Sept. 2018

生物工程

G31 产细菌纤维素结构表征及其面膜性能测试

唐静1,惠明1*,廖爱美1,田青1,黄继红1,2

(1. 河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001; 2. 郑州中食农产品加工研究院,河南 郑州 450001)

摘要: 以葡糖醋杆菌 G31 为菌种,用 HS 培养基发酵制备细菌纤维素(BC),产物湿重产率为 320.1 g/L。利用 蒽酮比色法、酶水解法初步证明发酵产物为纤维素,采用 FTIR、SEM、XRD、CP/MAS 13 CNMR、DSC 和 TG 对其结构进行了表征并测试了其性能。结果表明:发酵产物具有超细三维网状结构,属于结晶度为 92.42%的纤维素 I 型,具有良好的持水性和拉伸性。分子质量测定结果显示: M_w =5737,属于低相对分子质量 BC,其氧气透过率和水蒸气透过率分别为 913.55±3.23 cm³/(m²-d·0.1 MPa)和 656.15±3.92 g/(m²-d),表明该 BC 具有更好的锁水能力,为其在面膜领域的应用奠定了基础。

关键词:细菌纤维素;发酵;保湿;面膜应用;生物工程

中图分类号: TQ352.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)09-1524-05

Structure Characterization and Performance Test of Bacterial Cellulose Produced by Gluconacetobacter Xylinum G31

TANG Jing¹, HUI Ming^{1*}, LIAO Ai-mei¹, TIAN Qing¹, HUANG Ji-hong^{1,2}

(1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, Henan, China; 2. Zhengzhou Zhongshi Research Institute of Agriculture Products Processing, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: Bacterial cellulose (BC) with a wet weight of 320.1 g/L was fermented by Gluconacetobacter xylinum G31 strain in Hestrin-Schramm (HS) medium. Anthrone colorimetry and enzymatic hydrolysis was used to characterize the fermentation product and the results proved that the product was cellulose. The structure and performances of fermentation product were characterized by FTIR, SEM, XRD, CP/MAS 13 CNMR, DSC and TG techniques. The results showed that the fermentation product had an ultrafine three-dimensional network structure and belonged to cellulose type I with a crystallinity of 92.42%. Moreover, it exhibited good water-holding ability and stretchability. Its molecular weight was measured (M_w =5737), which belonged to low molecular weight BC. The oxygen transmission rate and water vapor transmission rate of BC facial mask were 913.55±3.23 cm³/(m²·d·0.1 MPa) and 656.15±3.92 g/(m²·d), respectively, indicating that BC facial mask had better water-holding capacity, which laid a foundation for its application in the field of facial mask.

Key words: bacterial cellulose; ferment; water-holding; facial mask application; biological engineering **Foundation items:** Henan University of Technology "Excellent Doctoral, Master Degree Thesis Cultivation" Project (2017); Open Project of Henan Provincial Key Laboratory of Transformation and Utilization of Cereals (PL2016006)

细菌纤维素(Bacterial cellulose, 简称 BC)是由醋杆菌属、沙门氏菌属等微生物产生的胞外产物,其结构可视为由吡喃葡萄糖单体以β-1,4-糖苷键连

接而成的直链多糖^[1]。与植物纤维素相比,细菌纤维素具有纳米级的超精细网状结构,较高的化学纯度、结晶度,以及良好的持水保湿能力和生物相容

性^[2-4]。近年来,通过对 BC 进行结构表征及性能测试为生物医学、食品、造纸、电力、磁力和光学^[5-7] 领域提供了理论基础,使其得到广泛的应用和关注。

面膜作为一种常见护肤品,其主要功能是清洁皮肤并将营养物质输送至皮肤深层,进而增进皮肤机能。作为面膜基质不仅要具有优异的保湿性能,还要具有舒适的贴合度,较好的生物相容性及生物可降解性,BC 优异的性质使其可以作为一种比较理想的面膜基质^[8]。目前,有关 BC 在化妆品领域的应用研究主要集中在面部磨砂膏、乳化剂等方面。王蕾^[8]等以透明质酸为辅料得到了锁水力更强的透明质酸-细菌纤维素复合生物面膜,但单独以 BC 为面膜的性能测试等鲜见报道,因此,本文以经过常压室温等离子体 ARTP 诱变的葡糖醋杆菌 G31 为菌种,以 HS 培养基静态发酵制备 BC,并对 BC 结构进行表征,性能进行初步测试,为细菌纤维素在化妆品的面膜领域的应用奠定了理论基础。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

