

响应面法优化苹果渣生产 细菌纤维素培养基及产物性能研究

张 雯¹,李宏杰²,刘 兰¹,齐香君¹

(1.陕西科技大学食品与生物工程学院,陕西西安 710021;

2.华东医药集团,浙江杭州 311000)

摘 要:为提高木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)发酵苹果渣水解液生产细菌纤维素(Bacterial cellulose,BC)的产量,采用响应面法对发酵培养基进行优化,同时利用傅里叶红外光谱(FT-IR)和X-射线衍射(XRD)对发酵产物BC的性能和结构进行比较。单因素及响应面实验结果确定木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)发酵苹果渣水解液生产BC的最佳培养基配方为:蔗糖38.44 g、蛋白胨10.91 g、硫酸镁0.85 g、黄嘌呤0.87 g、乙醇10 mL、苹果渣水解液1000 mL、pH6.0,在此条件下BC的产量为7.19 g/L,较优化前(5.65 g/L)提高了27.3%。苹果渣水解液发酵产物BC结构性能与基本培养基发酵产物BC基本一致。说明苹果渣能够替代部分发酵原料发酵生产BC,且不影响BC性能。

关键词:苹果渣,细菌纤维素,培养基优化,响应面法

Optimization of medium for bacterial cellulose fermentation with pomace by response surface methodology and property studies of the product

ZHANG Wen¹, LI Hong-Jie², LIU Lan¹, QI Xiang-Jun¹

(1.School of Food and biological engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2.Huadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311000, China)

Abstract: In order to increase the bacterial cellulose (BC) productivity of *Acetobacter xylinum* using pomace hydrolysate, response surface methodology was used to optimize the fermentation medium. Meanwhile, the properties of BC were compared through fourier transform infrared (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). According to the results of single factor experiments and response surface experiments, the optimal fermentation medium were determined as follows: saccharose 38.44 g, peptone 10.91 g, magnesium sulfate 0.85 g, xanthine 0.87 g, ethanol 10 mL, pomace hydrolysate 1000 mL and pH6.0, under these conditions, the BC productivity was 7.19 g/L, increased by 27.3% in comparison to before (5.65 g/L). The properties and structures of BC produced with pomace hydrolysate were confirmed to be basically same with BC produced with basic medium, which indicated that the pomace hydrolysate could be used as part of raw materials to ferment BC and would not affect the properties of BC.

Key words: pomace; bacterial cellulose; medium optimization; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)23-0228-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.23.039

细菌纤维素(Bacterial cellulose,简称BC)是由生长在液态含糖基质中的革兰氏阴性菌产生的纤维素成分。与植物纤维素相比,BC不含半纤维素和木质素,具有高持水率(大于90%)、高分子量以及较高的结晶度。目前,BC作为一种新型功能材料受到了科学界的广泛关注,已成功地应用于食品、生物医学、膜滤器等多个领域^[1-2]。目前BC的生产原料大

多为椰汁或复合培养基,主要集中在东南亚等国家。单一的生产原料及地域限制使BC存在生产及运输成本过高等问题,只能应用于高附加值产品的开发。降低生产成本、摆脱原料地域限制是我国BC产业面临的一个重大挑战^[3]。

苹果渣是苹果汁加工业的副产物,富含碳水化合物、矿物质等多种营养成分^[4-6]。果汁加工业所产

收稿日期:2015-03-12

作者简介:张雯(1982-),女,博士,副教授,研究方向:生物制药,E-mail:zwlen102@163.com。

基金项目:陕西省科技厅自然科学基金项目(2012JM2005);陕西省教育厅科研专项项目(15JK1108);2013年国家级大学生创新创业训练计划项目(201310708014);西安市科技计划项目(CXY1513(3))。

生的大量苹果渣用作肥料、燃料的占 15%~20% ,用作饲料的约为 10% ,其余绝大部分直接废弃,造成了严重的资源浪费和环境污染。苹果渣中含有的纤维素,经过适当处理后,可以转化为小分子糖,另外,它含有的微量矿物质也是微生物生长繁殖的理想原料。Joshi V.K.等^[7-8]将苹果渣分别接入啤酒酵母、产朊假丝酵母、产蛋白酵母等进行固态发酵,Sandhu 等人^[9]利用酵母发酵苹果渣产生乙醇、粗蛋白和可溶蛋白。本研究拟利用苹果渣水解液作为原料生产 BC,采用响应面法对 BC 发酵培养基进行优化。同时研究发酵产物 BC 性能,探索苹果渣作为发酵原料对 BC 的影响。本研究可为 BC 发酵提供一种廉价原料,为苹果渣的综合利用、附加值的提升和果汁的清洁化生产提供一条新的途径,具有良好的社会效益及经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*);苹果渣 陕西海升果业发展股份有限公司;纤维素酶 700 EGU/g,诺维信中国生物技术有限公司;其余试剂均采用国产分析纯或生化试剂。

