

源于葡糖杆菌属细菌纤维素材料的检测分析

李利军^{1*}, 卢美欢¹, 马英辉¹, 王银存²

¹陕西省微生物研究所, 西安 710043; ²西北大学生命科学学院, 西安 710069

摘要:利用自筛的葡糖杆菌属菌株 AXB(X), 发酵获得产物细菌纤维素(BC), 通过傅立叶红外光谱、X-射线衍射以及扫描电子显微镜等仪器研究其材料特性, 确认 BC 是高纯度的纤维素, 且晶型属于纤维素 I 型; 通过酶解和酸解试验显示该产物纯度达 95% 以上, 持水率在 95% 以上。此外, 扫描电镜观察其产物表面形态结构表明纤维相互交织成具有超细精密多孔的网络结构, 且具有比滤纸、棉纤维和桑皮纤维更高的结晶度。

关键词: 葡糖杆菌属; 细菌纤维素; 检测; 特性

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

Detection and Characteristic Analysis of Bacterial Cellulose Produced by *Gluconobacter*

LI Li-jun^{1*}, LU Mei-huan¹, MA Ying-hui¹, WANG Yin-cun²

¹Shaanxi Province Institute of Microbiology, Xi'an 710043, China; ²College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: In this study, the bacterial cellulose (BC) was produced by fermenting a *Gluconacetobacter* strain AXB(X). The material properties were investigated by Fourier transform infrared spectrometry, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. The results proved that BC was high purity cellulose, and the crystal structure of the product belonged to cellulose type I. Enzymolysis and acidolysis experiments showed the purity of BC was over 95%. The water holding capacity was more than 95%. The observation of surface morphology of the product, by scanning electron microscopy, revealed that the superfine, precise and porous network structure of BC was formed by interfelting fibers. The crystallinity of BC was higher than filter paper fiber, cotton fiber and mulberry fiber.

Key words: *Gluconobacter*; bacterial cellulose; detection; characteristics

细菌纤维素(bacterial cellulose, 简称 BC)是由醋酸杆菌、葡糖杆菌等细菌生物合成的新型纳米纤维素。由于其优于普通纤维素的特性,使得 BC 在食品、生物医学、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获得较高的关注,受到国内外学者青睐。本实验室利用自筛的一株葡糖杆菌发酵制得细菌纤维素,并通过酶解实验、持水性实验、傅里叶红外光谱检测、X-射线衍射检测、扫描电子显微镜等手段,研究了细菌纤维素材料的特性,为后期应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂与仪器

1.1.1 原料与试剂

细菌纤维素膜:由菌株 AXB(X)(自制红茶菌)发酵获得;桑皮纤维素、滤纸、棉花:由西安永屹生物公司提供;纤维素酶(10 g 装,酶活单位 60000 U/g,产地 DBH,西安 WOLSEN 生物技术有限公司提供)。

pH 4.8 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液:由 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 配制而成,试剂购自天津天大化学试剂公司;1 mol/L 盐酸溶液、66.5% 硫酸溶液(天津天力化学试剂公司);碘化钾溶液(天津市科密欧化学试剂有限公司)

1.1.2 实验仪器

傅里叶红外光谱仪(型号: EQUINOX-55, 德国布鲁克公司);X-射线衍射仪(理学 D/MAX-3C 型,日本理学公司);离子溅射仪(RB-3 型,日本);扫描电子显微镜(Jeol JSM-6390A 型,日本岛津公司)。

1.2 实验方法

收稿日期:2013-04-18 接受日期:2013-09-05

基金项目:陕西省科学院青年基金项目(2010k-29)

