

生物基细菌纤维素/膨润土无机凝胶复合材料的制备

王波^{1,2}, 黄超¹, 杨小燕^{1,2}, 罗峻^{1,3}, 陈新德¹

(1. 中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 广州纤维产品检测研究院, 广东 广州 510220)

摘要: 通过向以水稀释 3 倍体积的玉米芯水解液中加入膨润土无机凝胶, 利用木醋杆菌原位发酵技术制得细菌纤维素/膨润土无机凝胶复合材料, 并对其微观形貌进行表征。对发酵液的 pH、产量、糖转化率和持水量进行了测试。结果表明: 扫描电子显微镜照片显示膨润土无机凝胶吸附于细菌纤维素的表面和孔内; 发酵液的 pH 随膨润土无机凝胶添加量的增大而上升并最终保持在 8 左右; 产量随膨润土无机凝胶添加量的增大而增大; 糖转化率随膨润土无机凝胶添加量的增大而减小; 复合材料的持水量随着膨润土无机凝胶添加量的增大而减小。

关键词: 细菌纤维素; 膨润土无机凝胶; 改性; 复合材料

中图分类号: TQ658

文献标识码: A

文章编号: 1001-1803(2016)01-0039-05

DOI: 10.13218/j.cnki.csd.2016.01.008

Preparation of bio-based bacterial cellulose/inorganic gel of bentonite composite

WANG Bo^{1,2}, HUANG Chao¹, YANG Xiao-yan^{1,2}, LUO Jun^{1,3}, CHEN Xin-de¹

(1. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Guangzhou Fibre Product Testing and Research Institute, Guangzhou, Guangdong 510220, China)

Abstract: Bio-based bacterial cellulose (BC) /inorganic gel of bentonite (IGB) composite was prepared by adding IGB into corncob hydrolysate, which was pre-diluted three multiples with water, and then *in situ* fermented by *Acetobacter xylinum*. Micro-morphological characteristics of the product were characterized. Yield and water holding capacity of the product, inversion of the saccharides as well as pH value of the fermentation broth were examined. The SEM images showed that the IGB is adsorbed on the surface of the BC as well as in the pores of the BC. Moreover, with the increase of addition amount of IGB, the pH value of the fermentation broth raises and finally maintains around 8, yield of the product increases, while inversion of the saccharides and water holding capacity of the product decreases.

Key words: bacterial cellulose; inorganic gel of bentonite; modification; composite

细菌纤维素(BC)作为一种新型生物可降解材料, 具有很多优良的特性, 如极强的保水性、生物适应性、合成可人工调控等, 被广泛应用于日用化工、造纸、食品及医学等领域^[1-5]。近年来, BC 在保水性面膜材料方面也受到了人们的广泛关注^[6]。根据已有报道^[7], 生产 BC 的细菌种类较多, 其中以木醋杆菌的产能最高。通常木醋杆菌发酵生产 BC 的培养基成分包括: 碳源(葡萄糖和果糖等)、氮源(蛋白胨和牛肉膏等)、

有机酸(柠檬酸和乙酰丙酸等)、无机盐(Na_2HPO_4 、钙盐和镁盐等)和生长因子(咖啡因和生物素等)。为降低生产成本, 研究者在不断探索生产 BC 的新的廉价培养基, 如工农业生产废弃物、食品加工废弃物以及生物质材料等^[8-10]。

虽然 BC 具有较多的优异性能, 但是为了使其能够更好地应用于保水性面膜等方面, 有必要对其进行一些有效的修饰和处理。通常, BC 的改性方法有原位

收稿日期: 2015-08-30; 修回日期: 2015-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51303181, 51508547); “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD32B07)

作者简介: 王波(1988-), 男, 山西人, 博士研究生, 电话: (020) 87020234, E-mail: wangbo@ms.giec.ac.cn。

