

果汁发酵生产细菌纤维素

张俊娜¹, 甘 峰², 李志西^{1,*}, 林德慧¹, 潘凯旋¹

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2.咸阳市渭城区农业技术推广站, 陕西 咸阳 712000)

摘 要: 为提高果汁发酵生产细菌纤维素的产量, 开发特色纤维素功能性食品, 以葡糖醋杆菌 CGMCC 3917 为实验菌种, 以苹果汁和梨汁为发酵培养基生产细菌纤维素(BC), 研究果汁用量和酵母膏添加量对细菌纤维素产量的影响, 比较分析两种果汁生产的细菌纤维素在产量、结构和性质方面的差别。结果表明: 梨汁发酵生产的细菌纤维素产量明显高于苹果汁, 可达 46.343g/100mL; 其 BC 干膜复水率显著高于苹果汁, BC 干膜的总糖含量稍高于苹果汁。两种果汁发酵生产的细菌纤维素在湿膜持水量及干膜的纤维素含量、蛋白质含量、脂肪含量以及微观结构上没有明显差异。

关键词: 苹果汁; 梨汁; 葡糖醋杆菌; 细菌纤维素

Bacterial Cellulose Production by Fruit Juice Fermentation

ZHANG Jun-na¹, GAN Feng², LI Zhi-xi^{1,*}, LIN De-hui¹, PAN Kai-xuan¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Agricultural Technology Promotion Station, Weicheng District, Xianyang 712000, China)

Abstract: To improve bacterial cellulose (BC) production and to develop specific cellulose functional food products, BC was prepared from the fermentation of apple juice or pear juice by *Gluconoacetobacter hansenii* CGMCC 3917. The influence of fruit juice dilution and amount of added yeast extract on BC yield was evaluated. Meanwhile, further studies were done to investigate the influence of fruit juice type on BC production, structure and properties. The results showed that pear juice provided more production of BC than apple juice, reaching 46.343 g/100 mL. Moreover, dried BC membranes from pear juice showed a significantly higher rehydration rate, and a slightly higher total sugar content than those from apple juice. There were no pronounced differences in water content of wet BC membranes and cellulose, protein and fat contents and microstructure of dry BC membranes between both fruit juices.

Key words: apple juice; pear juice; *Gluconoacetobacter hansenii*; bacterial cellulose

中图分类号: TQ929

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0240-04

细菌纤维素(bacterial cellulose, BC)是一类由微生物产生的细胞外纤维素, 与植物纤维和动物纤维相比, 它具有高持水性、高结晶度、超细超纯的网状结构等特性^[1-2], 在食品工业、造纸工业、化学工业、医药工业等领域具有很高的利用价值和十分广泛的商业化应用前景^[3-5]。由于 BC 对人体具有许多独特功能, 如改善消化系统内环境、预防便秘、清肠毒、降低胆固醇、减肥和防癌、抗衰老等^[6-7], 加之良好的亲水性、持水性、凝胶特性、稳定性等优良特性, 作为新型功能性食品基料具有很强的吸引力^[8]。随着人民生活水平的提高和食物结构的变化, 膳食纤维的摄入量明显不足^[9]。

因此, 食用型 BC 开发具有一定的现实意义。我国海南地区的“椰果”就是以椰子汁为原料发酵生产的 BC 产品^[7,10-11]。椰果在东南亚、日本及我国台湾地区也非常流行^[12]。但是, “椰果”只有在产椰子的地区才能生产, 地域性很强, 生产受到限制。有研究曾以橘汁、凤梨汁、葡萄汁、番茄汁、西瓜汁、猕猴桃果汁等为主要原料生产 BC^[10], 取得了一定成效。梨和苹果是我国北方的主要水果, 资源丰富, 含有丰富的果糖、蔗糖和葡萄糖以及苹果酸、柠檬酸和酒石酸等有机酸^[13], 是生产 BC 的好原料。本研究以苹果汁和梨汁为原料, 以葡糖醋杆菌 CGMCC 3917 为实验菌种发酵生产 BC, 对

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (QN2009072)

作者简介: 张俊娜(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食工程与发酵技术创新。E-mail: zhangjunna_123@126.com

* 通信作者: 李志西(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为粮食工程与发酵技术创新。E-mail: lzx580721@yahoo.com.cn

两种果汁生产的 BC 产量进行比较, 并对其结构和性质进行分析, 为开发特色功能食品探索新途径。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

富士苹果、鸭梨购买于杨凌市场, 去皮后用榨汁, 用蔗糖将其可溶性固形物含量调至 12% 后, 备用; 酵母膏(分析纯) 北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 菌种与培养基