* 通讯作者 Tel:86-013571943903; E-mail:lijun_llj@163.com

1.2.1 酶解实验

精确称取 0.1 g 纤维素酶粉末溶于 25 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值 4.8),在 50 °C 下保温 30 min。称取由菌株产生的薄膜粉末 0.05 g,50 °C 下加入纤维素酶液酶解 40 h。用烘干至恒质量的滤纸(m_1)过滤,滤渣同滤纸干燥称质量(m_2), m_2-m_1 即为滤渣的质量。纤维素含量按下式计算:

$$\text{纤维素含量}(\%) = (0.05 - m_2 + m_1) / 0.05 \times 100\%$$

1.2.2 酸解实验

称取由菌株产生的薄膜粉末 0.05 g,在 50°C 下用 1 mol/L HCl 酸解 40 h。用烘干至恒质量的滤纸(m_1)过滤,滤渣同滤纸干燥称质量(m_2), m_2-m_1 即为滤渣的质量。纤维素含量按下式计算:

$$\text{纤维素含量}(\%) = (0.05 - m_2 + m_1) / 0.05 \times 100\%$$

1.2.3 持水性考察

将通过真空泵抽滤—碱处理—酸处理—蒸馏水冲洗—pH 值测定处理好的细菌纤维素湿膜称重,记为湿膜重 m_1 ;再经过 80 °C 干燥所得的细菌纤维素干膜称重,记为干膜重 m_2 。按公式细菌纤维素膜持水率($\%$) = $(m_1 - m_2) / m_1$ 计量持水率。

1.2.4 BC 成分判定

在干燥的膜(并用干燥滤纸作参考对照)上滴加质量分数为 66.5% 的硫酸溶液,再滴加碘化钾溶液显色,反应后观察,呈蓝黑色者成分为纤维素,否则不是^[1]。

1.2.5 傅里叶红外光谱检测

将细菌纤维素、桑皮纤维素、滤纸、棉花四种样

品剪碎后研磨制备成粉末。取干燥的 KBr 粉末分别与四种样品按 100:1 的比例混匀并充分研磨,取 70 ~ 90 mg 混合样品在专用压片器中用 1MPa 的压力压制制成透明薄片。400 ~ 4000 cm^{-1} 波长范围进行透射鉴定。

1.2.6 X-射线衍射

取大小为 1.0 cm × 0.5 cm 的细菌纤维素干膜,在波长为 1.54 Å,管流电压为 35 kV,管流电流为 35 mA,衍射角(2θ)为 5° ~ 50° 条件下进行 X-射线衍射测试。

1.2.7 扫描电子显微镜

取经过冷冻干燥后的细菌纤维素膜、桑皮纤维素、滤纸和棉纤维素制成面积为 0.5 cm^2 左右的样品,用碳膜导电胶带将各种样品固定在载物台上,用 RB-3 型离子溅射仪在真空条件下溅射镀上一层导电膜,达到提高样品的导电性能。随后用日本岛津公司的 Jeol JSM-6390A 型扫描电子显微镜观察样品形态,加速电压为 15 kV。

AXB(X)与细菌纤维素共存涂布在载物台上固定后,同样用离子溅射仪真空条件下溅射镀上一层导电膜。取出样品用日本岛津公司的 Jeol JSM-6390A 型扫描电子显微镜观察菌体形态,加速电压为 15 kV。

2 结果与分析

2.1 酶解实验结果

BC 经纤维素酶酶解实验结果如表 1 所示。

2.2 细菌纤维素酸解

BC 酸解实验结果如表 2 所示。

表 1 纤维素酶酶解试验

Table 1 Enzymolysis results of bacterial cellulose

组别 Group	1	2	3	4	5
BC 膜干重 Dry weight of BC (g)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
酶解后残渣重 $m_2 - m_1$ Residue weight after enzymolysis (g)	0.0012	0.0013	0.0027	0.0046	0.0008
纤维素含量 Content of cellulose (%)	97.6	97.4	94.6	90.8	98.4
平均值 Average (%)			95.76		

表 2 细菌纤维素酸解试验

Table 2 Acidolysis results of bacterial cellulose

组别 Group	1	2	3	4	5
BC 膜干重 Dry weight of BC (g)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

酶解后残渣重 $m_2 - m_1$ Residue weight after acidolysis (g)	0.001	0.0014	0.0009	0.0009	0.0018
纤维素含量 Content of cellulose (%)	98.0	97.2	98.2	98.2	96.4
平均值 Average (%)			97.60		

