

文章编号:1673-1689(2008)03-0125-04

木醋杆菌最佳发酵条件

付莉¹, 迟玉杰²

(1. 辽宁医学院 食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 通过试验筛选出木醋杆菌发酵产生纤维素的最佳碳源为葡萄糖, 最佳氮源为酵母膏和蛋白胨, 并通过正交试验确定出木醋杆菌发酵的最佳条件是: pH 5.0, 温度 30 ℃, 葡萄糖 1.5 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL。乙醇、醋酸、乳酸对木醋杆菌生产纤维量都有增效作用, 优化后的培养基添加 0.4 g/dL 醋酸, 细菌纤维素产量为 3.40 g/L。添加体积分数 1% 的乙醇, 细菌纤维素产量为 3.65 g/L。添加 0.4 g/dL 乳酸, 细菌纤维素产量为 3.54 g/L。

关键词: 木醋杆菌; 细菌纤维素; 最佳发酵条件

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Research on the Fermentation Conditions of *Xylinum*

FU Li¹, CHI Yu-jie²

(1. College of Food Science and Engineering, Liao Ning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Food College, North-East Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this manuscript, the optimum conditions for cellulose production by *Xylinum* were determined. The optimum carbon source was glucose while the optimum nitrogen source was peptone and yeast extract. The optimum conditions, determined by orthogonal experiment design, described as follow: pH 5.0, temperature 30 ℃, glucose 1.5 g/dL, yeast extract 0.5 g/dL, peptone 1.0 g/dL. Furthermore, the cellulose achieved at 3.40 g/L, 3.65 g/L and 3.54 g/L by supplemented with 0.4 g/dL acetic acid, 1% ethanol or 0.4 g/dL lactic acid, respectively.

Key words: *Xylinum*; bacterial cellulose; optimum fermentation condition

细菌纤维素是一定微生物经液态基质发酵而成的细胞外纤维素。现在已经发现生成细菌纤维素的几个菌属, 其中以醋酸菌属的木醋杆菌产纤维素能力最强。细菌纤维素是一种理想的生物合成原料, 纯度和结晶度很高, 有很高的杨氏模量, 有很好的透气性、透水性、持水性, 有极好的可塑性和抗

撕能力, 这些特点决定了细菌纤维素有广阔的商业前景。但是由于它的成本过高, 因此提高细菌纤维素产量已成为世界性的研究热点。目前主要通过发酵工艺的优化、高产菌株的选育以及基因工程等一些手段来实现^[1-2]。

目前对细菌纤维素产生菌——木醋杆菌的研

收稿日期: 2007-07-21.

作者简介: 付莉(1979-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 讲师, 工学硕士, 主要从事食品生物技术方面的研究。

*** 通讯作者:** 迟玉杰(1963-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品化学方面的研究。

Email: yjchi@126.com

究已经很充分,国内外研究者们对细菌纤维素产生菌发酵培养基进行研究,通过筛选最佳碳源和氮源,或向培养基中添加少量纤维素酶、咖啡因或黄嘌呤来提高细菌纤维素的产量;也有研究者对细菌纤维素高产菌进行选育,通过选育磺胺胍(对氨基苯甲酸结构类似物)突变株或利用硝基胍筛选抑制纤维素副产品产生的菌株,或通过选育非产葡萄糖酸的突变株来提高细菌纤维素产量。还有研究者们对发酵工艺与设备进行研究来提高细菌纤维素产量,如利用带有斜面挡板的摇瓶并结合玉米酒精液和果糖培养基筛选出一株高产纤维素菌株,或在摇瓶中加入不溶于水的微粒,或设计转鼓发酵罐,甚至还有人设计出一种带有分离器的连续培养装置或在静置培养容器底部加入具有渗透氧能力的硅胶层,这些研究表明,细菌纤维素的产量都较普通发酵方式所产细菌纤维素的产量有很大程度的提高。