菌种由本实验室从荞麦醋中分离纯化, 通过高压诱变得到高产菌株 CGMCC 3917^[2,14]。经过 16S rRNA 鉴定为葡糖醋杆菌中的汉氏菌, 现保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

种子培养基(葡萄糖 7%、酵母膏 0.5%、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5%、无水乙醇 2%、琼脂 1.8%(固体培养基))于 121℃, 灭菌 30min^[15]。

发酵培养基: 苹果汁 + 酵母膏; 梨汁 + 酵母膏。

1.3 仪器与设备

YXQ-LS-30SII 立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; JH-2 超净工作台 北京科伟永兴仪器有限公司; ZPS-250 智能生化培养箱 黑龙江东拓仪器制造有限公司; DHZ-DA 冷冻恒温振荡器 太仓市试验设备厂; JYZ-560 榨汁机 九阳股份有限公司; JSM-35CF 型扫描电镜 日本电子株式会社; SFG-02.400 电热恒温鼓风干燥箱 黄石市恒丰医疗器械有限公司。

1.4 方 法

1.4.1 培养方法^[16]

种子培养: 取一环活化好的斜面菌种, 接到种子培养基中, 30℃、150r/min 振荡培养 24h。

发酵培养: 以 9% 的接种量, 将种子液接入装有 100mL 的苹果汁、梨汁发酵培养基中, 8 层纱布封口, 30℃恒温静置培养 8d。

1.4.2 BC 处理

静置培养 8d 后, 取出 BC 膜, 用流动水反复漂洗后, 置于 0.1mol/L NaOH 溶液中煮沸 30min 除去菌体, 取出后再用 0.1mol/L NaOH 溶液浸泡至白色半透明状^[17], 然后放在 0.5% 醋酸溶液中和, 再用去离子水冲洗反复冲洗至 pH 中性, 用滤纸拭去表面水分后称其质量(以湿膜质量浓度计, g/100mL), 然后用电热干燥箱在(68 ± 2)℃的温度下干燥至恒质量, 称质量^[18]。BC 的产量以每 100mL 培养基中产生的纤维素湿膜的克数表示/(g/100mL)^[7]。

1.4.3 果汁用量对 BC 产量的影响

在苹果汁和梨汁中加不同量的蒸馏水, 使果汁所占

体积分数分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%, 100℃灭菌 15min 后, 以 9% 的接种量接入种子液, 30℃恒温静置培养 8d, 取出 BC 按 1.4.2 节方法处理后测其湿质量。

1.4.4 酵母膏添加量对 BC 产量的影响

在纯苹果汁和梨汁培养基中分别添加质量分数为 0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0% 的酵母膏, 100℃灭菌 15min 后, 以 9% 的接种量接入种子液, 30℃恒温静置培养 8d, 取出 BC 按 1.4.2 节方法处理后测其湿膜质量。

1.4.5 BC 的持水量

将 BC 湿膜和干膜质量称量后, 计算 BC 持水量。

$$BC\text{持水量}/\% = \frac{m - m_1}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中: m 为湿膜质量/g; m_1 为干膜质量/g。

1.4.6 BC 干膜复水率

将纤维素干膜称质量后, 放于干净的培养皿中, 向培养皿中加蒸馏水, 使纤维素干膜完全浸泡在水中, 过夜后取出, 用滤纸拭去表面水分, 称量纤维素膜吸水后的质量, 计算 BC 干膜复水率。

$$BC\text{干膜复水率}/\% = \frac{\text{吸水后BC质量} - BC\text{干膜质量}}{\text{吸水后BC质量}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.7 指标测定

纤维素含量的测定采用纤维素酶水解法; 蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法; 脂肪含量的测定采用索氏抽提法; 总糖含量的测定采用 3,5- 二硝基水杨酸法。

1.4.8 BC 的微观结构观察^[15]

将处理好的 BC 湿膜, 用 3% 的戊二醛溶液固定过夜, 再用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)清洗 3 次, 每次 5min, 然后依次用体积分数为 15%、30%、50%、70% 的乙醇依次各浸泡 15min, 分别用体积分数 80%、90%、95% 乙醇脱水 20min, 用无水乙醇脱水 3 次, 每次 30min, 最后用醋酸异戊酯置换两次, 每次 20min, 临界点干燥后用扫描电子显微镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 果汁用量对 BC 产量的影响结果

由图 1 可知, 随着发酵培养基中苹果汁和梨汁含量的增加, BC 产量呈增加趋势。梨汁培养的 BC 产量高于苹果汁。纯苹果汁和梨汁作为发酵培养基时的 BC 产量最高, 分别为 23.937g/100mL 和 32.337g/100mL。