纤维素酶酶解和盐酸酸解测定的数据显示本实验 AXB(X) 发酵所产菌膜所含纤维素量均在 95% 以上,说明 BC 膜具有较高的纯度。

2.3 细菌纤维素持水性考察

细菌纤维素持水性考察结果见表 3。分析可

表 3 细菌纤维素持水性考察结果

Table 3 Water holding capacity inspection results of bacterial cellulose

组别 Group	1	2	3	4	5
细菌纤维素膜湿重 m_1 Wet weight of BC m_1 (g)	2.55	2.67	2.60	2.66	2.43
细菌纤维素膜干重 m_2 Dry weight of BC m_2 (g)	0.11	0.12	0.10	0.13	0.09
持水率 Water holding capacity (%)	95.69	95.50	96.15	95.11	96.30
平均持水率 Average of water holding capacity (%)			95.75		

2.4 主要成分判定结果

在干燥的膜(以干燥滤纸作参考对照)上滴加质量分数为 66.5% 的硫酸溶液,再滴加碘化钾溶液显色,结果显示,细菌纤维素膜同干燥滤纸一样呈现蓝黑色,说明主要成分是纤维素。

2.5 傅里叶红外光谱

参照文献^[2]对细菌纤维素、桑皮纤维素、滤纸和棉纤维素四种材料进行红外光谱分析(图 1)。1 为细菌纤维素谱线,谱图中所有纤维素的特征峰-OH 基的伸缩振动吸收峰在 3426.886 cm^{-1} 附近; 2923.556 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 $\text{CH}_2\text{-CH}$ 的伸缩振动峰; 1633.411 cm^{-1} 处的吸收峰属于 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动; 1400.067 cm^{-1} 处是 C-H 键伸缩振动引起的,结晶度与此峰有关。 1371.140 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-H 的弯曲振动; 1058.728 cm^{-1} 处的强吸收峰隶属于 C-O 的伸缩振动; 914.093 cm^{-1} 附近的吸收峰是 β -糖苷键的特征峰; 667.249 cm^{-1} 处为羟基-OH 面外变形振动。

纵观整个图谱,这四种材料的红外光谱基本保持一致,结构均为纤维素,但有细微差别存在。在 1100 cm^{-1} 和 990 cm^{-1} 附近四种材料的峰强度有强有弱,表明 C-O 键的伸缩振动有区别,也即说明四种纤维晶格结晶度有一定的差异^[3]。

2.6 X-射线衍射分析

以衍射角(2θ)为横坐标,衍射强度为纵坐标得

知:细菌纤维素膜具有较强持水能力,平均持水率为 95.75%。

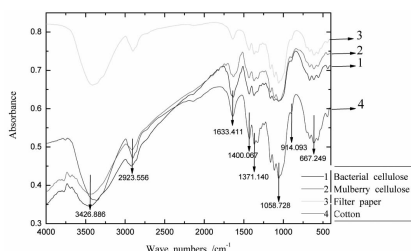


图 1 细菌纤维素(1)、桑皮纤维素(2)、滤纸(3)和棉纤维素(4)的红外图谱

Fig. 1 FT-IR spectra of bacterial cellulose (1), mulberry fiber (2), filter paper fiber (3) and cotton fiber (4)

到干膜的 X-射线衍射图谱(图 2),分析方法参照文献^[4]。

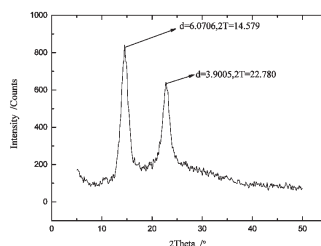


图 2 细菌纤维素的 X-射线衍射图

Fig. 2 X-ray diffraction patterns of bacterial cellulose

从图 2 中可以明显的看出,BC 的晶体峰出现的 2θ 位置为 14.579° 、 22.780° ,依据文献^[5],这两处峰为纤维素 I 型的特征峰,因此可以鉴定,由菌株 AXB(X) 所产生的菌膜主要成分是纤维素,且属于纤维

素 I。在图谱中 2θ 在 22.5° 附近的峰代表了结晶区的衍射强度^[6];通过 Jade6.5 软件对衍射图谱进行分析,获得该 BC 膜的结晶度约为 71.34%,高于竹纤维(52%)、亚麻纤维(67.42%)和棉纤维