作者以木醋杆菌为发酵菌株,通过优化木醋杆菌发酵条件来提高细菌纤维素产量。通过筛选木醋杆菌发酵培养基中碳源和氮源及增效因子来提高纤维素产量,与目前该领域的研究相比,作者增加了供筛选的碳源、氮源、增效因子的种类。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*),由东北农业大学食品学院保藏。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基(g/L):葡萄糖 2,酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5, Na_3PO_4 0.27,柠檬酸盐 0.115,琼脂 2; pH 5.0, 121 °C 灭菌 20 min。

液体种子培养基(g/L):葡萄糖 2,酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5, Na_3PO_4 0.27,柠檬酸盐 0.115; pH 5.0, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器 DH6000A 型电热恒温培养箱, HZQ-F160 全温振荡培养箱, PHS-3C 精密 pH 计, 手提式高压灭菌锅, 超净工作台(上海上净净化食品有限公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 分析方法

1) 残糖测定:碘量法。

2) pH 值测定:酸度计法。

3) 细菌纤维素产量测定:静置培养 14 d 后,过滤收集纤维素,用水反复冲洗除去培养基,再用 0.1 g/dL 的 NaOH 于 80 °C 水浴 1 h 以去除菌体,然后

反复用蒸馏水冲洗,直到呈中性。80 °C 烘干 12 h,冷却至室温,称重。纤维素含量用 g/L 表示。

4) 菌体量的测定:培养液中加入 5 g/dL 的纤维素酶在 50 °C、pH 5.0 左右条件下水解 3 h,适当稀释后在 600 nm 波长下测定光密度。

1.2.2 培养方法 取一环活化好的斜面种子培养基,接入 100 mL 培养液中(250 mL 的三角瓶装), 30 °C 振荡培养 24 h,摇床转速为 130 r/min,以体积分数 2% 的接种量接入发酵培养基内(500 mL 的三角瓶装)。接种时充分振荡以释放菌体,放入 30 °C 恒温培养箱中静置培养 14 d 后,收获测定。

2 实验结果

2.1 碳源的筛选

在酵母膏 0.5 g/dL、蛋白胨 0.5 g/dL、 Na_3PO_4 0.27 g/dL、柠檬酸盐 0.115 g/dL 的培养基中加入不同种类的碳源,在 30 °C 恒温培养箱中静置培养 14 d,测定纤维产量,结果见表 1。

结果表明,单糖、双糖是木醋杆菌产纤维素最好的碳源,其中以葡萄糖、D-果糖、D-甘露醇为碳源的产量较高,葡萄糖的最高,蔗糖的较低,故选择葡萄糖为最佳碳源^[4]。

表 1 糖原对纤维素产量的影响

Tab. 1 Effects of various carbon sources on the yield of bacterial cellulose

碳源	纤维素产量/(g/L)
葡萄糖	2.59
D-果糖	0.83
蔗糖	0.15
麦芽糖	0.14
D-甘露醇	0.69
乳糖	0.06
D-半乳糖	0.03
可溶性淀粉	0.02
乙醇	0.07
柠檬酸	—

2.2 氮源的筛选

在葡萄糖 2 g/dL、 Na_3PO_4 0.27 g/dL、柠檬酸盐 0.115 g/dL 的培养基中加入不同种类的氮源,在 30 °C 恒温培养箱中静置培养 14 d,测定纤维素产量,结果见表 2。

在木醋杆菌生产纤维素所利用的氮源中,有机氮源好于无机氮源,而混合使用有机氮源产量会更高,其中以酵母膏和蛋白胨、酵母膏、酵母膏和胰蛋白胨混合使用时纤维产量最高,蛋白胨、胰蛋白胨次之,

故选择最佳氮源为酵母膏和蛋白胨混合使用。

表 2 氮源对纤维素产量的影响

Tab. 2 Effects of various nitrogen sources on the yield of bacterial cellulose

氮源	纤维素产量/(g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	—
尿素	—
酵母膏	0.61
蛋白胨	0.45
胰蛋白胨	0.29
酵母膏+蛋白胨	0.95
酵母膏+胰蛋白胨	0.59
酵母膏+尿素	—
酵母膏+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.33