固体培养基 蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、磷酸氢二钠 4.40 g、柠檬酸 0.80 g、琼脂 18.00 g、乙醇 10 mL、自来水 1000 mL、pH6.0;种子培养基 蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、磷酸氢二钠 4.40 g、柠檬酸 0.80 g、乙醇 10 mL、自来水 1000 mL、pH6.0;基本发酵培养基 蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、乙醇 10 mL、苹果渣水解液 1000 mL、pH6.0。

D/max2200PC 全自动 X-射线衍射仪 日本 Rigaku; VERTEX 70 傅立叶变换红外光谱仪 德国 Bruker 公司; MG250B 恒温培养箱、HYG-1A 恒温振荡器 上海新瑞仪器有限公司; XPS-8CA 光学显微镜 上海光学仪器有限公司; 752 型紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 测定分析方法

1.2.1.1 还原糖的测定 采用 DNS 法^[10];
1.2.1.2 BC 膜处理 将发酵所得 BC 膜浸泡于 0.10 mol/L NaOH 溶液中,80 ℃ 浸泡 30 min,继续加热煮沸 2 h,再用蒸馏水反复冲洗,直到 pH 为 7.0,冷冻干燥^[11-12];

1.2.1.3 BC 膜产量测定 采用称重法^[13];

1.2.1.4 BC 鉴定及基团分析 采用傅里叶红外光谱扫描法^[12](样品处理:取适量 BC 干膜放入红外光谱仪中进行测定,450 mW,扫描范围 4500~400 cm⁻¹,设定分辨率 4 cm⁻¹,扫描速度为 0.2 cm/s,室温下操作)。

1.2.1.5 BC 膜结晶度 采用 X-射线衍射光谱扫描法^[12](样品处理:BC 干膜平整固定在样品架上,铜靶,测试电压 40 kV,测试电流 100 mA,速率 5 °/min,步宽 0.02 °,2θ 为 0~80 °范围扫描。根据 X 衍射参数,由下面两个计算公式分别计算细菌纤维素的结晶度(X_c)和晶体的粒径 L ;

$$X_c(\%) = \frac{I - I_{am}}{I} \times 100; L = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

式中: I 为衍射峰的衍射强度; I_{am} 为无定形区衍射强度; β 为半峰宽 (rad); k 为常数,通常取 0.89; λ 为 X 射线波长 (0.15406 nm); θ 为布拉格衍射角。

1.2.2 苹果渣水解液的制备 取经粉碎干燥的苹果渣,加自来水至液固比为 8:1,加纤维素酶至终浓度为 40.00 EGU/g,pH5.2~5.5,55 ℃ 水解 14 h,反应结束后升温至 100 ℃,维持 10 min 灭酶,得苹果渣水解液。

1.2.3 BC 的发酵 斜面培养:挑取木醋杆菌保藏菌种划斜面,30 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d;种子液制备:挑取木醋杆菌活化菌种接种种子培养基,30 ℃ 恒温培养箱中培养 1 d,培养液置于 30 ℃,160 r/min 摇床震荡 30 min,得种子液;发酵培养:移取木醋杆菌种子液接入发酵培养基,装液量 30 mL/250 mL 三角瓶,接种量 20%,30 ℃ 恒温培养箱中静置培养 10 d。

1.2.4 单因素实验 以发酵液中 BC 产量为指标,考察碳源种类及含量(葡萄糖、蔗糖、乳糖,设计质量浓度 0.00、10.00、20.00、30.00、40.00、50.00、60.00、70.00 g/L)、氮源种类及含量(牛肉膏、蛋白胨、麸皮,设计质量浓度 0.00、5.00、10.00、15.00、20.00、25.00、30.00 g/L)、无机盐种类及含量(硫酸镁、磷酸氢二钾、柠檬酸钠,设计质量浓度 0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00 g/L)、磷酸二酯酶抑制剂种类及含量(黄嘌呤、咖啡因,设计质量浓度 0.00、0.10、0.30、0.50、0.70、0.90、1.10、1.50、2.00 g/L)等因素对 BC 产量的影响。初始培养基配方为:蔗糖 50.00 g、牛肉膏 15.00 g、乙醇 10 mL、苹果渣水解液 1000 mL、pH6.0,后续因素的实验将前一个因素的较佳条件带入以置换初始条件。

