

淀粉废水发酵产细菌纤维素 发酵条件的优化

徐 伟¹, 张 妍¹, 傅徐阳²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 国家乳制品质量监督检验中心, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘 要:以玉米淀粉废水添加葡萄糖20g/L, 玉米浆40g/L, 乙醇150mL/L为发酵基质, 采用单因素和正交实验设计对葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)发酵产细菌纤维素条件进行优化。结果表明, 最佳发酵条件为: 装液量80mL/250mL, pH4.0, 接种量9%(V/V), 温度28℃; 在此条件下得到细菌纤维素产量为4.41g/L。采用傅立叶转换红外光谱FTIR验证产物为细菌纤维素, 并由SEM扫描电镜观察纤维素膜表面形貌。

关键词:玉米淀粉废水, 细菌纤维素, 条件优化, FTIR, SEM

Optimization of culture conditions of producing bacterial cellulose utilizing starch wastewater

XU Wei¹, ZHANG Yan¹, FU Xu-yang²

(1. Food Engineering Institute, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China;

2. National Dairy Testing Center, Harbin 150086, China)

Abstract: The culture conditions of *Gluconacetobacter xylinus* producing bacterial cellulose utilizing corn starch wastewater (adding glucose 20g/L, corn steep liquor 40g/L, ethanol 150mL/L) were investigated through single-factor and orthogonal tests. The suitable culture conditions were as follows: liquid level was 80mL in 250mL triangle bottle, pH4.0, inoculation volume was 9% (V/V), culture temperature was 28℃, the the yield of bacterial cellulose reached the peak (4.41g/L) at this time. The bacterial cellulose was verified by FTIR, SEM was used to observe the surface pattern of bacterial cellulose membrane.

Key words: corn starch wastewater; bacterial cellulose; optimization of conditions; FTIR; SEM

中图分类号: TS205.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)20-0184-04

我国是世界上淀粉产量仅次于美国的第二生产大国, 玉米淀粉废水的主要成分为淀粉、糖类、蛋白质、纤维素等有机物质和亚硫酸^[1], 玉米淀粉生产废水不经处理直接外排, 会对环境造成严重污染^[2]。细菌纤维素 (Bacterial Cellulose, 简称BC) 为近年来备受国内外研究人员关注的新型可降解材料^[3], 与天然纤维素相比, BC具有许多独特的性质^[4-6], 在结构和性质上尤其在机械性能方面表现出独特的优越性, 具有广泛的应用范围^[7]。以玉米淀粉废水添加一定营养因子^[8]为原料, 接种从红茶菌中分离出产细菌纤维素种葡糖醋杆菌^[9] (*Gluconacetobacter xylinus*), 可充分利用废水中的营养成分, 既提高纤维素产量, 又降低纤维素生产成本, 解决细菌纤维素不能进行工业化生产的重大问题^[10], 为玉米淀粉废水资源化利用高效生产天然生物可降解材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葡糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 本实验室从红茶菌中分离得到并保藏; 玉米淀粉废水 取自工厂的工艺废水, 即胚芽分离洗涤废水、纤维分离洗涤废水、蛋白分离洗涤废水和淀粉精制乳废水的混合废水; 斜面培养基 (HS培养基) 葡萄糖20g/L, 蛋白胨5g/L, 酵母浸出物5g/L, Na₂HPO₄ 2.7g/L, 柠檬酸1.15g/L, 琼脂18g/L, pH5; 发酵培养基 玉米淀粉废水1L, 葡萄糖20g/L, 玉米浆40g/L, 乙醇150mL/L。

S-3400扫描电子显微镜、E-1010离子溅射镀膜仪 HITACHI公司; 360 FI-IR ESP傅立叶红外光谱仪 美国Nicolte公司; LDZX-50KB立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; BS 224S电子天平 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; DHP-9162电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种制备 将葡糖醋杆菌保藏菌种转接于新鲜试管斜面, 30℃培养48h, 转接2次后从斜面培养基中挑取2环接种于装有100mL液体斜面培养基的250mL三角瓶中, 30℃静止培养48h后, 保存于4℃冰