葡糖醋杆菌 G31 (Gluconacetobacter xylinum G31), 本实验室经 ARTP 诱变得到的 BC 高产菌株。

葡萄糖、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ · $7H_2O$,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;酵母膏、蛋白胨,生化试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;柠檬酸、浓硫酸,分析纯,洛阳市化学试剂厂;无水乙醇,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;蒽酮试剂,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;Cellulase,生化试剂,北京索莱宝科技有限公司。

IR-200 型傅里叶红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司; Quanta250FEG 型扫描电子显微镜,美国 FEI 公司; MiniFlex 600 型 X 射线衍射仪,北京嘉德利达科技有限公司; 400MHz 核磁共振谱仪,布鲁克仪器有限公司; DSC200F3 型 TG/DSC 同步热分析仪,德国耐驰仪器制造有限公司;安捷伦1200Waters 凝胶渗透色谱仪,美国安捷伦科技公司;微机控制万能电子试样机(CMT4504)、TSY-T1 型透湿性测试仪、VAC-V1 型透气性测试仪,均为济南兰光机电技术公司生产。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏提取物 5.0, K_2HPO_4 1.0, 柠檬酸 0.5, 蒸馏水 1 L, pH=4.0, 高温高压灭菌 20 min。

发酵培养基 (HS 培养基, g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏提取物 5.0, 蛋白胨 5.0, K_2HPO_4 2.7, 柠檬酸 1.15, 蒸馏水 1 L, pH=4.5, 高温高压灭菌 20 min。

1.2 BC 面膜的制备

将葡糖醋杆菌 G31 接种到种子培养基, 30 ℃、

100 r/min 培养 24 h。以体积分数 5%的接种量将种子液分别添加至装有发酵培养基的面膜模具中,30 ℃静置培养 7 d,得到 BC 面膜。取出 BC 面膜置于 0.1 mol/L NaOH 溶液中 90 ℃水浴 1 h 以除去残留的菌体,最后用蒸馏水反复洗涤至中性,吸干表面的水分后称重,计算细菌纤维素产率(g/L),之后冷冻干燥用于表征测试。下文中称 BC 面膜为 BC 薄膜。

1.3 鉴定

(1) 蔥酮比色法:准确称取干燥薄膜 0.2 g,加入 100 mL 质量分数 60% $H_2SO_4溶液,于冰浴中消化 <math>2 h$ 。在试管中加入 2 mL 消化液和 5 mL 蔥酮试剂,若显色结果为蓝绿色或墨绿色,则该产物为纤维素。

(2)酶水解法:用磷酸缓冲液配制纤维素酶液。 准确称取干燥薄膜 m_0 ,放置纤维素酶液中,50 °C保 温水解。24 h 后,将纤维素酶液用烘干至恒重的滤 纸过滤,然后烘干至恒重,质量为 m_1 ;同样将磷酸 缓冲液用同等质量的滤纸过滤烘干称重,质量为 m_2 。按下式计算出纤维素纯度(W):

 $W/\% = [m_0 - (m_1 - m_2)]/m_0 \times 100$

1.4 结构表征

傅里叶红外光谱(FTIR): 用溴化钾压片法测定标准纤维素与干燥薄膜,波数范围: 4000~400 cm⁻¹。

扫描电子显微镜(SEM): 将薄膜用液氮处理后冷冻干燥, 喷金。

X 射线衍射(XRD)谱图: 2θ = 10° ~ 40° , 步宽为 0.02°, 收集时间为 0.01 s。用下式计算结晶度:

结晶度/%=衍射强度/总强度×100

固体核磁共振碳谱 (CP/MAS ¹³CNMR): 魔角 旋转 8000 kHz, 扫描次数 800 次, 4 mm 核磁管。

差示扫描量热法(DSC)/热重分析(TG):用 TG/DSC 同步热分析仪测定各种热性能参数,以 N_2 作为气氛,温度范围为 $20\sim600$ $^{\circ}$ 、升温速率为 10 $^{\circ}$ C/min。

1.5 薄膜性能测试

凝胶色谱法(GPC): 称取 0.1 g 薄膜, 加入 20 mL 蒸馏水和若干玻璃珠, 摇动 24 h 后过滤, 然后加入 10 mL LiCl/DMF 溶剂 (氯化锂/二甲基甲酰胺溶剂) 和若干玻璃珠, 摇动 24 h 后过滤。用 Waters 凝胶色谱仪上样测定。

物理机械性能-拉伸实验:将厚度为5 mm 的薄膜剪成 20 mm×10 mm 的样条,用微机控制万能电子试样机进行拉伸测试,拉伸速率为5 mm/min,参考 GB13022—1991 进行检测,计算拉伸强度和断裂伸长率。

持水性能:取处理好的薄膜,用吸水纸吸干表面水分,准确称取其质量 m,然后将薄膜放到烘干

至恒重的平皿中,冷冻干燥后称其质量为 m_1' ,含水率计算如下:

薄膜的含水率/%=(1-m1/m)×100

水蒸气透过率(Water Vapor Transmission rate, WVTR): 参考 GB1037—1988 进行检测^[9]。

氧气透过率(Oxygen Transmission rate, OTR): 用氧气透过性测试仪,参考 GB/T1038-2000 进行 检测 $[^{10}]_{\circ}$

2 结果与讨论

2.1 成分鉴定

BC 面膜成品的照片如图 1 所示。



图 1 BC 面膜 Fig. 1 BC facial mask

由图 1 可见,用硫酸消化后的薄膜与蒽酮试剂 反应显蓝绿色,且能够在纤维素酶液中溶解,初步证明薄膜是细菌纤维素,并计算出产物产率为 320.1 g/L,薄膜纯度(W)为 95.19%±1.28%。

2.2 结构表征

2.2.1 FTIR 分析

薄膜(BC)与标准纤维素(BZ)的FTIR 谱图如图 2 所示。

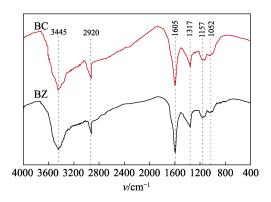


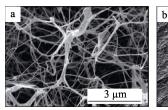
图 2 薄膜和标准纤维素的 FTIR 谱图 Fig. 2 FTIR spectra of BC facial mask and standard cellulose

如图 2 所示, FTIR 谱图中可以看出二者的红外特征峰几乎一致。3445 cm⁻¹ 附近出现宽而强的吸收峰,是由分子间氢键引起的—OH 伸缩振动峰,说

明分子中含有大量的氢键且缔合度较高,氢键较强, 2920 cm⁻¹ 附近出现中强度的吸收峰由 C—H 伸缩振动产生[^{11]}; 1605 cm⁻¹ 附近的强吸收峰可能由葡萄糖分子顶端的半缩醛基弯曲振动产生; 1317 cm⁻¹ 附近的吸收峰由—CH₂ 伸缩振动产生, 1157 cm⁻¹ 附近的吸收峰是由 C—O 键的伸缩振动引起的,可表征纤维素的特征吸收带,1052 cm⁻¹ 附近的吸收峰由 C—O 键的伸缩振动引起的或者因环不对称伸缩引起的^[12]。由此可以得出薄膜中含有—OH、C—H、—CH₂、C—O 等基团,这些基团与纤维素分子结构式中所包含的基团基本吻合。另外,与文献^[13-14]中晶体纤维素 I 型的特征吸收带 1315 cm⁻¹、1157 cm⁻¹ 和1111 cm⁻¹ 相接近。由以上结果可知:该薄膜的主要成分是细菌纤维素且属于晶体纤维素 I 型。

