DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.06.036

利用废烟末发酵制备细菌纤维素

Bacterial cellulose production by fermentation using tobacco waste as culture medium

张婷婷 冯颖杰 杨宗灿 文秋成

ZHANG Ting-ting FENG Ying-jie YANG Zong-can WEN Qiu-cheng

王高杰 马胜涛 李怀奇 张 展

WANG Gao-jie MA Sheng-tao LI Huai-qi ZHANG Zhan

(河南中烟烟工业有限责任公司技术中心,河南 郑州 450000)

(*Technology Center of Henan Tobacco Industrial Co., Ltd., Zhengzhou, Henan* 450000, *China*)

摘要:为促进烟草废弃物处置利用,对废弃烟末发酵制备细菌纤维素(baterial cellulose,BC)可行性进行研究,比较了烟末浸提处理方法,优化了接种量、温度、pH、发酵时间等条件,开展了重复发酵验证,并与传统 HS 培养基发酵制备的 BC 进行了结构和性质对比。结果表明:① 烟末浸提液可直接作为发酵原料生产 BC,无需额外添加碳源氮源;② 发酵产 BC 的最佳条件为接种量 6%,初始 pH 为 5,温度 30 ℃,发酵 7 d;③ 对于不同批次烟末,随着原料中糖含量提高,BC 产量增加,由 1.8 g/L 增至2.5 g/L;④ 烟末发酵制备的 BC 与传统 HS 培养基发酵的产品相比,吸水性能相当,形貌结构无显著差异。依托生物技术利用废烟末发酵制备 BC 是可行的。

关键词:细菌纤维素;废弃烟末;微生物;发酵

Abstract: In order to promote the comprehensive utilization of tobacco waste, the process of fermentation of tobacco waste to prepare bacterial cellulose (baterial cellulose, BC) was studied. The methods of tobacco waste extracting were compared, and the conditions such as inoculum size, temperature, pH and fermentation time were optimized. The repeated fermentation verification was carried out and the structure and properties of BC prepared by fermentation with traditional HS medium were compared. The results showed that tobacco waste extract can directly produce BC as fermentation raw material without additional carbon source and nitrogen source. The optimal conditions for BC fermentation were inoculum size 6%, initial pH 5, temperature 30 ℃, fermentation 7 d. For different batches of tobacco waste, with the increase of sugar content in raw materials, BC production increased from 1.8 g/L to 2.5 g/L. In comparison, the water absorption performance of BC prepared by tobacco waste fermentation is comparable with the traditional HS medium fermented products, and their morphology and structures are not significantly different. Relying on biotechnology to produce BC by using tobacco waste fermentation provides a new way to expand the utilization value of tobacco resources.

Keywords: baterial cellulose; tobacco waste; microorganism; fermentation

中国每年烟叶产量 450 万~500 万 t,且在烟草种植和加工过程中产生的低次烟叶、茎秆、权烟等烟草废弃物可达烟叶总产量的 25%[1]。目前国内外对废、次烟叶产品的综合利用主要是从中提取茄尼醇、烟碱和蛋白质等,也有用于制作有机肥料及鸡饲料,但其大部分被作为废物丢弃或焚烧,造成了自然资源的浪费和极大的环境污染[2]。

细菌纤维素(BC)具有与植物纤维素相似的化学成分,却具有更高的纯度、持水性、聚合度、结晶度,以及更良好的生物相容性和更高机械强度[3]。基于独特的优良性质,细菌纤维素作为一种新型纳米生物材料受到科学和工业界的广泛关注,并在食品工业、生物医学、造纸、声学器材、纺织等多个领域得到广泛研究和应用[4-5]。

细菌纤维素生产中,培养基原料的成本偏高尤其是碳源的成本偏高,制约了细菌纤维素的大规模生产和商业化进程。近年来,各种工业副产品和农林业废物已被用作碳源以提高产量和减少 BC 生产的成本。截至目前,

基金项目:河南中烟科技项目(编号:YN201710);河南中烟新型烟草项目(编号:BN2019003)

作者简介:张婷婷,女,河南中烟工业有限责任公司工程师,硕士。

通信作者:张展(1982—),男,河南中烟工业有限责任公司高级工程师,博士。E-mail: zhangzhan2059729@126.com

收稿日期:2020-01-15

已有几种原料废料被证实是 BC 生产的潜在基质,如果汁、玉米秸秆、饮料工业废弃物、玉米芯酸水解物和废啤酒酵母[5-7]。烟草中富含糖、氨基酸、无机盐等组分,可作为发酵底物,但利用烟草废料发酵生产细菌纤维素尚未见报道。