通讯联系人: 陈新德, 教授级高工, 博士, 电话: (020) 37213916, E-mail: cxd_cxd@hotmail.com。

改性和非原位改性。其中原位改性具有操作简单、节约时间、修饰材料类型多样等优点,受到了人们更多的青睐^[11-13]。为实现提高 BC 保水性能的目的,可使用原位发酵技术在培养基中添加外源底物^[13,14]。在众多底物中,膨润土无机凝胶(IGB)有望成为高保水性能 BC 发酵的理想外源底物。其优势主要有 2 个方面:一是 IGB 具有遇水溶胀的物理性能,有望增强 BC 的持水性能;二是 IGB 本身对人体无毒无害,而且可以与一般的水性发酵环境所兼容,不影响 BC 的发酵过程^[15,16]。

基于此,笔者拟使用稀释 3 倍体积的玉米芯稀酸水解液为培养基,通过加入 IGB 制得 BC/IGB 复合材料,并对其性能进行测试,以期 BC 的改性及其应用提供参考。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

玉米芯稀酸水解液,中科新能源有限公司;IGB,河北省灵寿县博川膨润土加工厂。PHB-2 便携式酸度计,上海双旭电子有限公司;UV1902 紫外-可见分光光度计,上海奥析科学仪器有限公司;YRH-150F 生化培养箱,上海姚氏仪器设备厂;S-4800 冷场发射扫描电镜,日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 BC 的制备

将玉米芯稀酸水解液经吸附、脱毒,于 4℃ 下保藏备用。通过高效液相色谱分析^[17],玉米芯稀酸水解液中葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的质量浓度分别为 2.9, 37.9 和 4.9 g/L,实验前将该玉米芯稀酸水解液用去离子水稀释 3 倍体积。

取活化好的 *Acetobacter xylinum* CH001 至装有种子培养液的三角瓶中,摇床振荡培养 48 h,再以 8% 的接种量接入装有稀释 3 倍体积的玉米芯稀酸水解液(发酵液)的三角瓶中,接种时充分振荡,再用无菌封口膜封口。28℃ 下恒温静置培养 14 d,得到产品 BC,并记为对照组。

1.2.2 BC/IGB 复合材料的制备

将质量浓度为 0.5, 1 和 5 g/L 的 IGB 分别添加到稀释 3 倍体积的玉米芯稀酸水解液(发酵液)的三角瓶中,将体系的 pH 调至 6.0,高温灭菌 20 min,取活化好的 *Acetobacter xylinum* CH001 至装有种子培养液的三角瓶中,摇床振荡培养 48 h,再以 8% 的接种量接入发酵液的三角瓶中,接种时充分振荡,再用无菌封口

膜封口,28℃ 下静置培养 14 d,得到产品 BC/IGB 复合材料。

1.2.3 形貌表征

将干燥后的样品喷金镀膜,用扫描电镜进行观察。其中电压为 2.0 kV,电流为 10 μA。

1.2.4 BC 和 BC/IGB 复合材料发酵液 pH 的测定

1.2.1 和 1.2.2 的实验完成后,将所得到的样品从发酵液中用镊子取出。在 28℃ 下,用 pH 计直接测定发酵后发酵液的 pH,每组数据测试 3 次,取平均值。

1.2.5 BC 和 BC/IGB 复合材料产量的测定

由于材料持水性非常强,以湿重衡量其产量误差较大,需采用干重进行比较,干重为每升培养液含有的材料质量,单位为 g/L。将 1.2.1 和 1.2.2 实验得到的样品用大量去离子水冲洗,除去表面培养基及杂质。再将样品浸泡于 1.5% 的 NaOH 溶液中,80℃ 水浴 2 h,去除样品中的杂质,然后再用去离子水反复冲洗至中性,置于 105℃ 烘箱中烘干至恒重,称量即得材料质量。