1.2.5 响应面实验设计 在单因素实验结果基础上,采用 Design Expert7.0 软件,根据 Box-Behnken 实验设计原理,选取影响较大的因素,以发酵液中 BC 产量为响应值设计实验,响应面因素水平设计见表 1。

表 1 响应面因素水平表
Table 1 Factors and levels of response surface

因素(g/L)	水平		
	-1	0	1
A 蔗糖	30.00	40.00	50.00
B 蛋白胨	5.00	10.00	15.00
C 硫酸镁	0.50	1.00	1.50
D 黄嘌呤	0.70	0.90	1.10

1.2.6 发酵产物性能研究 以木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)为菌种,按照优化培养基配方制备苹果渣水解液发酵培养基发酵生产 BC,记为 BC-YP,利用基本培养基发酵生产 BC 记为 BC-DZ。利用傅里叶红外光谱仪(FT-IR)及 X-射线衍射仪(XRD)对 BC-YP 及 BC-DZ 进行检测,研究苹果渣水解液作为发酵培养基原料对 BC 性能的影响。

1.3 数据处理方法

所有数据均用三次平行实验的平均值表示,用

SPSS(PASW Statistics18)软件对数据进行处理。方差分析及多重比较中 $p < 0.05$ 为显著差异,记为*。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 碳源对 BC 产量的影响 由图 1 可知,随着发酵培养基中所加入碳源质量浓度升高,BC 产量呈先上升再下降的变化趋势。葡萄糖质量浓度低于 30.00 g/L,蔗糖和乳糖质量浓度低于 40.00 g/L 时,BC 产量随着糖浓度的增大呈上升趋势。之后 BC 产量反而降低。相同质量浓度水平下,蔗糖作为碳源时 BC 产量最大,其次分别是乳糖、葡萄糖。分析原因,主要有以下几个方面:苹果渣水解液中糖含量较低,所提供碳源不能满足产物的持续合成,因此随着外源碳源的加入量增大,BC 产量随之提高;添加碳源量过高时,易引起培养基渗透压过高,反而抑制菌体细胞的生长及产物的合成,使 BC 产量降低;相较于蔗糖和乳糖,葡萄糖为微生物的快速利用碳源。高质量浓度葡萄糖的快速利用,容易引起糖代谢途径中丙酮酸的积累及无氧酵解产物乳酸、醋酸等的产生,使发酵液 pH 降低,不利于细胞的生长及产物的合成^[11]。同时快速利用基质的利用易产生对产物合成相关酶的阻遏作用,不利于发酵过程由细胞生长长期转为产物生产期,从而降低产物产量;蔗糖和乳糖作为碳源时,微生物对其水解速率不同,其利用速率也不相同。培养基中添加 40.00 g/L 的蔗糖比相同质量浓度的乳糖发酵产 BC 产量高,可能是因为木醋杆菌 *Acetobacter xylinum* 在代谢过程中将蔗糖水解为葡萄糖及果糖,其代谢及利用速率更适宜于产物 BC 的合成,因而可促进 BC 的合成。因此选择蔗糖质量浓度 40.00 g/L 为较佳参数。

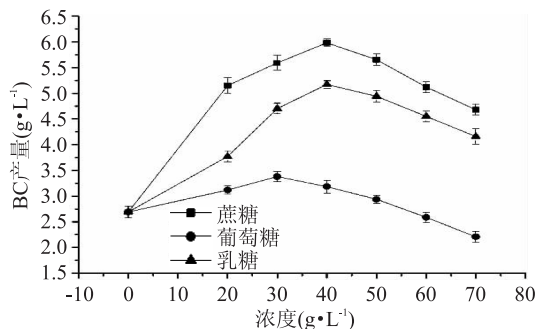


图1 碳源种类及质量浓度对 BC 产量的影响

Fig.1 Effect of carbon source's types and mass concentration on BC productivity

2.1.2 氮源对 BC 产量的影响 由图 2 可知,发酵培养中分别加入牛肉膏、麸皮、蛋白胨作为氮源时,随着氮源质量浓度的升高,BC 产量呈先上升再下降的趋势,其最大产量对应氮源质量浓度均为 10.00 g/L。表明苹果渣水解液中缺乏微生物合成 BC 所需蛋白质,需要外源添加氮源,最适添加量 10.00 g/L。氮源添加量继续增加时,发酵培养基中氮源的质量浓度过高,易引起菌体细胞生长速率过快,不利于发酵过程由细胞生长长期转为产物生产期,从而降低 BC 产量。所添加三种氮源中,蛋白胨作为氮源时,BC 产