试验拟研究利用烟草废料提取液发酵生产细菌纤维素的可行性,探索烟草废料利用,旨在为 BC 生物材料生产提供有效碳源,同时为拓展烟草废弃物的综合利用提供一条全新的途径。

1　材料与方法

1.1　材料、试剂和仪器

1.1.1　材料与试剂

废弃烟末:收集自河南中烟工业有限责任公司卷烟厂除尘车间;

发酵菌种:木醋杆菌,实验室保藏;

酵母粉、蛋白胨:美国 OXOID 公司;

淀粉酶:4 000 U/g,无锡杰能科生物工程有限公司;

葡萄糖、磷酸氢二钠、柠檬酸、硫酸、氢氧化钠:分析纯,中国医药集团有限公司。

1.1.2　主要仪器设备

恒温恒湿培养箱:Forma3913 型,赛默飞世尔科技公司;

连续流动分析仪:AutoAnalyzer3 型,德国 Seal 公司;

射线衍射仪:XRD-6100 型,日本岛津制作所;

傅立叶变换红外光谱仪:VERTEX70 型,德国布鲁克仪器公司;

透射电镜:JEM-1011 型,日本电子株式会社。

1.2　方法

1.2.1　烟末浸提液及 HS 培养基制备

(1) HS 液体培养基:葡萄糖 20 g/L、酵母粉 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、磷酸氢二钠 4 g/L、一水合柠檬酸 1.2 g/L,120 ℃灭菌 10 min。

(2) 烟末浸提液培养基:烟末 100 g/L,在 70 ℃条件下浸提 100 min 后过滤,保留滤液,120 ℃灭菌 10 min。

(3) 烟末浸提液酶解处理培养基:烟末 100 g/L,淀粉酶 200 U/mL,在 50 ℃条件下浸提 100 min 后过滤,保留滤液,120 ℃灭菌 10 min。

(4) 烟末浸提液酸解处理培养基:烟末 100 g/L,硫酸 1 mol/L,在 70 ℃条件下浸提 100 min 后过滤,保留滤液,120 ℃灭菌 10 min。

1.2.2　烟末浸提液常规组分测定　取 2 mL 浸提液,加入 1 mL 乙酸和 17 mL 蒸馏水,100 r/min 震荡 40 min,过滤后进行分析。

(1) 水溶性糖:按 YC/T 159—2002 执行。

(2) 总氮(不包括硝态氮):按 YC/T 161—2002 执行。

(3) 总植物碱(以烟碱计):按 YC/T 160—2002 执行。

(4) 氯:按 YC/T 162—2002 执行。

1.2.3　发酵培养优化　从菌种斜面上,用接种环挑取菌落,接种至 HS 液体培养基中,在 30 ℃恒温条件下,以 120 r/min 震荡培养 24 h,得到种子液。利用烟末浸提液作为培养基,对发酵条件进行优化,单因素试验设计:

(1) 发酵温度:在初始 pH 值 5,接种 4%,发酵时间 7 d的条件下,考察发酵温度(20,25,30,35,40 ℃)对细菌纤维素膜产量的影响。

(2) 发酵时间:在初始 pH 值 5,接种 4%,发酵温度 30 ℃条件下,考察发酵时间(4,7,8,9,10 d)对细菌纤维素膜产量的影响。

(3) 接种量:在初始 pH 值 5,发酵温度 30 ℃,发酵时间 7 d 的条件下,考察接种量(4%,6%,8%,10%,15%)对细菌纤维素膜产量的影响。

(4) pH 值:在接种 4%,发酵温度 30 ℃,发酵时间 7 d 的条件下,考察发酵初始 pH 值(4.5,5.0,5.5,6.0,6.5)对细菌纤维素膜产量的影响。