1.2.6 糖转化率的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法进行还原糖的测定^[18]。

DNS 试剂的制备:将 6.3 g DNS 和 262 mL NaOH 溶液(2 mol/L)加入 500 mL 含有 182 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加上 5 g 重苯酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加水定容至 1 L,即制得 DNS 试剂,贮于棕色瓶中备用。

标准曲线的制作:分别取葡萄糖标准液(1 g/L) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mL 于 15 mL 试管中,用蒸馏水补足至 1.0 mL,分别准确加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水浴加热 2 min,流水冷却,用蒸馏水补足至 15 mL。在 540 nm 波长下测定吸光度,作标准曲线。

发酵液糖含量的测定:将发酵液稀释 3 倍,取稀释后的发酵液 1.0 mL 于 15 mL 试管中,加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水煮沸 2 min,冷却后用蒸馏水补足至 15 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。由标准曲线求出发酵液的糖含量,记为 ρ_1 ,单位为 g/L。

发酵后样品液糖含量的测定:取发酵后的样品液稀释 3 倍,取稀释后的样品液 1.0 mL 于 15 mL 试管中,加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水煮沸 2 min,冷却后用蒸馏水补足至 15 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。由标准曲线求出发酵后样品液中的糖含量,记为 ρ_2 ,单位为 g/L。

$$\text{糖转化率} = (\rho_1 - \rho_2) / \rho_1 \times 100\%$$

1.2.7 BC 和 BC/IGB 复合材料的持水性测定

取 1.2.5 中用去离子水冲洗到中性的 BC 和 BC/

IGB 复合材料湿膜,用吸水纸吸干湿膜表面水分,准确称其质量,记为 m_0 ,将湿膜置于 105 °C 烘箱中烘干至恒重,准确称其质量,记为 m_1 ,则持水量 = $(m_0 - m_1) / m_0 \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 BC 和 BC/IGB 复合材料的扫描电镜分析

BC 和 BC/IGB 复合材料的扫描电镜照片见图 1。由图 1a 可以看出,静态发酵所得的纯 BC 的微观结构为由无数微纤维束的相互弯曲和缠绕形成的多孔网状结构,大部分微纤维束的直径在 10 ~ 80 nm 之间,经过进一步聚合,缠绕,形成了具有超微细的三维网状结构,这些微纤维之间有大量不同尺寸的微孔,其孔径为纳米级,大量的纳米级孔可作为“模板”使用。BC 的改性是将其他高分子有机或无机分子以该“模板”为基体进行复合,控制合成具有预期特定形貌与尺寸的纳米材料,从而得到具有优异性能的新型功能材料。BC/IGB 复合材料的合成就是基于 BC 的微孔结构与 IGB 进行的复合。在过去的相關研究中,Ul - Islam 等^[19]利用非原位方法制得 BC - 蒙脱土(MMT) 复合材料,其机械和热力学性能均优于原始的 BC 膜。考虑到 MMT 的离子交换性能,Ul - Islam 等^[20]进而对改性的 MMT 与 BC 制备的复合材料进行了研究,发现 BC 与 Ca - MMT,Na - MMT 和 Cu - MMT 制备的复合材料均表现出显著的抗菌能力。Yano 等^[21]分别通过原位发酵和非原位合成的方法成功制备出 BC - Si 复合材料,结果发现原位发酵所得的 BC - Si 复合材料的机械性能低于非原位合成。Ashori 等^[22]报道了一种合成 BC - Si 复合材料的方法,将 BC 凝胶膜浸润于正硅酸乙酯溶液中 48 h,然后将其取出,在 120 °C 2 MPa 的条件下压制,即得到干燥透明的 BC - Si 复合膜。