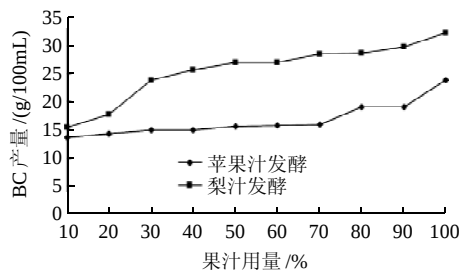


图1 果汁用量对BC产量的影响
Fig.1 Influence of fruit juice dilution on BC yield

2.2 酵母膏添加量对BC产量的影响结果

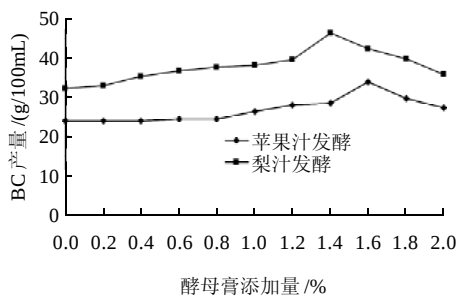


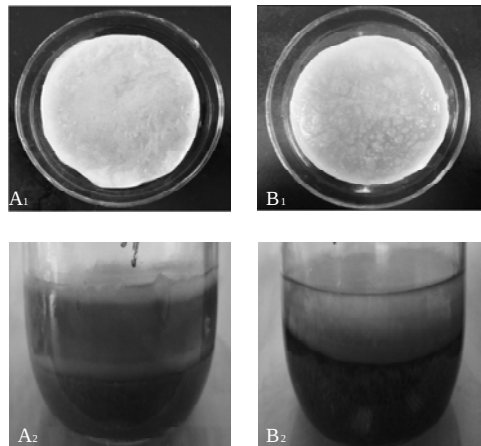
图2 酵母膏添加量对BC产量的影响
Fig.2 Influence of amount of added yeast extract on BC yield

由图2可知,酵母膏的添加对果汁发酵生产BC有影响。苹果汁中酵母膏加量为1.6%时,BC产量达到最高,为33.818g/100mL,是不添加量酵母膏时的1.41倍。而梨汁中酵母膏加量为1.4%时,BC的产量达到最高,为46.343g/100mL,是不添加量酵母膏时的1.43倍。

2.3 BC膜的比较

2.3.1 BC湿膜的平面表观形态

图3为静置培养8d后的BC膜平面表观形态以及立体表观形态。由图3A₁、3B₁可知,梨汁发酵生产的BC颜色较浅,而苹果汁发酵生产的BC颜色较深;梨汁发酵生产的BC结实而有弹性,而苹果汁发酵生产的BC比梨汁的稍硬一些,弹性稍差。可以看出,梨汁发酵生产的BC膜(图3A₂)明显比苹果汁发酵生产的BC膜(图3B₂)厚实。



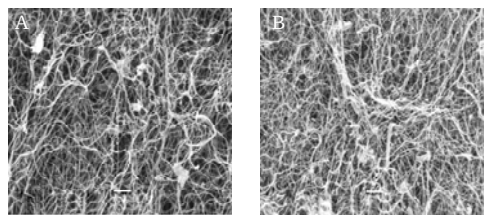
A.梨汁; B.苹果汁; 下脚标1、2分别为平面表观形态和立体表观形态。

图3 BC湿膜的平面表观形态和立体表观形态
Fig.3 Plan and isometric views of wet BC membrane

2.3.2 BC产量、主要成分及性质对比

以苹果汁和梨汁作为发酵培养基,生产的BC湿膜产量、干膜产量、湿膜持水量、干膜复水率及干膜中纤维素含量、蛋白质含量、脂肪含量及总糖含量的测定结果见表1。梨汁作为发酵培养基生产的BC湿膜产量、干膜产量及干膜复水率明显高于苹果汁;梨汁作为发酵培养基生产的BC干膜的总糖的含量稍高于苹果汁;梨汁生产的BC的湿膜持水量、干膜的纤维素含量、蛋白质含量、脂肪含量与苹果汁生产的BC无明显差异。

2.3.3 BC的微观结构



A.梨汁; B.苹果汁。

图4 BC的电镜照片(×10000)
Fig.4 SEM images of BC(×10000)

由图4可见,梨汁和苹果汁生产的BC纤维丝直径

表1 不同发酵培养基生产BC的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Table 1 Comparative physiochemical properties of BC prepared from apple and pear juice ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