量最高,可达 6.51 g/L,表明蛋白胨为木醋杆菌发酵生产 BC 最佳氮源。因此选择蛋白胨质量浓度 10.00 g/L 为较佳参数。

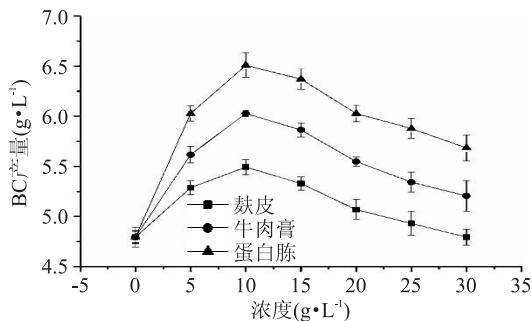


图2 氮源种类及质量浓度对 BC 产量的影响

Fig.2 Effect of nitrogen source's types and mass concentration on BC productivity

2.1.3 无机盐对 BC 产量的影响 由图 3 可知,培养基中 $MgSO_4$ 质量浓度为 1.00 g/L 时,BC 产量最高达 6.86 g/L。 Mg^{2+} 是微生物代谢过程中多种酶的辅基,如大部分核酸复制转录相关酶均需 Mg^{2+} 保证其催化活性,因此,发酵培养基中添加合适浓度的 Mg^{2+} ,对 BC 的合成具有促进作用。这与 Son 等人的研究结果一致^[14]。同时,发酵培养基中 K_2HPO_4 的加入并没有对 BC 的合成表现出促进作用,BC 产量反而有所降低,分析原因,可能是培养基中过量的磷酸盐对糖代谢过程中戊糖磷酸途径产生了抑制作用,从而抑制 BC 的合成。培养基中柠檬酸钠的加入对 BC 产量影响不大。因此培养基中无机盐选择硫酸镁进行进一步研究。

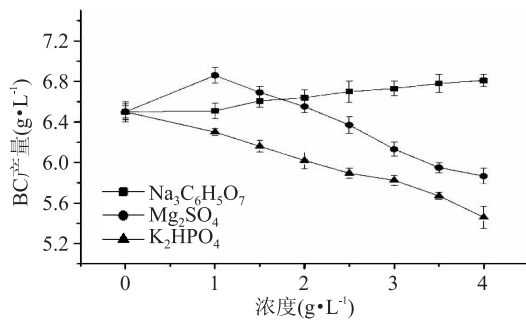


图3 无机盐种类及质量浓度对 BC 产量的影响

Fig.3 Effect of inorganic salt's types and mass concentration on BC productivity

2.1.4 PDE 抑制剂对 BC 产量的影响 由图 4 可知,发酵培养基中黄嘌呤和咖啡因的加入对 BC 的合成具有明显的促进作用,添加黄嘌呤质量浓度为 0.90 g/L,咖啡因质量浓度为 0.70 g/L 时,BC 产量可分别提高 14.2%,5.7%。BC 生物合成过程中,纤维素合成酶在环鸟苷酸 (C-di-GMP) 的激活下能够保持较高活性,C-di-GMP 又能被磷酸二酯酶 (PDE) 水解为无活性的线状鸟苷酸,因此理论上 PDE 抑制剂能够促进 BC 的合成。咖啡因、黄嘌呤和茶碱等可抑制 PDE 的活性^[15],使 C-di-GMP 在细胞内保持较高水平,提高纤维素合成酶活性,从而提高 BC 的合成速度。实验结果与理论分析一致。培养基中 PDE 抑