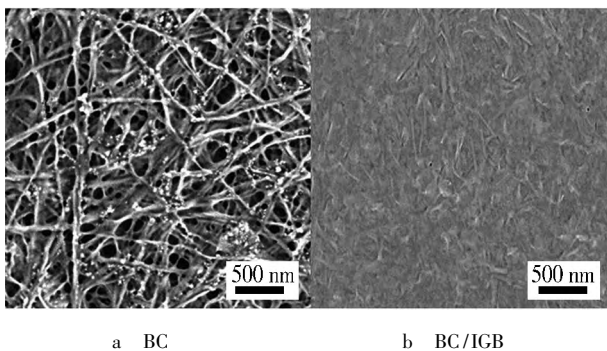


图 1 BC 和 BC/IGB 复合材料的扫描电镜照片

Fig. 1 SEM images of BC and BC/IGB composite

BC 复合材料的原位合成是在初期就将强化材料加入其培养基中,随着发酵时间的延长,其微纤维结构

会越来越致密,并形成网络结构,在此过程中培养基中的强化材料很容易进入纤维素内部^[23],并成为其结构的一部分,从而形成 BC 复合材料。

由图 1b 可以看到 IGB 已经吸附于 BC 的表面和孔内,几乎填满了整个 BC 的表面和孔洞。而 BC 与 IGB 中羟基的存在,引发微弱的有机与无机间的氢键相互作用。尽管单个聚合物链与黏土粒子间的作用是微弱的,但是无数相互结合的位点使得吸附的总能量很高^[24, 25],这些相互作用会影响 BC/IGB 复合材料的性能。

2.2 IGB 添加量对 BC/IGB 复合材料的影响

发酵液的 pH 对微生物发酵而言至关重要,这是由于无论是微生物生长还是产物积累,都需要相应的酶维持在一个合适的 pH 范围。pH 通过影响细胞膜和线粒体内外两侧的氧化还原电位,同时影响离子通透、物质运输、线粒体中氧的传递和能量代谢等,进而引起各种酶活力的改变,从而影响菌体的生长和产物的合成。IGB 的添加量对发酵液 pH 的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,IGB 的质量浓度小于 1 g/L 时,发酵液的 pH 与对照组基本相同;大于 1 g/L 之后,pH 出现较大幅度的上升,并最后保持在 8 左右。这可能是由于稀释后导致的发酵液中的营养物质减少,以及 IGB 的加入不利于木醋杆菌对营养物质的摄取。

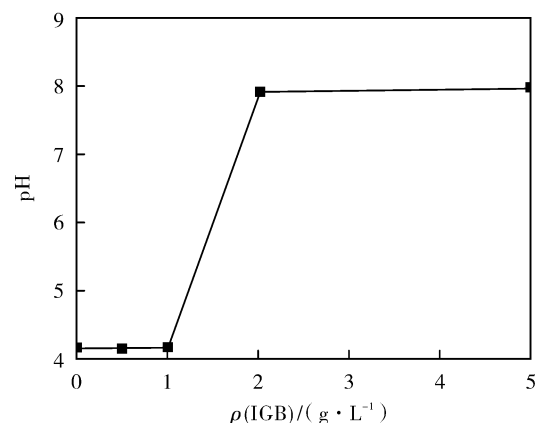


图 2 IGB 的添加量对发酵液 pH 的影响

Fig. 2 Influence of the IGB addition amount on pH value of the fermentation broth

IGB 的添加量对 BC/IGB 复合材料产量的影响见图 3。由图 3 可以看出,随着 IGB 质量浓度的增大,所得 BC/IGB 的产量有明显的上升。这是由于培养基中的强化材料进入了 BC 内部^[23],并成为其结构的一部分,从而形成 BC/IGB 复合材料。在过去的研究中,已经有很多类似的报道。例如,Saibuatong 等^[26]将不同浓度的芦荟汁加入 BC 合成培养基中,结果表明静态发酵所得 BC/IGB 在增加复合材料产量的同时,还具