培养基	湿膜产量/ (g/100mL)	干膜产量/ (g/100mL)	湿膜持水量/%	干膜复水率/%	干膜成分含量/%			
					纤维素	蛋白质	脂肪	总糖
苹果汁	33.82 ± 1.34 ^A	2.37 ± 0.35 ^A	93.00 ± 0.78 ^a	58.64 ± 1.97 ^A	84.95 ± 0.51 ^a	7.98 ± 0.79 ^a	1.68 ± 0.28 ^a	3.77 ± 0.24 ^a
梨汁	46.34 ± 2.81 ^B	3.41 ± 0.38 ^B	92.64 ± 0.48 ^a	67.98 ± 1.35 ^B	85.34 ± 0.33 ^a	7.83 ± 0.61 ^a	1.61 ± 0.32 ^a	4.20 ± 0.14 ^b

注:同列大写字母不同表示极显著差异($P < 0.01$);同列小写字母不同表示显著差异($P < 0.05$)。

非常细, 两者的微观结构无明显差异, 而且其超微纤维相互缠绕, 组成了一定的超微纤维网, 这种结构就决定了BC具有一些非凡的特性, 比如很强的亲水性和良好的透水性能, 为其实际应用提供了理论依据。

3 结 论

在苹果汁中添加1.6%的酵母膏, 梨汁中添加1.4%的酵母膏, 培养8d, BC产量分别高达33.818g/100mL和46.343g/100mL; 梨汁作为发酵培养基生产的BC干膜在产量、复水率和含糖量方面都优于苹果汁, 而在湿膜持水量及干膜的纤维素含量、蛋白质含量、脂肪含量则无显著差异。梨汁和苹果汁培养出来的纤维素膜结实而有弹性, 且具有良好的亲水性、持水性, 可以作为食用材料生产富含膳食纤维的食品添加物或填充物等, 可为新型食品的开发提供具有特殊功能的原材料。

参考文献:

- [1] KATO N, SATO T, KATO C. Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter xylinus* cells under high-hydrostatic pressure [J]. *Extremophiles*, 2007, 11(5): 693-698.
- [2] WU Ruiqin, LI Zhixi, YANG Jiaping, et al. Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconoacetobacter xylinus* strain[J]. *Cellulose*, 2010, 17(2): 399-405.
- [3] 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.
- [4] JONAS R, FARAHL F. Production and application of microbial cellulose [J]. *Polmer Degradation and Stability*, 1998, 59(1): 101-106.
- [5] 沈金朋, 罗庆平, 段晓惠, 等. 利用酒糟浸出液制备细菌纤维素[J]. *食品科学*, 2010, 31(3): 203-206.
- [6] OKIYAMA A, MOTOKI M, YAMANAKA S. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food material[J]. *Food Hydrocolloids*, 1993, 6(5): 503-511.
- [7] SHEU F S, WNG C L, SHYU Y T. Fermentation of *Monascus purpureus* on bacterial cellulose-nata and the color stability of *Monascus-nata* complex[J]. *Food Microbiology and Safety*, 2000, 65(2): 342-345.
- [8] 马霞, 王瑞明, 贾士儒, 等. 细菌纤维素在食品工业中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2002, 23(5): 11-12.
- [9] 张永凤, 卢红梅, 何绪晓, 等. 细菌纤维素及其应用[J]. *食品科技*, 2007 (1): 29-32.
- [10] 陆胜民, 贾静静, 杨颖. 细菌纤维素发酵工艺与应用研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2011, 47(1): 27-31.
- [11] WANG Quanwei, LIU Sixin, GAO Shilong, et al. Advance on bacterial cellulose in production and application[J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 1(18): 152-154.
- [12] 邵伟, 李爱华. 猕猴桃纳塔的研制[J]. *农牧产品开发*, 2000(2): 9-10.
- [13] KUROSUMI A, SASAKI C, YAMADHITA Y, et al. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(2): 333-335.
- [14] 毋锐琴, 李志西, 邵东燕, 等. 高产细菌纤维素菌株的分离及初步鉴定[J]. *中国酿造*, 2008(10): 37-38.
- [15] WU Ruiqin, DU Shuangkui, LI Zhixi, et al. Optimization of bacterial cellulose fermentation medium and observation of bacterial cellulose ultra-micro-structure[J]. *Chin J Biotech*, 2008, 24(6): 1068-1074.
- [16] 毋锐琴. 高产细菌纤维素菌株的筛选及发酵工艺优化[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2008.
- [17] 曹海鹏, 袁帅, 赵昆, 等. 细菌纤维素高产菌株的筛选及鉴定[J]. *食品科学*, 2010, 31(5): 211-214.
- [18] 李静, 朱平. 利用西瓜汁合成细菌纤维素的研究[J]. *生物技术通报*, 2008(2): 158-162.