收稿日期: 2012-07-26

作者简介: 徐伟 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵工程。

箱备用。

1.2.2 纤维素产量测定方法 将纤维素膜至于0.1mol/L NaOH溶液中煮沸1h, 去除表面菌体及残留培养基, 蒸馏水冲洗至表面为中性, 80℃恒温干燥至恒重, 称其质量即为纤维素产量。

1.2.3 单因素实验方法

1.2.3.1 pH对纤维素产量影响实验 将发酵培养基的pH分别调至1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0。接种8% (V/V) 液体种子, 装液量为100mL/250mL三角瓶, 30℃静止培养7d, 测细菌纤维素产量。

1.2.3.2 接种量对纤维素产量影响实验 分别将2%、4%、6%、8%、10%、12%、14% (V/V) 液体种子接种于发酵培养基中, 装液量为100mL/250mL三角瓶, 30℃静止培养7d, 测细菌纤维素产量。

1.2.3.3 装液量对纤维素产量影响实验 将发酵培养基分别按25、50、75、100、125、150、175mL分装于250mL三角瓶。接种8% (V/V) 液体种子, 30℃静止培养7d, 测细菌纤维素产量。

1.2.3.4 温度对纤维素产量影响实验 将8% (V/V) 液体种子接种于发酵培养基中, 装液量为100mL/250mL三角瓶, 分别于15、20、25、30、35、40℃下静止培养7d, 测细菌纤维素产量。

1.2.4 正交实验方法 为确定最优培养条件, 在单因素实验基础上选取4因素3水平进行 $L_9(3^4)$ 正交实验, 水平与因素选择见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test design

水平	因素			
	A pH	B 接种量 (%, V/V)	C 装液量 (mL/250mL)	D 培养温度 (℃)
1	3.5	8	70	28
2	4.0	9	80	29
3	4.5	10	90	30

1.2.5 傅立叶红外光谱分析 取在最优发酵条件下发酵24h的细菌纤维素薄膜, 蒸馏水反复冲洗去除表面菌体及培养基, 滤纸吸取表面水分, 自然条件下风干制得细菌纤维素膜置于仪器光束中进行测定, 扫描范围4000~370 cm^{-1} 。

1.2.6 SEM扫描电镜观察 取在最优发酵条件下发酵7d的细菌纤维素膜, 洗涤干燥后用导电胶带粘在扫描电镜样品台上, 将样品表面镀膜后放入样品盒中待检。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

pH、接种量、装液量和温度对细菌纤维素产量影响结果如图1~图4所示。当pH为4时, 该菌株生长旺盛, 细菌纤维素膜产量最高, 产量为3.23g/L; 随接种量增加, 纤维素产量有所提高, 当接种量大于10%时, 产量则没有明显提高, 从经济效益考虑, 接种量10%为最适, 纤维素膜产量达3.10g/L; 静态发酵时, 好氧菌只能利用液层表面的气相氧, 当装液量较小时, 液层较浅, 菌体对氧气利用充分, 但由于培养基质较少, 产量不高; 随液层深度增加, 深层好氧菌不

能得到充足氧气, 菌体生长繁殖受到抑制, 导致纤维素产量下降, 当装液量为75mL/250mL时, 纤维素膜产量最高达3.20g/L; 当培养温度为30℃时, 纤维素膜产量最高达2.92g/L。

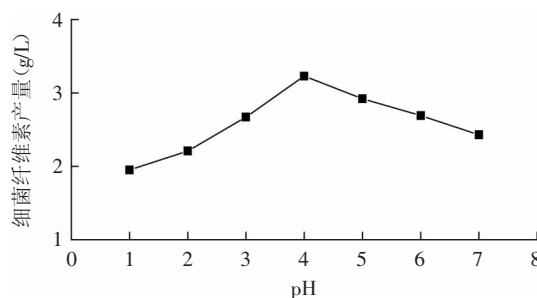


图1 pH对纤维素产量的影响

Fig.1 Effect of pH on the yield of bacterial cellulose

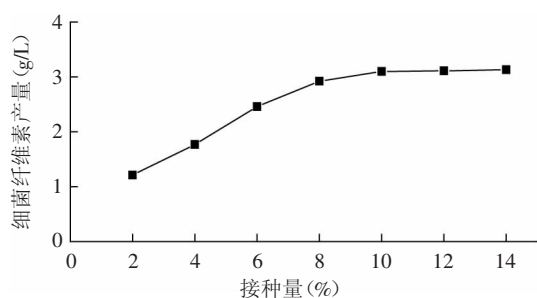


图2 接种量对纤维素产量的影响

Fig.2 Effect of inoculated-pathogen quantities on the yield of bacterial cellulose