有更加优异的物理机械性能。Yan 等^[27]在 BC 合成培养基中添加多壁碳纳米管(CNTs),发酵 2 周,结构分析显示其被牢固吸附于纤维束中,从而增加了 BC 复合材料的产量。Ruka 等^[28]利用原位合成的方法制备出了 BC 与不溶于水的聚-3-羟基丁酸酯(PBH)复合材料,PBH 的添加量不仅会增加 BC 的产量,还会改变其形貌和结晶度。

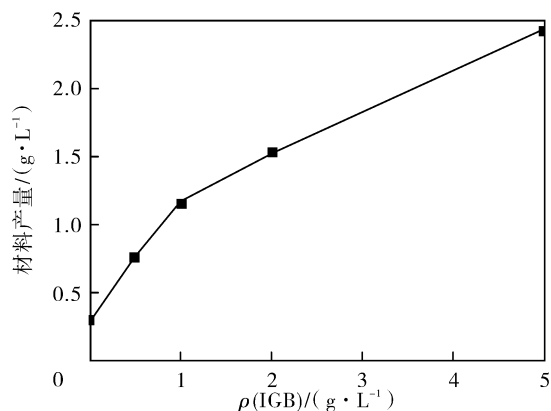


图3 IGB 的添加量对 BC/IGB 复合材料产量的影响

Fig. 3 Influence of the IGB addition amount on the yield of the BC/IGB composite

IGB 的添加量对糖转化率的影响见图 4。由图 4 可以看出,糖转化率的总体趋势是随着 IGB 质量浓度的增加而不断下降;但是在 IGB 的质量浓度为 0.5 和 1 g/L 时,其转化率与对照组基本持平。以上结果表明,添加 IGB 对糖转化率的改善未起到促进作用,其中的相互作用关系需在将来的工作中进一步研究。

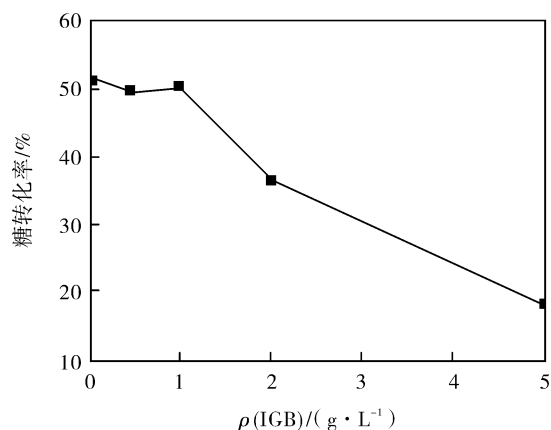


图4 IGB 的添加量对糖转化率的影响

Fig. 4 Influence of the IGB addition amount on the saccharides inversion

IGB 的添加量对 BC/IGB 复合材料持水量的影响结果见图 5。由图 5 可以很明显地看到,负载 IGB 的 BC 样品的持水量均低于对照组。IGB 的质量浓度为 1 g/L 时,BC 样品的持水量略高于 IGB 质量浓度为 0.5 g/L 时的数值。IGB/BC 复合材料水释放速率(即保水性能)的实验结果表明,IGB 粒子填充进 BC 的空

隙中,使得 BC、IGB 和水分三者之间的结合更加紧密。而且随着 IGB 质量浓度的增大,样品的水释放速率减缓,即其保水性能得到了一定的提升^[29]。所以,虽然 IGB 的加入使得所制改性 BC 的持水量减少,但是保水性能增加,所以其应用于保水性面膜领域仍具有一定的潜力。

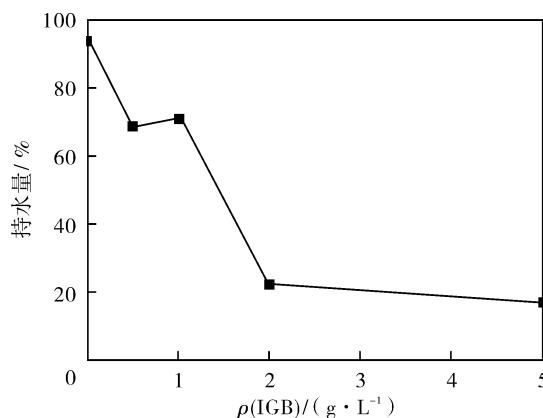


图5 IGB 的添加量对 BC/IGB 复合材料持水量的影响

Fig. 5 Influence of the IGB addition amount on the water holding capacity of the BC/IGB composite