制剂选择黄嘌呤进行进一步研究。

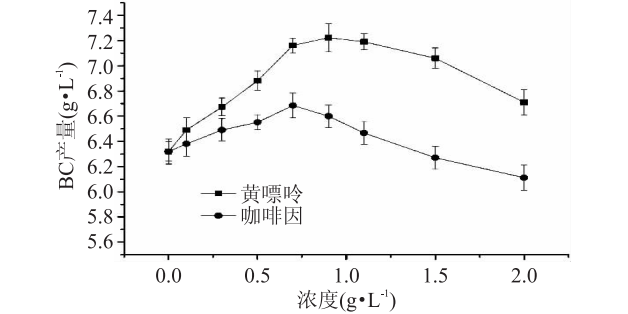


图4 PDE 酶抑制剂对 BC 产量的影响

Fig.4 Effect of PDE inhibitor on BC productivity

2.2 响应面优化发酵培养基配方

2.2.1 响应面实验设计及结果 综合单因素实验结果,进一步对蔗糖、蛋白胨、硫酸镁及黄嘌呤质量浓度4个因素进行优化。以这4个因素为自变量,以BC产量为响应值,根据Box-Behnken实验设计原理,设计中心组合实验,实验结果见表2。

表2 Box-Behnken 实验设计与结果
Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken

实验号	A 蔗糖 (g/L)	B 蛋白胨 (g/L)	C 硫酸镁 (g/L)	D 黄嘌呤 (g/L)	BC 产量 (g/L)
1	0	-1	0	-1	6.23 ± 0.11
2	1	0	0	-1	6.3 ± 0.05
3	-1	0	0	-1	6.54 ± 0.13
4	0	0	1	-1	5.56 ± 0.03
5	-1	1	0	0	6.7 ± 0.08
6	1	0	1	0	6.01 ± 0.03
7	-1	0	-1	0	6.75 ± 0.10
8	0	0	0	0	7.31 ± 0.13
9	0	1	1	0	6.54 ± 0.09
10	0	0	0	0	7.28 ± 0.05
11	1	0	-1	0	6.32 ± 0.04
12	1	-1	0	0	6.5 ± 0.09
13	0	-1	0	1	6.04 ± 0.12
14	0	-1	-1	0	6.87 ± 0.08
15	-1	0	0	1	6.23 ± 0.11
16	0	1	-1	0	6.78 ± 0.07
17	0	0	0	0	7.15 ± 0.06
18	0	0	0	0	7.22 ± 0.08
19	0	1	0	1	6.34 ± 0.02
20	0	0	-1	-1	6.72 ± 0.12
21	0	1	0	-1	6.82 ± 0.05
22	0	0	1	1	6.12 ± 0.09
23	1	1	0	0	6.5 ± 0.04
24	1	0	0	1	6.23 ± 0.05
25	-1	-1	0	0	6.6 ± 0.08
26	0	-1	1	0	6.12 ± 0.03
27	0	0	0	0	7.29 ± 0.07
28	0	0	-1	1	6.09 ± 0.09
29	-1	0	1	0	6.01 ± 0.04

利用 Design Expert 7.0 软件,以蔗糖、蛋白胨、硫酸镁及黄嘌呤质量浓度为响应变量,以 BC 产量为响应值对表 2 数据进行多元二次回归拟合,得到回归模型方程为:Y = 7.25 - 0.081A + 0.11B - 0.26C - 0.093D - 0.025AB + 0.11AC + 0.060AD + 0.13BC - 0.072BD + 0.30CD - 0.41A² - 0.24B² - 0.51C² - 0.59D²。回归方程的方差分析结果见表 3。由表 3 可知,回归模型极显著 (p < 0.0001),失拟项不显著 (p > 0.05),表明回归方程拟合程度良好;决定系数 R² = 0.9588,说明因变量与考察的自变量之间的线性关系显著;模型校正决定系数 R²_{Adj} = 0.9177,即该模型能解释响应值变化的 91.8%,信噪比 = 16.978,均说明模型可信度较高。R²_{Pred} = 0.7756,说明该模型预测性良好;一次项 A、B、D 对 BC 产量影响是显著的,C 对 BC 产量影响是极显著的,二次项 A²、B²、C²、D² 及交互项 CD 对 BC 产量影响是极显著的,说明各具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;由 F 判断,在选择范围内,四个因素对 BC 产量的影响顺序为硫酸镁 (C) > 蛋白胨 (B) > 黄嘌呤 (D) > 蔗糖 (A)。综上所述,使用该模型可以较好的对响应值 (BC 产量) 进行分析和预测。

2.2.2 响应面分析 利用 Design Expert 7.0 软件对二次回归模型进行规范分析,蔗糖、蛋白胨、硫酸镁及黄嘌呤质量浓度之间交互作用对 BC 产量的影响见图 5。