1.2.4　细菌纤维素物理表征

(1) 扫描电镜观察:冷冻干燥后的 BC 膜粘于导电胶上,置于真空镀膜机中进行表面喷金 1 min,放入扫描电镜中观察并拍照,观察电压为 5 kV。

(2) 红外光谱分析:采用 KBr 压片进行红外光谱表征,分辨率为 4 cm^{-1},扫描范围为 400～4 000 cm^{-1}。

(3) X 射线衍射分析:Cu 靶,40 kV 高压,管流为 40 mA,2θ 为 10°～80°扫描,得到 XRD 光谱,采用 Jade 软件分析处理数据。

1.2.5　BC 产量和持水性计算　根据文献[8]修改如下:将发酵获得的 BC 膜捞出,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡,沸水浴中煮 1 h,然后用蒸馏水反复洗涤至中性。将洗涤后经 4 000 r/min 离心 20 min 的细菌纤维素膜定义为湿膜,将 105 ℃下烘干至恒重的细菌纤维素膜定义为干膜,将干膜于常温水中浸泡 48 h 后用滤纸吸干表面水分,所得膜定义为复水膜。分别按(1)～(3)计算 BC 的产量、含水率和复水率。

$$R = \frac{M_d}{V}, \tag{1}$$

$$c_1 = \frac{M_w - M_d}{M_w} \times 100\%, \tag{2}$$

$$c_2 = \frac{M_{wr} - M_d}{M_{wr}} \times 100\%, \tag{3}$$

式中:

R ——细菌纤维素产量,g/L;

c_1 ——湿膜含水率,%;

c_2 ——干膜复水率，%；

V ——发酵液体积，L；

M_w ——湿膜的质量，g；

M_d ——干膜的质量，g；

M_{wr} ——复水膜的质量，g。

2 结果与讨论

2.1 不同烟末浸提处理方法比较

如图 1 所示，直接采用水提处理的烟末浸提液培养基时，BC 可以有效生长，产量约达 1.6 g/L。采用淀粉酶酶解处理烟末制得的浸提液培养中还原糖和总糖浓度略有增加，BC 产量也提高至 1.7 g/L。采用稀硫酸水解烟末制备的浸提液培养基中糖浓度最高，但是 BC 的生长完全被抑制。这可能是由于浸提液的 pH 偏低，不利于微生物的生长。但采用 NaOH 将浸提液 pH 调节至 5 左右时，BC 产量仅为 1.0 g/L。文献[9]报道，酸解过程中可能会增加糠醛类等抑制微生物活性的组分，从而给 BC 的生长带来不利影响。总体比较认为，酶处理或酸解处理流程更复杂，成本更高，且对 BC 产量没有显著的促进作用。因此，烟末直接水提作为 BC 生产的培养基是最佳选择。

2.2 发酵工艺优化

采用烟末直接水提的浸提液做培养基，考察了接种量、温度、pH、发酵时间等条件对 BC 产量的影响，如图 2 所示。由图 2 可知：

(1) 发酵温度由 20 ℃升高至 30 ℃时，BC 产量显著提高。当温度进一步升高至 35 ℃时，BC 产量下降，在 40 ℃菌体几乎没有细菌纤维素的生成，微生物的生长需要依靠酶将蛋白质、糖类等物质进行分解而后被细胞利用，当温度过低或过高时都会影响酶的活性，造成细菌纤维素产量下降，结果表明 30 ℃最适合菌体生长和代谢产物生成，是最佳发酵温度。

(2) BC 产量在 0～7 d 内随着发酵时间的延长迅速增长，7～10 d BC 产量增长缓慢。这可能由于发酵初期碳源、氮源等营养充足，菌体生长较快，随着发酵时间的延长，碳源、氮源等大量消耗且葡萄糖酸、乙酸等代谢副产物积累，发酵液的 pH 下降，抑制了 BC 的合成。因此，最佳发酵时间以 7 d 为宜。

(3) 随着接种量的增加，BC 产量逐渐增加，当接种量超过 6%后，BC 产量增加幅度趋缓。提高接种量或许可以缩短延迟期，加快菌体生长，使产物形成期提前，但是如果接种量过多，也会导致底物前期消耗过快，不利于后期产物积累。而且在接种量较高的情况下，由于菌体浓度过大，可能导致代谢产酸过多，发酵液中的溶氧减少，反而影响 BC 的合成[10]。因此，最佳接种量选定为 6%。

(4) 初始 pH 值为 5 时 BC 产量最高，当 pH 过高或过低时，BC 产量都会下降，因此最佳发酵初始 pH 值为 5。

综上所述，利用烟末废料水提液作为培养基，利用木醋杆菌进行发酵，最优发酵条件为接种量 6%，初始 pH 5，温度 30 ℃，发酵时间 7 d。

2.3 重复发酵验证

为了验证菌株对原料的适应性和发酵稳定性，选取不同批次的废弃烟末开展了重复发酵验证试验，参照文献[11]，在烟末与水比例 1∶10 (g/mL)，温度 70 ℃条件下，对烟末水提 60 min，烟末提取液常规组分如表 1 所示，提取液中还原糖、总糖、总氮等各项组分浓度高低与烟末原料表现一致，F 号烟末提取液总糖和还原糖含量最高(分别为 18.15，16.28 mg/mL)，A 号烟末提取液总糖和还原糖含量最低(分别为 9.46，8.72 mg/mL)，6 种烟末总碱、总氮、氯等组分则含量较为接近。