综上所述,利用玉米芯水解液制备具有较好保湿性能的 BC/IGB 复合材料,还有很多的方面需要考虑和研究,比如优化 IGB 的结构、添加量以及 IGB 与水解液环境的相容性、与营养物质尤其是糖的作用关系、与 BC 的复合机理等。

3 结论

样品的扫描电子显微镜结果显示 IGB 已经吸附于 BC 的表面和孔内。稀释 3 倍的玉米芯水解液发酵所得 BC/IGB 复合材料体系的 pH 在 IGB 的质量浓度小于 1 g/L 时,与对照组基本相同,大于 1 g/L 之后,pH 出现较大程度的上升,保持在 8 左右;产量随着 IGB 质量浓度的增大有明显的上升;糖的转化率随着 IGB 质量浓度的增大而不断下降;样品的持水量随着 IGB 质量浓度的增大而减小。

参考文献:

- [1] JOHNSON D C, WINSLOW A R. Bacterial cellulose has potential application as new paper coating [J]. Pulp & Paper, 1990, 64(5): 105-107.
- [2] VANDAMME E J, DE BAETS S, VANBAELEN A, et al. Improved production of bacterial cellulose and its application potential [J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1): 93-99.
- [3] DUBEY V, SAXENA C, SINGH L, et al. Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane [J]. Separation and Purification Technology, 2002, 27(2): 163-171.
- [4] CHAO H, YANG XY, LIAN X, et al. Utilization of corn cob acid hydrolysate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*