2.2.2 外貌观察

薄膜的 SEM 谱图如图 3 所示。



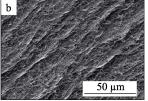


图 3 薄膜 SEM 图 Fig. 3 SEM images of BC facial mask

如图 3 所示,图 3a 是 50000 放大倍率下细菌纤维素的 SEM 图,可以看出细菌纤维素是超细三维网状结构,其中孔径约为 3 μm,直径约为 30~60 nm,纤维束之间紧密排列,相互缠绕,使得属于纳米结构的细菌纤维素具有高单位质量的表面积,因而具有较高的液体负载能力;图 3b 是 3000 放大倍率下细菌纤维素的 SEM 图,可以看出细菌纤维素在整个合成过程中是一层一层生长的,整个纤维排列分布是比较均匀的。

2.2.3 晶型分析

薄膜的 XRD 谱图如图 4 所示。

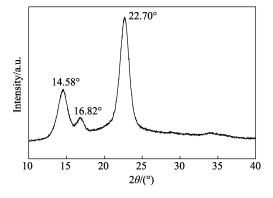


图 4 薄膜 XRD 谱图 Fig. 4 XRD pattern of BC facial mask

如图 4 所示, 谱图中主要有 3 个衍射峰, 分别是 14.58°、16.82°和 22.7°, 对应 (101)、(101)和 (002)晶面 (PDF No.50-0926), 与文献[15]中纤维素 I 型的特征峰位置 14.8°、16.6°和 22.7°相对比, 判断该产物符合纤维素 I 型, 与 FTIR 谱图的结果一致。由软件 JADE6.0 分析数据, 计算得到薄膜的结晶度为 92.42%。因高结晶度使薄膜拉伸强度、弹性模量、密度都随之增加,所以使其具有较高的弹性模量,良好的柔软性能,具有良好的舒适度^[8]。 2.2.4 固体核磁共振碳谱 (CP/MAS ¹³CNMR)

.4 固体核磁头振频谱(CP/MAS **CNMR 薄膜的 ¹³CNMR 谱图如图 5 所示。

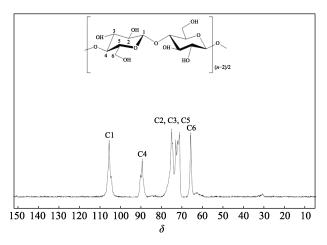


图 5 薄膜 CP/MAS ¹³CNMR 谱图 Fig. 5 CP/MAS ¹³CNMR spectrum of BC facial mask

如图 5 所示,在 δ 60~110 出现了明显的信号峰并根据谱图进行碳位置归属。其主要峰的化学位移与 Rani^[16]等的报道相似。从图谱中反映出 δ 105.49、89.312 和 65.65 的共振区域信号较尖锐清晰,归属于葡萄糖中 C1、C4 和 C6 位置; δ 74.98、72.94 和 71.2 的共振簇因环碳 C2、C3 和 C5 产生,可判断该细菌纤维素属于典型的纤维素 I 型,与文献相一致^[17]。其中,C1 在 δ 104.50 处产生一个强度较低的扩宽峰,是由结晶区域中同质异形体的碳产生的,即 C1 α 和 C1 β ; C4 在 δ 90.08 处产生一个较低的扩宽峰,是由非晶体结构产生的,通过计算 C4 在 δ 90.08 和 89.31 的积分强度比值可计算出 BC 结晶度为 92.42%,与 2.2.3 小节结果一致。

2.2.5 差示扫描量热法(DSC)/热重分析(TG) 薄膜的 DSC 和 TG 谱图如图 6 所示。

如图 6 所示,从 TG 谱图中得出,主要的失重阶段区域为 $34.4\sim118.2$ °C,峰值温度为 98.9 °C,可计算出失重速率为 0.75%/°C,在 118.2 °C时,失重达到 62.83%。由此也可证明 BC 湿膜中含有大量的水分,进一步说明 BC 膜的含水率较高,此后失重比几乎不变。随着温度的增加又经历一个小的失