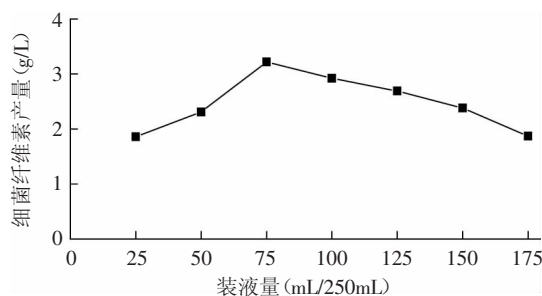


图3 装液量对纤维素产量的影响

Fig.3 Effect of liquid level on the yield of bacterial cellulose

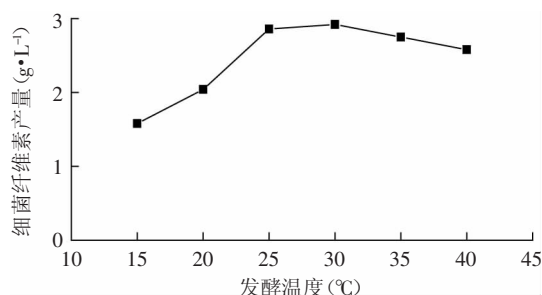


图4 温度对纤维素产量的影响

Fig.4 Effect of temperature on the yield of bacterial cellulose

2.2 正交实验结果

培养条件正交实验结果及直观分析表见表2。由表2可知, 各发酵条件对纤维素产量影响大小次序为装液量>pH>接种量>温度, 发酵条件最优组合为

A₂B₂C₂D₁即装液量80mL/250mL, pH4.0, 接种量9% (V/V), 温度28℃。采用最佳发酵条件进行验证实验, 纤维素膜产量可达4.41g/L, 均高于表2中所有组合的产量。

表2 培养条件正交试验结果及直观分析表

Table 2 The intuitive analysis chart and result of the culture conditions orthogonal test

实验号	A	B	C	D	纤维素膜产量(g/L)
1	1	1	1	1	3.48
2	1	2	2	2	4.29
3	1	3	3	3	3.69
4	2	1	2	3	4.36
5	2	2	3	1	4.10
6	2	3	1	2	3.87
7	3	1	3	2	3.53
8	3	2	1	3	3.65
9	3	3	2	1	4.13
k ₁	3.82	3.79	3.67	3.93	
k ₂	4.11	4.01	4.26	3.90	
k ₃	3.77	3.90	3.77	3.90	
R	0.34	0.22	0.59	0.03	

2.3 细菌纤维素膜红外光谱分析

细菌纤维素膜红外光谱如图5所示, 由图5可知, 玉米淀粉废水发酵培养的细菌纤维素膜在3600~3330cm⁻¹处表现为一个大地吸收带, 在3349.15cm⁻¹有强的吸收, 这是O-H的伸缩振动吸收峰, 说明分子中含有大量-OH, 而且-OH高度缔合, 氢键较强; 2896.46cm⁻¹处的吸收峰则是由C-H伸缩振动产生的, 1649.20cm⁻¹处的吸收峰是由纤维素4'端的半缩醛基引起的, 1428.35cm⁻¹处的吸收峰代表着C-O-H的伸缩振动峰, 1336.18cm⁻¹处的吸收谱带为C-H键的弯曲振动产生的, 1060.13cm⁻¹处的吸收峰, 是由C-O键的伸缩振动引起的, 是纤维素分子的特征峰^[1]。利用红外光谱测出原料中可能存在的有机基团有: -OH、-CH₂、-CH、C-O等, 这些基团与纤维素分子结构式中所包含的有机化合物基团基本吻合, 并与之前研究结果相符^[12-13]。