结合表 3 所示方差分析结果,由图 5 所示响应面曲线 3D 图及等高线图分析可知^[16]:硫酸镁与蔗糖、硫酸镁与蛋白胨、黄嘌呤与硫酸镁对 BC 产量影响的交互作用较强。同时由图可知,蔗糖、硫酸镁、黄嘌呤对 BC 产量的影响比较显著,曲线较陡;而蛋白胨对 BC 产量的影响相对较小,曲线较平缓,其数值的增加减少,对响应值的变化影响较小。

2.2.3 最佳发酵培养基 由 Design 软件求出回归模型极值点,对应的最佳发酵培养基组分为:蔗糖质量浓度 38.44 g/L、蛋白胨质量浓度 10.91 g/L、硫酸镁质量浓度 0.85 g/L、黄嘌呤质量浓度 0.87 g/L,此条件下,BC 的理论产量为 7.31 g/L。为检验响应面法的可靠性,在最佳培养基条件下进行验证实验。此条件下进行 3 次平行实验,BC 平均产量为 (7.19 ± 0.15) g/L,与理论值的相对误差为 1.6%。说明回归方程能比较真实地模拟各因素对 BC 产量的影响,因此,使用该回归模型优化利用酒糟水解液发酵生产 BC 的培养基是可行的。

2.3 发酵产物的结构与性能

酒糟水解液发酵 BC (BC-YP) 与基本培养基发酵 BC (BC-DZ) 红外图谱如图 6 所示。吸收峰 3285、1154、1077、1040 cm⁻¹ 证实了样品中大量 -OH 的存在;吸收峰 2925、1383、645 cm⁻¹ 证实了 -CH₂-、-CH- 和 C-H 的存在;吸收峰 1241 cm⁻¹ 证实了环 C-O-C 的存在;吸收峰 1241、1033 cm⁻¹ 证实了直链 C-O-C 的存在^[17-18]。以上结果显示为细菌纤维素葡聚糖的特征吸收,可以推断出两种样品的主要成分均为细菌纤维素。由图 6 可知,BC-YP 和 BC-DZ 红外

表3 回归方程方差分析结果

Table 3 Analysis of variances for the developed regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
Model	5.41	14	0.39	23.3	<0.0001	**
A 蔗糖	0.078	1	0.078	4.73	0.0474	*
B 蛋白胨	0.15	1	0.15	8.75	0.0104	*
C 硫酸镁	0.84	1	0.84	50.47	<0.0001	**
D 黄嘌呤	0.1	1	0.1	6.3	0.025	*
AB	2.50E-03	1	2.50E-03	0.15	0.7037	
AC	0.046	1	0.046	2.79	0.1173	
AD	0.014	1	0.014	0.87	0.3673	
BC	0.065	1	0.065	3.92	0.0678	
BD	0.021	1	0.021	1.27	0.2792	
CD	0.35	1	0.35	21.34	0.0004	**
A ²	1.09	1	1.09	65.84	<0.0001	**
B ²	0.38	1	0.38	22.83	0.0003	**
C ²	1.69	1	1.69	101.84	<0.0001	**
D ²	2.29	1	2.29	138	<0.0001	**
残差	0.23	14	0.017			
失拟项	0.22	10	0.022	5.07	0.0659	not significant
误差项	0.017	4	4.25E-03			
总和	5.64	28				

$$R^2 = 0.9588, R^2_{Adj} = 0.9177, R^2_{Pred} = 0.7756, \text{信噪比} = 16.978$$

注: ** 差异极显著, $p < 0.01$; * 差异显著, $p < 0.05$ 。

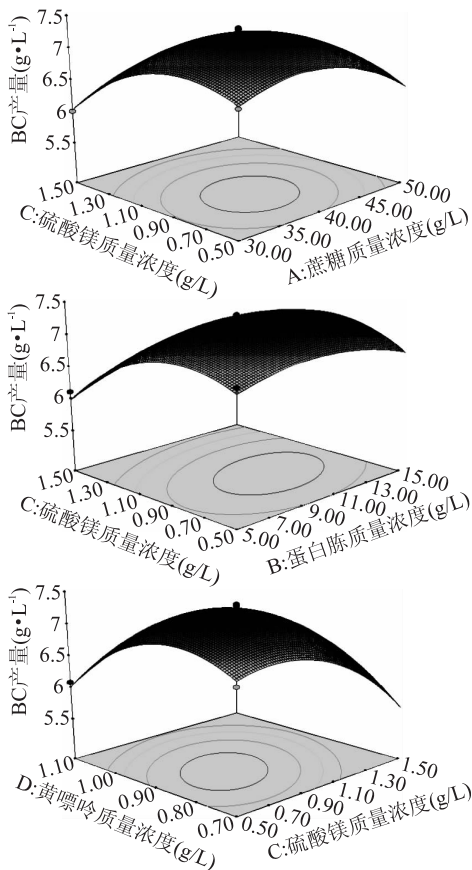


图5 交互因素对BC产量的影响响应面曲线图
Fig.5 Response surface plots showing the effects of interactions of factors on the yield of BC