重阶段为 330.7~373.4 ℃,属于 BC 膜的分解阶段,在如此高的温度下 BC 膜才会分解,表明 BC 膜的热稳定性非常好。BC 湿膜质量的整个失重过程与 BC 的差示扫描热量法相一致。在 DSC 谱图中,出现两个吸热峰和一个放热峰。在 69.4~136.4 ℃出现的吸热峰是由吸附水、结晶水的失去而引起的,所以质量也会大幅度下降;在 356.7~395.9 ℃出现的吸热峰是由纤维素自身分解引起的,与 TG 谱图的失重阶段相对应,在 406.2~544.9 ℃出现的放热峰是属于结晶放热。

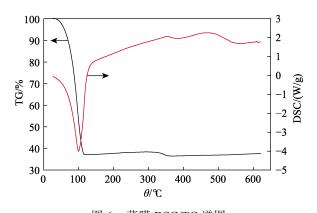


图 6 薄膜 DSC/TG 谱图 Fig. 6 DSC/TG curve of BC facial mask

2.3 薄膜性能测试

薄膜的分子质量分布谱图如图 7 所示。

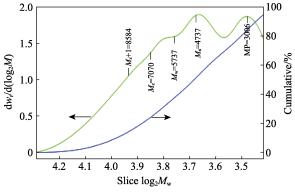


图 7 薄膜相对分子质量分布曲线

Fig. 7 Molecular weight distribution of BC facial mask

如图 7 所示,在相对分子质量分布图中, M_n 为数均平均相对分子质量, M_w 为重均平均相对分子质量(一般用 M_w 来表示聚合物的平均相对分子质量), M_z 为 Z 均平均相对分子质量,PDI 为分散性指数。其中平均相对分子质量为 5737,计算其聚合度约为36,这与文献聚合度相比,该产物的相对分子质量非常小,属于低相对分子质量细菌纤维素, M_w 越小,拉伸能力越强,脆性越小,越不容易断裂。PDI 用于衡量聚合物相对分子质量分布的广度,多分散性

指数越大,相对分子质量分布越广,当 PDI 在 1.10~1.5 之间,说明是逐步合成的聚合物,与扫描结果(图 3b)相吻合。低相对分子质量的细菌纤维素有更好的生物相容性及生物可降解性,同时其负载量更高,释放速度更快,使其在化妆品、药物输送及生物组织工程方面表现出巨大的应用潜力^[18]。

2.3.2 其他性能测试结果

通过拉伸实验得知,BC 面膜的拉伸强度为 1.27 MPa, 断裂伸长率为 16.29%,说明 BC 面膜具有较高的结晶度,与 X 射线衍射、CP/MAS ¹³CNMR 结果相一致。因为结晶程度越高,结构更加完整,也就具有更大的拉伸强度和较低的断裂伸长率^[8],所以在稍大的外力作用下不易发生变形,结构也不宜发生明显变化。以 BC 作为面膜基质,不仅能够与脸部紧密结合,而且三维网络孔洞中所持有的营养精华液不易侧流,从而增加使用者的体验度。BC 面膜含水率高达 99%,因为水分不仅储存在 BC 湿膜的三维网状孔洞中,还可以通过氢键作用与 BC 湿膜上的大量羟基结合,使其固定更多的水分,所以具有很好的持水能力。

气体或蒸汽在聚合物中的传输速率主要取决于结晶度,结晶度越高,渗透性越低,因为与无定形区域相比,结晶区域是相对不可渗透的[12]。化学合成聚合物通常具有较低的 WVTR[18~20 g/(m² ·d)]和 OTR [8000~14000 cm³/(m² ·d·0.1MPa)],实验中测出 WVTR和 OTR分别为 656.15±3.92g/(m² ·d)和 913.55±3.23 cm³/(m² ·d·0.1 MPa),其结果与上述描述相反。结果中低 OTR 值表明,该薄膜具有低渗透性高结晶度;OTR 值大于 WVTR值,说明该薄膜能够有效地锁住水分,防止水分的蒸发,同时能够保证肌肤表皮细胞正常呼吸,有利于排除新陈代谢产物,使营养成分更有效地进入皮肤。