按照 2.2 优化的工艺条件，以 6 种烟末提取液为培养基在 30 ℃条件下、接种 6%、发酵 7 d，以 HS 培养基为对照，细菌纤维素产量如图 3 所示，BC 产量为 1.8～2.5 g/L。从图 3 可以看出，6 种烟末糖浓度高低与发酵产生的 BC 产量表现一致，F 号烟末提取液发酵的 BC 产量最高，接近 HS 培养基 BC 产量，说明烟末提取液能够满足菌体生长，是发酵产生细菌纤维素的良好底物。

2.4 细菌纤维素表征

由图 4 可知，以烟末提取液作为培养基产生的细菌纤维素拥有密集的交织超细纤维网络，其直径远小于天然纤维素，与前人[12]研究的使用其他原始废料产生细菌纤维素的观察结果相似。与 HS 培养基相比，烟末培养基产生的细菌纤维素有密度较大的网络和较小的原纤维宽度，以及更为光滑的纤维表面。

如图 5 所示，所有 BC 样品具有纤维素 I 型衍射特征。从 HS 培养基获得的 BC 在 2θ 角 14.34°，16.28°，22.46°处具有峰，从烟草提取液获得的 BC 的 2θ 角14.36°，16.32°，22.50°处具有峰，3 个衍射峰分别对应于($1\bar{1}0$)(110)和(200)晶面。基于峰强度计算结晶度指数(CI)使

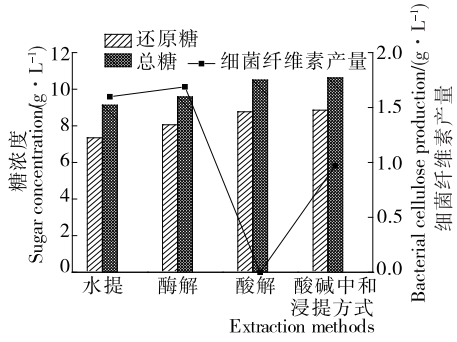
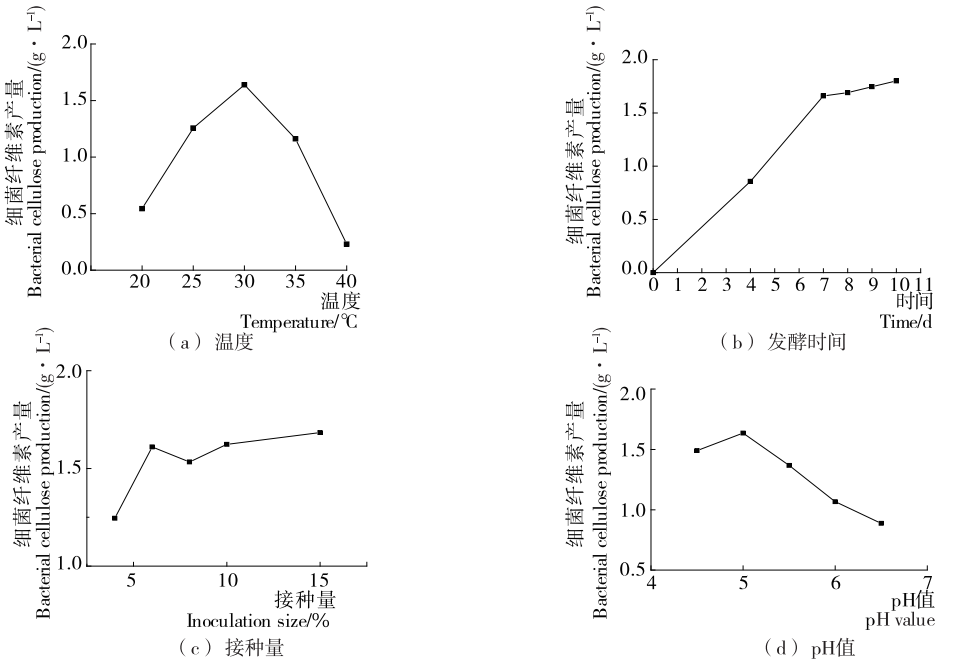


