究采用了 Plackett-Burman 试验设计, 对影响菌株 J₂ 代谢生产细菌纤维素的 8 个因子进行了评价, 筛选出了酵母膏、ZnSO₄、无水乙醇为影响细菌纤维素产量的关键因子。

3.2 通过响应面法(RSM)建立了细菌纤维素发酵培养基的回归模型,该模型高度显著,可用于实际预测。

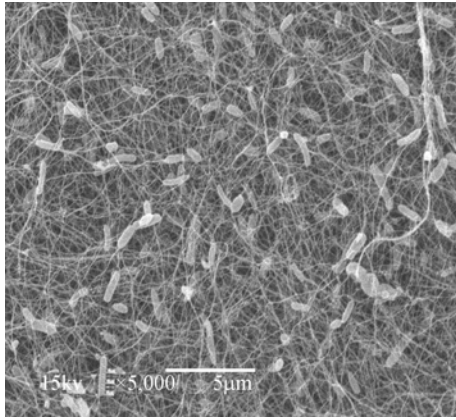


图6 NaOH未处理的细菌纤维素膜照片
Fig. 6 Microcosmic picture of bacterial cellulose not treated by NaOH (5000×)

3.3 优化后的发酵培养基为:碳源3%(葡萄糖:蔗糖=1:2),酵母膏0.33%, FeSO_4 0.4%, ZnSO_4 0.09%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 1%,苹果酸0.3%,无水乙醇0.7%,与原基础发酵培养基相比,使得细菌纤维素的产量提高了1.35倍。

3.4 以棉纤维为对照,利用扫描电镜观察了细菌纤维素的超微观网络结构,证明了细菌纤维素相比植物纤维的优越性。

REFERENCES

- [1] Strobin G, Wlochowica A. GPC studies on bacterial cellulose. *International Journal of Polymeric Materials*, 2004, **53**(10): 889–900.
- [2] Tokoh Chisuzu, Takabe Keiji, Sugiyama Junji, *et al.* Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of plant cell wall polysaccharides. *Cellulose*, 2002, **9**(1): 65–74.
- [3] Kim Dae-Young, Nishiyama Yoshiharu, Kuga Shigenori. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2002, **9**(3-4): 361–367.
- [4] Peter Ross, Raphael Mayer, Moshe Benziman. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 1991, **55**(1): 35–58.
- [5] Choi Yong-Jin, Ahn Yeonghee, Kang Moon-Sung, *et al.* Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, **79**(1): 79–84.
- [6] Heu FS, Wng CL, Shyu YT. Fermentation of monascus purpureus on bacterial cellulose-nata and the color stability of monascus-nata complex. *Food Microbiology and Safety*, 2000, **65**(2): 342–345.
- [7] Danuta C. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite material for medical applications. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 2004, **12**(4): 69–72.
- [8] Mormino R, Bungay H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **62**(5-6): 503–513.
- [9] Frank J, Miskiel Utilizing Cellulon cellulosic fiber for binding in nonwoven application. *Tappi Journal*, 1998, **81**(3): 183–186.
- [10] Adinarayana K, Ellaiah P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *B. acillus* sp. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2002, **5** (3): 272–278.
- [11] Kalil SJ, maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 2000, **35**(6): 539–550.
- [12] Yamanaka Shigeru, Ishihara Masaru, Sugiyama Junji. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2000, **7**(3): 213–225.
- [13] THOMPSON DD. Response surface experimentation. *Food Processing and Preservation*, 1982, **6**(3): 155–188.