(64.43%)的结晶度^[2,7]。

2.7 扫描电子显微镜分析

扫描电子显微镜观察细菌纤维素结果如图 3,按照左至右,上至下顺序为 a~f。

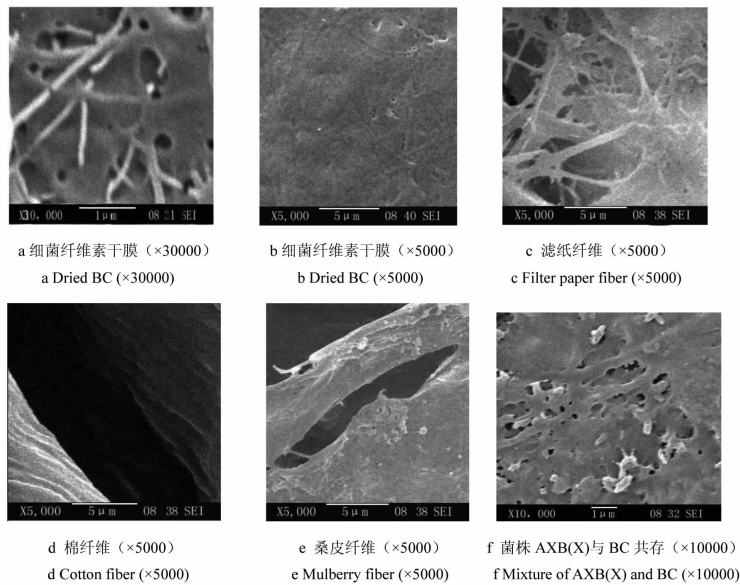


图 3 SEM 对样品表面结构的观察

Fig. 3 Observations on the structure of the sample surface by SEM

细菌纤维素干膜在 30000 和 5000 倍下的扫描电镜照片充分展示了此菌膜是有许多直径为纳米级纤维丝组成的取向不同的纤维束相互缠绕连接而成。这些纤维束无规则排列并缠绕,组成宽度不一的纤维丝带,这些纤维丝带再相互交错形成网状结构;与同一放大倍数($\times 5000$)下的其它三种纤维素(滤纸、棉纤维素和桑皮纤维素)纤维丝带相比,细菌纤维素表面更加致密,聚合度更高。

图中 f 显示,菌体与分泌的纤维素交织在一起,并有伴有突起,突起的是部分菌体,由于菌体产生亚小纤维后通过细胞膜上的微孔分泌到菌体外,然后亚小纤维通过氢键连接成微纤维,继而形成纤维丝带,结晶在菌体表面,同时由于菌体在气液界面的无规则运动,从而形成了如图 f 的形态^[8]。

3 结论

细菌纤维素是一种高纯度新型生物合成材料,由微生物在多酶复合体系精确调控下以尿苷二磷酸葡萄糖为前体,将吡喃型葡萄糖残基转移至新生成的葡聚糖链上,并穿过外膜分泌到胞外,最后经多个葡聚糖链装配、结晶与组合形成超分子织态结构。

分析上述结果表明:(1)纤维素酶酶解和 1

mol/L HCl 溶液酸解试验显示该产物纯度很高,达 95% 以上;持水性考察显示其持水率在 95% 以上;

(2)通过显色反应、傅里叶红外鉴定,进一步确认该产物的主要成分是纤维素,且通过 X-射线衍射分析可知该产物的晶型属于纤维素 I 型;

(3)扫描电子显微镜观察该产物表面形态结构显示细菌纤维素的纤维相互交织成具有超细精密多孔的网络结构。

由此也可看出,细菌纤维素具有比人工合成纤维和天然植物纤维素更高的结晶度、纯度、合成速度和产率以及环境友好等无法比拟的优良性能,表明细菌纤维素在食品、造纸、电子和生物医学等诸多领域内有着巨大的应用价值。

致谢:本研究得到了西北大学王卫卫教授、于向阳老师和西安石油大学逯燕玲老师的鼎力帮助,在此一并表示诚挚的谢意。

参考文献

- 1 Hu C(胡承),Cao HP(曹海鹏),Yuan S(袁帅),*et al.* 1 株葡糖醋杆菌及其筛选纯化方法. CN101503663, 2009-8-12.

(下转第 1471 页)