- [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology ,2015 ,175(3) : 1678 - 1688.
- [5] YANG X Y ,HUANG C ,GUO H J ,et al. Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* [J]. Journal of Applied Microbiology , 2013 ,115(4) :995 - 1002.
- [6] 吴旭君. 生物纤维素面膜的制备及其功能化产品开发 [D]. 上海: 东华大学 ,2014.
- [7] ISIZAWA S ,ARARAGI M. Chromogenicity of actinomycetes [M]. Tokyo: Toppan Co ,1976: 43 - 65.
- [8] HESTRIN S ,ASCHNER M ,MAGER J. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum* [J]. Nature ,1947 ,159: 64.
- [9] KRYSZYNOWICZ A ,CZAJA W ,WIKTOROWSKA - JEZIEWSKA A , et al. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology ,2002 ,29(4) : 189 - 195.
- [10] 余华荣 ,周灿芳 ,万忠 ,等. 2011 年广东荔枝产业发展现状分析 [J]. 广东农业科技 ,2012(4) : 16 - 25.
- [11] SERAFICA G ,MORMINO R ,BUNGAY H. Inclusion of solid particles in bacterial cellulose [J]. Applied Microbiology and Biotechnology , 2002 ,58(6) : 756 - 760.
- [12] CHEN H H ,CHEN L C ,HUANG H C ,et al. *In situ* modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus* [J]. Cellulose ,2011 ,18(6) : 1573 - 1583.
- [13] SHI Z ,ZANG S ,JIANG F ,et al. *In situ* nano - assembly of bacterial cellulose - polyaniline composites [J]. Rsc Advances ,2012 ,2(3) : 1040 - 1046.
- [14] SHAH N ,UL - ISLAM M ,KHATTAK W A ,et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material [J]. Carbohydrate Polymers ,2013 ,98(2) : 1585 - 1598.
- [15] ABEND S ,LAGALY G. Sol - gel transitions of sodium montmorillonite dispersions [J]. Applied Clay Science ,2000 ,16: 201 - 227.
- [16] LUCKHAM P F ,ROSSI S. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions [J]. Advances in Colloid & Interface Science , 1999 ,82: 43 - 92.
- [17] YANG X Y ,HUANG C ,GUO H J ,et al. Beneficial effect of acetic acid on the xylose utilization and bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* [J]. Indian Journal of Microbiology ,2014 , 54(3) : 268 - 273.
- [18] 王文岭 ,黄雪松. DNS 法测定木糖含量时最佳测定波长的选择 [J]. 食品科学 ,2006 ,27(4) : 196 - 198.
- [19] UL - ISLAM M ,KHAN T ,PARK J K. Nanoreinforced bacterial cellulose - montmorillonite composites for biomedical applications [J]. Carbohydrate Polymers ,2012 ,89(4) : 1189 - 1197.
- [20] UL - ISLAM M ,KHAN T ,KHATTAK W A ,et al. Bacterial cellulose - MMTs nanoreinforced composite films: Novel wound dressing material with antibacterial properties [J]. Cellulose ,2013 ,20(2) : 589 - 596.
- [21] YANO S ,MAEDA H ,NAKAJIMA M ,et al. Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles [J]. Cellulose ,2008 ,15(1) : 111 - 120.
- [22] ASHORI A ,SHEYKHNAZARI S ,TABARSA T ,et al. Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization [J]. Carbohydrate Polymers ,2012 ,90(1) : 413 - 418.
- [23] UL - ISLAM M ,KHAN T ,PARK J K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification [J]. Carbohydrate Polymers ,2012 ,88(2) : 596 - 603.
- [24] LI S M ,JIA N ,ZHU J F ,et al. Synthesis of cellulose - calcium silicate nanocomposites in ethanol/water mixed solvents and their characterization [J]. Carbohydrate Polymers ,2010 ,80(1) : 270 - 275.
- [25] TI - IENG B. Interactions of clay minerals with organic polymers: Some practical applications [J]. Clays and Clay Minerals ,1970 ,18: 357 - 362.
- [26] SAIBUATONG O A ,PHISALAPHONG M. Novo aloe vera - bacterial cellulose composite film from biosynthesis [J]. Carbohydrate Polymers ,2010 ,79(2) : 455 - 460.
- [27] YAN Z Y ,CHEN S Y ,WANG H P ,et al. Biosynthesis of bacterial cellulose/multi - walled carbon nanotubes in agitated culture [J]. Carbohydrate Polymers ,2008 ,74(3) : 659 - 665.
- [28] RUKA D R ,SIMON G P ,DEAN K M. *In situ* modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly - 3 - hydroxybutyrate [J]. Carbohydrate Polymers ,2013 ,92(2) : 1717 - 1723.
- [29] WANG B ,QI G X ,HUANG C ,et al. Preparation of bacterial cellulose/inorganic gel of bentonite composite by *in situ* modification [J]. Indian Journal of Microbiology ,DOI: 10. 1007 /s12088 - 015 - 0550 - 8.

《日用化学工业》启事

为严肃宣传纪律、遵守各项保密规定、维护著作权人的合法权益、强化期刊的规范化管理,本刊重申:

1) 凡职务作品(著作)作者(或撰稿人、联系人)在投稿时应依法征得所在单位同意,进行保密审查,并向本刊出示加盖单位公章的证明材料。

2) 凡 2 人以上合作作品,合作者对作品在发表、署名、署名顺序以及修改等方面应事先取得统一约定,投稿时向本刊出示相关证明。

本刊根据“文责自负”的原则精神,对于不符合上述要求的来稿不承诺有关责任,或不予受理。

热忱欢迎投稿! 网址: www. cicdei. net. cn 邮箱: gybjb@163. com 电话: (0351) 4062697。

《日用化学工业》编辑部