图谱基本一致,说明两种样品的化学组成非常相似,苹果渣水解液作为发酵原料不影响BC的化学结构。

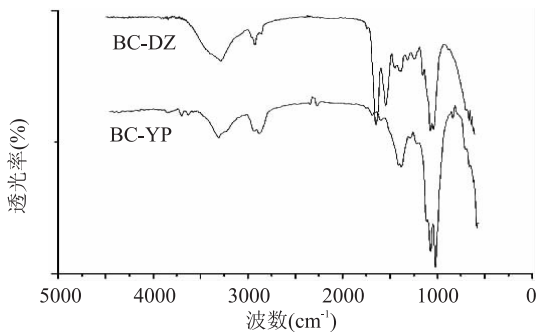


图6 基本培养基发酵BC(BC-DZ)与苹果渣水解液发酵BC(BC-YP)红外图谱
Fig.6 FT-IR of BC produced from basic medium (BC-DZ) and BC from pomace hydrolysate (BC-YP)

苹果渣水解液发酵BC(BC-YP)与基本培养基发酵BC(BC-DZ)XRD图谱如图7所示。由图可知,BC-YP和BC-DZ的X-射线图谱大致相同,且在相同位置处均含有主要衍射峰,分别在 14.8° 、 16.8° 和 21.7° 附近存在三个衍射峰,此三个峰分别对应纤维素晶体的 $\langle 101 \rangle$ 、 $\langle 101 \rangle$ 和 $\langle 002 \rangle$ 晶面^[19],据此可知BC-YP和BC-DZ为I型纤维素。

两种样品的结晶度与晶体粒径的结果如表4所示。结果表明,BC-YP和BC-DZ的结晶度基本相同,均为24%左右,BC-YP粒径大于BC-DZ。结晶度与纤维的抗张强度、杨氏模量、硬度、伸长率、吸湿性、润胀度、柔软性等性质有一定的关系^[20-21],说明苹果渣水解液作为发酵原料不影响BC结晶度。晶体

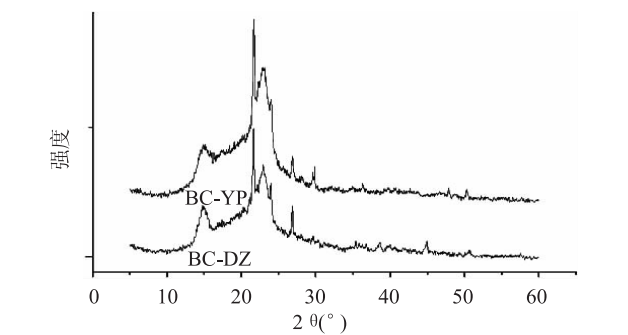


图7 基本培养基发酵 BC(BC-DZ)与
苹果渣水解液发酵 BC(BC-YP) XRD 图谱
Fig.7 XRD of BC produced from basic medium
(BC-DZ) and BC from pomace hydrolysate (BC-YP)

粒径与透明度、撕裂因子有关,苹果渣水解液中含有纤维素未水解完全的多糖成分,部分多糖可在 BC 合成过程中结合到 BC 中,从而改变 BC 的晶体粒径。

表4 基本培养基发酵 BC(BC-DZ)与
苹果渣水解液发酵 BC(BC-YP) XRD 结果
Table 4 XRD result of BC produced from basic medium
(BC-DZ) and BC from pomace hydrolysate (BC-YP)