2.3 最佳发酵条件确定

影响纤维素产量的因素主要有反应碳源、反应氮源、反应温度和 pH 值。因此利用四因素三水平正交试验优化反应工艺,实验因素及因素水平编码见表 3^[3]。

方差分析结果见表 4。研究表明,在所选用的 4 个因素中,碳源和温度对纤维素的产量有显著的影响。由极差分析可知,各因素对纤维素产量影响的主次顺序为:D>A>B>C,即温度>碳源>氮源>pH 值。根据正交试验确定的最佳工艺为:A₁B₃C₂D₂,即葡萄糖 1.5 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,温度 30 ℃,pH 5.0。

表 3 L₉(3⁴)正交试验因素水平表

Tab. 3 Factors and levels of orthogonal experiment design L₉(3⁴)

水平	葡萄糖 质量浓度 A	m(酵母膏): m(蛋白胨) B	pH 值 C	温度 D
1	2.5	2:1	4.0	25
2	2.0	1:1	5.0	30
3	1.5	1:2	6.0	35

表 4 L₉(3⁴)正交试验设计结果

Tab. 4 The result and design of the orthogonal experiment L₉(3⁴)

实验号	各因素水平				纤维素产量/(g/L)
	葡萄糖 质量浓度 A	酵母膏: 蛋白胨 B	pH C	温度 D	
1	1	1	1	1	1.82
2	1	2	2	2	2.70
3	1	3	3	3	1.23
4	2	1	3	2	1.80

续表 4

实验号	各因素水平				纤维素产量/(g/L)
	葡萄糖 质量浓度 A	酵母膏: 蛋白胨 B	pH C	温度 D	
5	2	2	1	3	0.03
6	2	3	2	1	1.18
7	3	1	2	3	0.04
8	3	2	3	1	0
9	3	3	1	2	1.92
K ₁	5.75	3.67	3.77	3.01	
K ₂	3.00	2.73	3.92	6.42	
K ₃	1.96	4.33	3.03	1.29	
k ₁	1.92	1.22	1.26	1.00	
k ₂	1.00	0.91	1.31	2.14	
k ₃	0.66	1.44	1.01	0.43	
R	1.26	0.53	0.30	1.71	

主>次 D>A>B>C

通过正交试验确定最佳工艺,对木醋杆菌进行发酵培养,细菌纤维素最高产量为 2.81 g/L。

3 讨 论

3.1 醋酸质量浓度对细菌纤维素产量的影响

正交优化后的培养基中加入 0~0.5 g/dL 的醋酸,30 ℃静置培养 14 d,以确定醋酸质量浓度对纤维素产量的影响。随着醋酸质量浓度从 0.1~0.4 g/dL 逐渐增加,纤维素的产量随之增加。当醋酸质量浓度达到 0.4 g/dL 时,纤维素产量达到最高,为 3.40 g/L。当醋酸的质量浓度达到 0.5 g/dL 后,纤维素产量开始降低,结果见表 5。

表 5 醋酸质量浓度对细菌纤维素产量的影响

Tab. 5 Effects of acetic acid concentrations on the yield of bacterial cellulose

醋酸质量浓度/(g/L)	维纤维素产量/(g/L)
0	2.81
0.1	3.02
0.2	3.14
0.3	3.16
0.4	3.40
0.5	3.04

据此认为醋酸的添加补充了葡萄糖的消耗,从而补充了部分碳源,使纤维素产量提高,但是当醋酸质量浓度到达一定程度后,改变了培养基的 pH

值,从而抑制了纤维素的生成,使产量降低。

3.2 乙醇体积分数对细菌纤维素产量的影响

正交试验后确定的培养基中加入体积分数 0~3.0%的乙醇,30℃静置培养 14 d,确定乙醇体积分数对细菌纤维素产量的影响。随着乙醇体积分数从 0~1%逐渐增加,纤维素的产量随之增加,当乙醇体积分数达到 1%时,细菌纤维素产量达到最高,为 3.65 g/L。当乙醇体积分数达到 1.5%后,纤维素产量开始降低,见表 6。