图 1 不同烟末浸提法细菌纤维素产量

Figure 1 Bacterial cellulose production by different extraction methods



（a）温度　（b）发酵时间　（c）接种量　（d）pH值

图 2　BC 发酵条件优化

Figure 2　Optimization of BC fermentation conditions

表 1　6 种烟末提取液常规组分

Table 1　Conventional components of six kinds of tobacco waste extracts　　mg/mL

烟末	还原性糖	总糖	总碱	总氮	氯
A	8.72	9.46	2.09	2.13	0.49
B	9.41	10.13	2.00	1.68	0.61
C	10.65	12.19	1.77	1.82	0.58
D	12.83	14.68	2.00	2.01	0.66
E	14.57	16.24	2.36	2.05	0.58
F	16.28	18.15	2.42	1.70	0.62

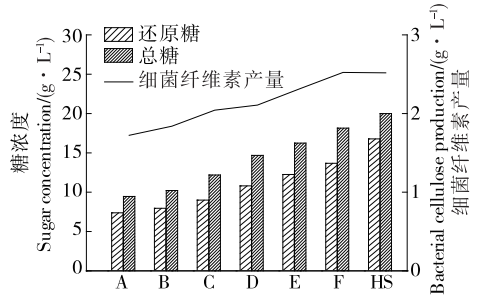
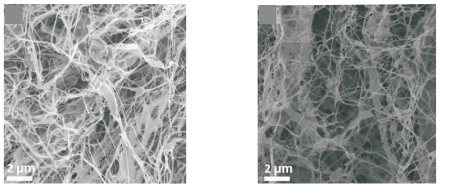


图 3　烟末水提取液糖浓度与细菌纤维素产量关系

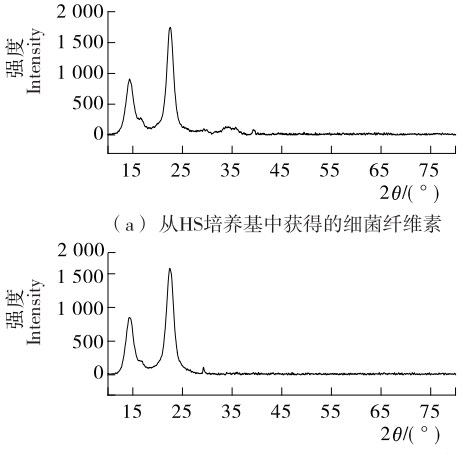
Figure 3　Relationship between sugar concentration of different tobacco waste extracts and bacterial cellulose production



（a）从HS培养基中获得的细菌纤维素　（b）从烟末提取液中获得的细菌纤维素

图 4　细菌纤维素扫描电镜图

Figure 4　Scanning electron micrograph of bacterial cellulose



（a）从HS培养基中获得的细菌纤维素

（b）从烟末提取液中获得的细菌纤维素

图 5　细菌纤维素 XRD 图

Figure 5　Bacterial cellulose XRD graph

用 Segal 方法[13]。从 HS 培养基获得的细菌纤维素和从烟草提取液获得的细菌纤维结晶度分别为 87.88%，92.03%。结果表明这些 BC 样本具有相似的结晶度，表明其具有相似的结晶形态聚合物和膜的物理特性。

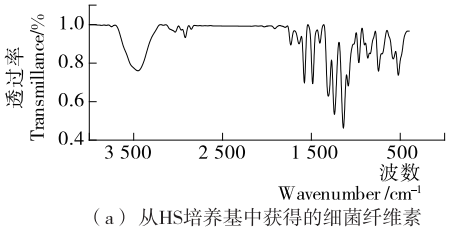
如图 6 所示，来自 HS 培养基、烟末提取液的细菌纤维素样品同购买所得样品一样具有纤维素的特征峰。区分峰值 3 340 cm^{-1}表示 O—H 拉伸，2 900 cm^{-1}表示 C—H 伸缩，1 645 cm^{-1}表示 C—O—C 拉伸，1 064 cm^{-1}表示 C—O 拉伸和 900 cm^{-1}表示平面内的 γ(COC)，对称拉伸，Jahan 等[14]已经报道了类似的研究结果。从 HS 培养基和烟末提取液获得的细菌纤维素未见明显区别，表明培养介质对 BC 功能团没有影响。