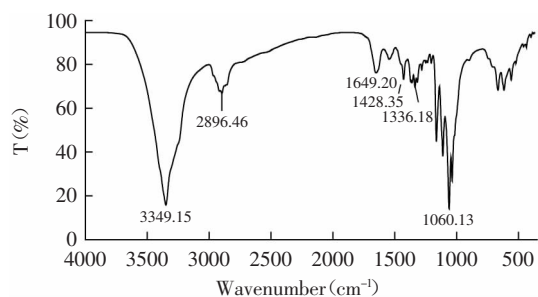


图5 细菌纤维素膜红外光谱图

Fig.5 Infrared spectra of bacterial cellulose membrane

2.4 细菌纤维素膜结构表征

由玉米淀粉废水直接发酵产生的天然纤维素膜扫描电镜观察表面结构如图6所示。由图6可以看出, 膜表面几乎没有孔洞, 结构紧密; 天然获得的纤维素膜与再生后的纤维素膜相比^[14], 表面欠光滑, 在后续的研究中已对该问题进行实验, 获得良好效果。

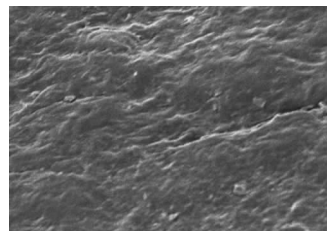


图6 细菌纤维素膜扫描电镜图(×2000)

Fig.6 SEM image of bacterial cellulose membrane (×2000)

3 结论

利用葡萄糖醋杆菌发酵玉米淀粉废水生产细菌纤维素, 说明利用廉价基质生产细菌纤维素的可行性, 并优化其发酵条件为装液量80mL/250mL, pH4.0, 接种量9% (V/V), 温度28℃, 产量达4.41g/L。该方法得到的细菌纤维素膜为半透明状, 利用时无需进行脱色处理; 在发酵过程中无需通入无菌空气, 能源消耗少, 成本低廉。同时通过微生物发酵途径获得的纤维素在结构和性质上有着独特的优越性^[15], 经再加工后可应用于食品、生物医药学、组织工程支架材料、声学器材以及造纸、化妆品、采油、膜过滤器等诸多领域^[16]。以该方法生产细菌纤维素, 实现由微生物完成食品工业废弃物到天然生物材料的转化。

参考文献

- [1] 马道文, 杨劲峰. 玉米淀粉生产废水资源化及处理技术研究[J]. 河北化工, 2010, 33(7): 74-77.
- [2] 王焯良. 淀粉行业污水处理系统设计及控制策略的研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2008.
- [3] 陆胜民, 贾静静, 杨颖. 细菌纤维素发酵工艺与应用研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 47(1): 27-31.
- [4] Kenji T, Masashi F, Mitsuo T, et al. Synthesis of Acetobacter Xylinum bacterial cellulose composite and its meth.strength and biodegradability[J]. Mokuzai Gakkaishi, 1995, 41(8): 749-757.
- [5] Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska Jezierska A, et al. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose[J]. Journal of Industrial microbiology, 2002, 29: 189-195.
- [6] Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic relevant for starter cultures selection[J]. Int J Food Microbiol, 2008; 125(1): 46-53.
- [7] Membrane & Separation Technology News Group. Bacterial cellulose metallized for PEMs[J]. Membrane & Separation Technology News, 2002, 20(6): 6.
- [8] Mahadevaswamy U R, Anu A. Optimaization of culture for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(4): 781-787.
- [9] Vu Tuan N, Bernadine F, Michael J, et al. Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha[J]. Current Microbiology, 2008; 57(5): 449-453.
- [10] 谢健健, 洪枫. 细菌纤维素发酵原料的研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2011, 19(3): 68-77.
- [11] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 2001, 485-498.
- [12] Hui-Huang Chen, Li-Chen Chen, Huang-Chan Huang, et al. In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by