乙醇可以被木醋杆菌氧化为乙酸,同时生成用于细胞合成的 ATP 等高能量化合物,对纤维素的生长起促进作用。但是乙醇的体积分数过高,就会导致产酸过多,从而抑制细菌纤维素的产生。

表 6 乙醇体积分数对细菌纤维素产量的影响

Tab. 6 Effects of ethanol concentrations on the yield of bacterial cellulose

乙醇体积分数/%	纤维素产量/(g/L)
0	2.81
0.5	2.85
1.0	3.65
1.5	3.54
2.0	3.40
2.5	3.23
3.0	2.11

3.3 乳酸质量浓度对细菌纤维素产量的影响

正交试验后确定的培养基加入 0~0.5 g/dL 的乳酸,30℃静置培养 14 d,确定乳酸质量浓度对纤维素产量的影响。随着乳酸质量浓度从 0~0.4 g/dL 增加,纤维素产量也随之增加。当乳酸质量浓度达到 0.4 g/dL 时,细菌纤维素产量达到最高,为 3.54 g/L。

参考文献(References):

[1] Jonas R, Farah L. Production and application of microbial cellulose[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59: 101-106.

[2] 贾士儒, 欧宏宇, 付强. 新型生物材料——细菌纤维素[J]. *食品与发酵工业*, 2000, 27(1): 54-58.

JIA Shi-ru, OU Hong-yu, FU Qiang. A new biological material-bacterial cellulose[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2000, 27(1): 54-58. (in Chinese)

[3] 徐中儒. 农业试验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1988: 62-71.

[4] 周媛, 邵伟, 黎殊华, 等. 巴氏醋杆菌纤维素发酵培养基成分研究[J]. *微生物学杂志*, 2000, 20(4): 60-61.

ZHOU Yuan, SHAO Wei, LI Shu-hua, et al. Research on the components of fermentation medium of *Acetobacter pasteurianum*[J]. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(4): 60-61. (in Chinese)

[5] 马霞, 王瑞明, 关凤梅, 等. 非碳水化合物对木醋杆菌合成细菌纤维素影响规律的探究[J]. *中国酿造*, 2003(4): 15-16.

MA Xia, WANG Rui-ming, GUAN Feng-mei, et al. Inquiry of the effect of non-carbohydrate on bacterial cellulose synthesis law[J]. *China Brewing*, 2003(4): 15-16. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)

当乳酸质量浓度达到 0.5 g/dL 后,纤维素产量开始下降。

乳酸可促进细胞合成 ATP 等高能量化合物,对纤维素的生长起促进作用。但是当乳酸质量浓度过高时,会导致培养基内 pH 值过低,从而抑制纤维素的生长,使纤维素产量降低。

表 7 乳酸质量浓度对细菌纤维素产量的影响

Tab. 7 Effects of lactic acid concentrations on the yield of bacterial cellulose

乳酸质量浓度/%	纤维素产量/(g/L)
0	2.81
0.1	3.02
0.2	3.11
0.3	3.23
0.4	3.54
0.5	2.61

4 结 语

由本试验可以看出,木醋杆菌发酵产生纤维素的最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为酵母膏和蛋白胨,发酵最佳条件是:pH 5.0,温度 30℃,葡萄糖 1.5 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,蛋白胨 1 g/dL。优化后的培养基分别添加 0.4 g/dL 醋酸、1 g/dL 乙醇、0.4 g/dL 乳酸,细菌纤维素产量由 2.81 g/L 分别提高到 3.40、3.65、3.54 g/L。

通过对木醋杆菌最佳发酵条件进行优化,细菌纤维素的最高产量提高了 30%,生产成本由 11.7 元/kg 下降到 3.51 元/kg,对于工业化生产具有一定的可行性。