如表 2 所示，从烟草提取液中获得的细菌纤维素膜含水率为 97.9%，略低于 HS 培养基中的细菌纤维素膜，两种细菌纤维素膜的复水率相似，分别为 67.5%，67.9%，两种培养基中获得的膜持水性相似。

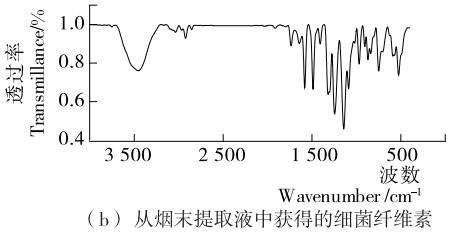
综上所述，烟末发酵制备的 BC 与对照样品(HS 培养基)相比，在形貌结构，物理性能上均无显著差异。

3　结论

结果表明，烟末水浸提液可直接作为发酵原料生产细菌纤维素，无需额外添加碳源氮源；以烟末水浸提液为原料，发酵产细菌纤维素的最优工艺为接种量 6%，初始 pH 为 5，温度 30 ℃，发酵时间 7 d；不同批次的废弃烟末发酵验证表明，细菌纤维素产量随原料中糖含量的增加而增加，产量在 1.8～2.5 g/L，与 HS 培养基相当；烟末发酵制备的细菌纤维素与对照样品(HS 培养基)相比，在形貌结构上无显著差异。综上所述，利用烟草废弃物发酵制备细菌纤维素具有可行性。



(a) 从HS培养基中获得的细菌纤维素



(b) 从烟末提取液中获得的细菌纤维素

图 6　细菌纤维素红外光谱图

Figure 6　FI-IR graph of bacterial cellulose

表 2　细菌纤维素含水率和复水率

Table 2　Bacterial cellulose moisture content and rehydration rate

来源	湿膜质量/g	干膜质量/g	复水膜质量/g	含水率/%	复水率/%
HS 培养基	5.45	0.082	0.255	98.5	67.9
烟末提取液	5.11	0.107	0.329	97.9	67.5

参考文献

[1] 彭国勋，李平，吴锡刚，等. 废弃物资源化利用研究进展[J]. 安徽农业科学，2013，41(9)：4 036-4 038.

[2] BORZANI W，SOUZA S J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media[J]. Biotechnol Lett，1995，17(11)：1 271-1 272.

[3] 谭玉静. 细菌纤维素的发酵生产及其物理化学性质初探[D]. 上海：东华大学，2007：24-30.

[4] LUO Zheng-hui，ZHANG Jia-ping. Advances in the research of antibacterial composite dressings based on bacterial cellulose[J]. Chinese Journal of Burns，2018，34(5)：314-317.

[5] KIM S S，LEE S Y，PARK K J，et al. Gluconacetobacter sp. gel _ SEA623-2，bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice[J]. Saudi Journal of Biological Sciences，2017，24(2)：314-319.

[6] CHENG Zheng，YANG Ren-dang，LIU Xu，et al. Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source[J]. Bioresource Technology，2017，234：8-14.

[7] HUANG Chao，YANG Xiao- yan，XIONG Lian，et al. Utilization of corncob acid hydrolysate for bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2015，175(3)：1 678-1 688.

[8] 周莲，陈莉，卢红梅，等. 增效因子对木醋杆菌产细菌纤维素结构性质的影响[J]. 纤维素科学与技术，2015，23(2)：34-43.

[9] 李元敬. 细菌纤维素发酵优化及代谢途径调控[D]. 哈尔滨：黑龙江大学，2011：40-43.

[10] RÖMLING U. Molecular biology of cellulose production in bacteria[J]. Research in Microbiology，2002，153(4)：205-212.

[11] 高文花，陈克复，叶代启，等. 废弃烟梗和烟末中主要化学组分的浸渍提取[J]. 华南理工大学学报，2014，42(5)：41-47.

[12] YANG Xiao-yan，HUANG Chao，GUO Hai-jun，et al. Bacterial cellulose production from the litchi extract by Gluconacetobacter xylinus[J]. Prep Biochem Biotechnol，2016，46(1)：39-43.

[13] COSTA A，ALMEIDA F，VINHAS G，et al. Production of bacterial cellulose by gluconacetobacter hansenii using corn steep liquor as nutrient sources[J]. Front Microbiol，2017，8：2 027.

[14] JAHAN F，KUMAR V，SAXENA R K，et al. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production：A biopolymer of great commercial importance[J]. Bioresour Technol，2018，250：922-926.