甜叶菊糖基转移酶UGT76G1的克隆表达及其性质研究

刘欢,李艳*,严明,陈圣,郝宁,许琳

(南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 210009)

摘要:目的:利用甜叶菊糖基转移酶UGT76G1特异性催化甜菊糖中含量高并且具有较强后苦味的甜菊甙生成高甜度的莱鲍迪甙A。方法:将合成的UGT76G1编码基因插入pYES2载体的EcoR I和Xho I酶切位点之间,成功构建了pYES2-UGT重组质粒。重组质粒导入表达宿主酿酒酵母YPH499中,利用2%半乳糖对重组菌进行诱导表达。结果:确定了最佳诱导时机为菌体培养后48h,诱导表达时间为12h。并对重组酶粗酶液性质进行了初步研究,确定其最适反应pH为8.0,最适反应温度为40℃,最佳反应时间为36h。结论:为建立经济高效的生物催化法对甜菊糖口味改质奠定了基础。

关键词:甜叶菊,莱鲍迪甙A,糖基转移酶UGT76G1

Cloning, expression and characteristic of glycosyl-transferase UGT76G1 from *Stevia rebaudiana*

LIU Huan, LI Yan*, YAN Ming, CHEN Sheng, HAO Ning, XU Lin

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective: Stevioside which was high in content but has a strong bitter sweet in Steviosides is specifically catalyzed to generate Rebaudioside A high in sweetness by the use of glycosyl transferase UGT76G1. Methods: The synthetic glycosyl-transferase UGT76G1 coding gene after modified was inserted into the vector pYES2 with the restriction site of EcoR I and Xho I in order to construct the recombinant plasmid pYES2-UGT which was then imported to *Saccharomyces cerevisiae* YPH499. The recombinant strain was induced to express by 2% galactose. Results: Determined the best induction start time was 12h. The nature of this restructuring enzyme was investigated and the optimal conditions were investigated as following: the pH of phosphate salt solution was 8.0, the reaction temperature was 40℃, the reaction time was 36h. Conclusion: This study laid a foundation for building an economic and efficient biological catalysis method to modify the taste of Stevioside.

Key words: Stevioside; Rebaudioside A; glycosyl-transferase UGT76G1

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)20-0187-04

甜菊糖 (Steviosides) 是从菊科草本植物甜叶菊 (*Stevia rebaudiana*) 叶中提取的新型天然甜味剂。它是一种发展前景广阔的健康新糖源, 具有高甜度 (为

蔗糖的250~300倍)、低热量 (仅为蔗糖的1/300) 的特性, 无毒副作用, 无致癌物, 食用安全, 对高血压、糖尿病、肥胖症、心脏病、龋齿等病症还有一定的药理作用和辅助疗效, 是理想的蔗糖替代品^[1]。我国是世界上最大的甜菊糖生产国和出口国, 甜菊糖被广泛用于食品、医药、日用化工等行业^[2]。但由于目前市售甜菊糖在口感上存在后苦味, 严重影响了其市场占有率。研究表明, 甜菊糖实际上是多种糖甙的混合物, 不同糖甙在甜度或口感上存在较大的差异^[3]。其中, 甜菊甙 (Stevioside, St甙) 最早被人们发现, 是甜

收稿日期: 2012-04-09 * 通讯联系人

作者简介: 刘欢 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21106068); 江苏省自然科学基金项目 (BK2011801); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20113221120002); 江苏省普通高校自然科学研究计划项目 (10KJB530004)。

adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus* [J]. Cellulose. 2011, 18(6): 1573-1583.

[13] 谭玉静, 洪枫. 细菌纤维素的静态发酵及物理性质研究[J]. 纤维素科学与技术, 2007, 15(4): 1-7.

[14] 王敏, 朱平, 赵晚霞, 等. 细菌纤维素膜的制备与性能[J].

功能高分子学报, 2008, 21(4): 405-410.

[15] 王银存, 李利军, 马英辉, 等. 细菌纤维素生产及应用研究进展[J]. 中国酿造, 2011(4): 20-23.

[16] 武志芳, 张霞, 易彬, 等. 新型生物材料细菌纤维素的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(1): 27-30.