3 结论

以常压室温等离子体(ARTP)诱变的葡糖醋杆菌 G31(Gluconacetobacter xylinum G31)为菌种经静态发酵制备 BC 面膜,产物呈空隙小于 3 μm 的超细三维网状结构,属纤维素 I型,结晶度为 92.42%,具有良好的拉伸性能。同时测试结果表明,该 BC 面膜的平均相对分子质量为 5737,属于低分子质量 BC,低 OTR 值,高 WVTR 值,使其具有较高的负载量,在化妆品、药物输送及生物组织工程方面表现出巨大的应用潜力,并为细菌纤维素在面膜领域的应用奠定了基础。

参考文献:

- Jang W D, Hwang J H, Kim H U, et al. Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(5), 1181-1185.
- [2] Fu L, Zhang J, Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair[J]. Carbohydrate polymers, 2013, 92(2): 1432-1442.
- [3] Paximada P, Tsouko E, Kopsahelis N, et al. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 225-232.
- [4] Arevalo G A M, Herrera C S, Parra R, et al. Bacterial cellulose: A sustainable source to develop value-added products-a review[J]. Bioresources 2016, 11(2): 5641-5655.
- [5] Alves V D, Torres C A V, Freitas F. Bacterial polymers as materials for the development of micro/nanoparticles[J]. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials,2016, 65 (5): 211-224.
- [6] Zhang Mingnan (张名楠), Li Haifang (刘海芳), HanYali (韩亚丽), et al. Synthesis and characterization of bacterial cellulose membrane[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2014, 31(4): 409-417.
- [7] Zhang W, Chen S, Hu W, et al. Facile fabrication of flexible magnetic nanohybrid membrane with amphiphobic surface based on bacterial cellulose[J]. Carbohyd Polym, 2011, 86(4): 1760-1767.
- [8] Wang Lei (王蕾), Wu Xujun (吴旭君), Chen Shiyan (陈仕艳), et al. Preparation of hyaluronic acid-bacterial cellulose biological maskbyin situ modification[J]. MaterialsReview (材料导报), 2015, 29(12): 43-47
- [9] Ministry of chemical industry (化学工业部). Test method for water vapor permeability of plastic films and sheets (Cup method) (塑料薄 膜和片材透水蒸气性试验方法(杯式法)): GB/T1037—1989[S]. Beijing:Standards Press of China, 1989: 2-3.
- [10] The Quality and Technology Supervision Bureau (国家质量技术监督局). Plastic film and sheet gas permeability test method differential pressure method (塑料薄膜和薄片气体透过性试验方法-压差法): GB/T 1038—2000[S].Beijing:Standards Press of China,
- [11] Lopes T D, Riegel-Vidotti I C, Grein A, et al. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: production and characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 401-408
- [12] Rani M U, Udayasankar K, Appaiah K A. Properties of bacterial cellulose produced in grape medium by native isolate Gluconacetobacter sp[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2011, 120(5): 2835-2841.
- [13] Pacheco G, De C M, Chiariandréo B G, et al. Bacterial cellulose skin masks-Properties and sensory tests[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2017; 1-8, DOI: 10.1111/jocd.12441.
- [14] Colom X, Carrillo F, Nogués F, et al. Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy[J]. Polymer Degradation and Stability, 2003, 80(3): 543-549.
- [15] ChenJiaxiang (陈嘉翔). PulpingChemistry (制浆化学)[M]. Beijing: Light Industry Press,1990: 21.
- [16] Ridout M J, Brownsey G J, Gunning A P, et al. Characterization of the polysaccharide produced by Acetobacter xylinum strain CR1 /4 by light scattering and atomic force microscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1998, 23(4): 287-293.
- [17] Yan Zhiyong (颜志勇), WangHuaping (王华平), ChenShiyan (陈仕艳), *et al.* Crystal structureof bacterial cellulose[J]. Materials Review (材料导报), 2008, (8): 127-130,135.
- [18] Dou xiaoqiu (窦晓秋), Zhang Di (张荻), Feng Chuanliang (冯传良).

 Researchand progress of low molecular weight gelators[J]. Science
 Technology and Engineering (科学技术与工程), 2011, 11(2):
 286-295.