样品	结晶度 X_c (%)	粒径 L (nm)
BC-DZ	23.73	13
BC-YP	24.15	23

注:BC-DZ-基本培养基发酵 BC;BC-YP-苹果渣水解液发酵 BC。

3 结论

通过单因素实验和响应面法对苹果渣水解液发酵生产 BC 的发酵培养基进行优化,建立了蔗糖、蛋白胨、硫酸镁和黄嘌呤 4 个因素对 BC 产量的二次回归方程模型,经检验,模型准确有效,可以用该模型分析预测各因素对 BC 产量的影响。由单因素实验和响应面优化模型确定利用苹果渣水解液发酵生产 BC 的最佳发酵培养基为:蔗糖 38.44 g、蛋白胨 10.91 g、硫酸镁 0.85 g、黄嘌呤 0.87 g、乙醇 10 mL、苹果渣水解液 1000 mL、pH6.0。在此条件下,得到 BC 产量为 7.19 g/L,较优化前(5.65 g/L)提高了 27.3%。利用 FT-IR 及 XRD 对发酵产物 BC 化学基团、结晶性能进行了比较,结果表明,苹果渣水解液发酵产物 BC 结构性能与基本培养基发酵产物 BC 基本一致,苹果渣水解液能够替代部分发酵原料发酵生产 BC,且不影响 BC 性能。

参考文献

[1] Sybele S, Lucas N T, Paulo T O, et al. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering[J]. J. Mater. Chem, 2012, 22, 22102-22112.
[2] Cai Zhi-jiang, Yang Guang. Bacterial Cellulose/Collagen Composite: Characterization and First Evaluation of Cytocompatibility[J]. J. Appl. Polym. Sci., 2011, 120, 2938-2944.
[3] 赵思雨,陈仕艳,王华平.细菌纤维素的生及其在食品工业中的应用[J].湛江师范学院学报,2013,34(6):69-72.

[4] 杨福有,祁周约,李彩凤杨,等.苹果渣营养成分分析及饲用价值评估[J].甘肃农业大学学报,2000,35(3):340-344.
[5] Sargent S A. An energy and cost analysis model to evaluate the combustion of food processing wastes [D]. Ph.D. Thesis, Department of Agriculture Engineering, Michigan State University, E. Lansing, MI. 1984.
[6] 李彩凤,杨福有.苹果渣的营养成分及利用[J].饲料博览,2001(2):38
[7] Joshi V K, Sandhu D K. Properation and Evaluation of Animal Feed Byproduct Produced by Solid-State Fermentation of Apple Pomace[J]. Bioresource Technology, 1996, 56: 251-255.
[8] Joshi V K, Gupta K. Production and evaluation off ermented apple pomace in the feed of broilers[J]. Journal of Food Science and Technology, 2 000, 37(6): 609-612.
[9] Sandhu D K, Joshi V K. Solid state fermentation of apple pomace for concentration of ethanol and animal feed[J]. Jounral of Science & Industrial Research, 1997, 56(2): 86-90.
[10] 史红兵,宋纪蓉,黄洁,等.果渣制备可溶性膳食纤维的工艺研究[J].西北大学学报(自然科学版),2004(4):148-152.
[11] 张雯,齐香君.细菌纤维素生产菌株菌体细胞收集方法的研究[J].食品工业科技,2006,27(9):57-58.
[12] Chao Y, Ishida T Y, Shoda M. Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum in a 50-L internal-loop airlift reactor [J]. Biotechnology Bioeng, 2000, 68: 345-352.
[13] Putra A, Kakugo A, Furukawa H, et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface [J]. Polymer, 2008, 49: 1885-1891.
[14] Son HJ., Kim HG., Kim KK., et al. Increased production of bacterial cellulose by Acetobacter sp V6 in synthetic media under shaking culture conditions [J]. Bioresource Technology, 2003, 86(3), 215-219.
[15] 章国燕,张奕华.选择性磷酸二酯酶Ⅳ抑制剂的研究[J].药学进展,2002,26(2):86-91.
[16] Sarya A, Pierre D, Selim K. Lipase - catalyzed transesterification of krill oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid in solvent-free medium using response surface methodology[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 84(212): 189-197.
[17] 张丽平,卢红梅,彭湘屏,等.淋浇发酵法生产细菌纤维素的结构与性质研究[J].食品工业科技,2012,33(22):197-201.
[18] Rajalaxmi D, Marcus F, Arthur J R. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers[J]. Carbohydrate Polymers, 2013(91):638-645
[19] Pei Ying, Yang Juan, Liu Pan, et al. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose-collagen hydrolysate composite films[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92: 1752-1760.
[20] Saska S, Barud H S, Gaspar A M M, et al. Bacterial Cellulose - Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration [J]. International Journal of Biomaterials, 2011, 5(5): 1605-1613.
[21] 冯劲,施庆珊,冯静.不同干燥方式对细菌纤维素物理性能的影响[J],现代食品科技,2013,29(9):2225-2101.