



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102337320 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 01

(21) 申请号 201110296690. 6

(22) 申请日 2011. 09. 30

(71) 申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市花溪区贵州大学
(北区) 科技处

(72) 发明人 卢红梅 彭湘屏 戴锐 黄永涛
李大鹏 王俊 张丽平

(74) 专利代理机构 贵阳东圣专利商标事务有限
公司 52002

代理人 徐逸心 袁庆云

(51) Int. Cl.

C12P 39/00 (2006. 01)

C12P 19/04 (2006. 01)

C12R 1/02 (2006. 01)

C12R 1/865 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种新的生产细菌纤维素的方法

(57) 摘要

一种新的生产细菌纤维素的方法, 采用淋浇发酵法, 以生产食醋的淋浇发酵塔为生产设备, 塔底盛接种有三菌种—木醋杆菌、醋酸菌和安琪酵母菌的培养基发酵液, 培养基为陈米糖化液及酒精发酵醪的混合液, 塔中部填料层, 填玉米芯和谷壳, 谷壳于玉米芯底部和上部平铺, 作菌体附着载体, 用泵将塔底三菌种培养基发酵液提升到塔顶, 喷淋于填料层, 通过填料层又回到塔底, 如此循环淋浇, 淋浇发酵温度 28-32℃, 淋浇频率 1 次 /4h, 每次淋浇时间 1min, 12h 为一个控制周期, 发酵时间总长 144h, 停止淋浇发酵后, 将玉米芯上的细菌纤维素膜撕下, 经洗涤, 烘干而得。

1. 一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是采用淋浇发酵法,以生产食醋的淋浇发酵塔为生产设备,塔底盛接种有三菌种—木醋杆菌、醋酸菌和安琪酵母菌种子液的培养基发酵液,培养基为陈米糖化液及酒精发酵醪的混合液,陈米糖化液的总糖含量在 160-180g/L 之间,酒精发酵醪乙醇含量在 7-9%v/v, 陈米糖化液与酒精发酵醪混合体积比为 3 :5,塔中部为填料层,填玉米芯和谷壳,作菌体附着载体,用泵将塔底三菌种培养基发酵液提升到塔顶,喷淋于填料层,通过填料层又回到塔底,如此循环淋浇,淋浇发酵温度 28-32℃,淋浇频率 1 次 /4h,每次淋浇时间 1min,12h 为一个控制周期,发酵时间总长 144h,停止淋浇发酵后,将玉米芯上的细菌纤维素膜撕下,经洗涤,烘干而得产品。

2. 根据权利要求 1 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是填料层玉米芯与谷壳的重量比 7.5 :5,玉米芯夹在谷壳中间,填料层厚度为淋浇塔容积高度的 1/4-1/3,装塔前玉米芯和谷壳经润湿和 121℃、1 小时灭菌处理备用。

3. 根据权利要求 1 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是培养基中陈米糖化液是指陈米经糊化、液化、糖化和过滤,然后 1 :1 用水稀释而得到的总糖含量为 160-180g/L 的糖化液 ;酒精发酵醪是将陈米糖化液经酵母发酵后过滤,用水调整得到的乙醇含量为 7-9%v/v 的酒精发酵醪 ;

本发明所用陈米糖化液和酒精发酵醪各主要成分含量如下 :陈米糖化液 :总糖含量 160-180g/L、总酸含量 0.2-0.3g/kg ;酒精发酵醪 :总糖含量 0.7-0.9g/L、总酸含量 3.2-3.5g/kg、乙醇含量 7-9%v/v。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是所述的种子液是将试管斜面醋酸菌和木醋杆菌接入一环于各自的试管基础培养基中,30℃ 培养 20 小时以作为醋酸菌和木醋杆菌的种子液,安琪酵母菌种子液是取培养基发酵液重千分之一的安琪酿酒高活性干酵母,用 10 倍酵母用量的 35-40 摄氏度的 2% 的糖水活化 15-20 分钟,然后温度降至 30-34 摄氏度,活化 2 小时即得安琪酵母种子液。

5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是培养基发酵液是将陈米糖化液和酒精发酵醪按体积比 3 :5 混合,混合液中接种三菌种种子液,接种顺序和接种量分别为 :接种木醋杆菌种子液 8.2%v/v,6h 后接种醋酸菌种子液 8.2%v/v 和安琪酵母菌种子液 2.1%v/v,得培养基发酵液,静置 2 小时开始由泵提升淋浇,每隔 4 小时淋浇一次,每次淋浇时间 1min,从接种木醋杆菌种子液开始算时间,12 小时为一周期,第一周期不限氧,第二周期开始,每周期限氧 4 小时,限氧期间不淋浇,发酵时间总长 144h。

6. 根据权利要求 5 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是本发明陈米糖化液总糖含量为 171.28g/L ;酒精发酵醪乙醇含量为 8.24%v/v,陈米糖化液与酒精发酵醪体积比 3 :5 混合,混合液中接种三菌种—木醋杆菌 8.2% (v/v),6h 后接种醋酸菌 8.2% (v/v) 和酵母菌 2.1% (v/v),静置 2h 后开始淋浇,每隔 4 小时淋浇一次,淋浇时间 1min,从接种木醋杆菌开始算时间,12 小时为一周期,第一周期不限氧,第二周期开始,每周期限氧 4 小时,限氧期间不淋浇,发酵时间总长 144h,可获得较高的细菌纤维素产量。

7. 根据权利要求 1 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是填料层的材料可以用疏松透气的材料包括刨木花、玉米壳、椰子壳及食品包装用塑料及泡沫材料代替。

8. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种新的生产细菌纤维素的方法,其特征是用塔底盛接种有两菌种—木醋杆菌和醋酸菌种子液的培养基发酵液代替接种有三菌种—木醋杆

菌、醋酸菌和安琪酵母菌种子液的培养基发酵液。

一种新的生产细菌纤维素的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及发酵工程领域,具体地说,是一种新的生产细菌纤维素的方法。

背景技术

[0002] 细菌纤维素(Bacterial cellulose, BC)又被称为微生物纤维素,是由含糖基质中的某些微生物在生长过程中产生并分泌到基质中的一种细长的束状纤维。

[0003] 细菌纤维素具有良好的持水性和凝胶特性,可作为增稠剂、固体食品成型剂、分散剂和结合剂等应用于食品工业中;它还具有很好的生物相容性、透气性和良好的理化性能,可作为一种具有独特优势的新型医学生物材料;细菌纤维素膜的纯度、结晶度、聚合度及分子取向非常高,具有优良的力学性能,这使其可在造纸、声学器材以及建材领域得以应用;此外,细菌纤维素还可以应用于酶工程、环境保护、纳米复合材料、燃料电池及木质文物修复等许多领域,具备广泛的应用价值。近年来,国外如日本、美国已经开始细菌纤维素规模化生产并开发其商业化应用,但国内利用微生物合成细菌纤维素的技术还不是十分成熟,仍停留在浅盘式静态发酵上。

[0004] 浅盘静态发酵法是生产细菌纤维素最简单、传统的方法,也是目前细菌纤维素生产最常用的方法。该生产方法下,氧气分布不均且传递效果不佳,细菌纤维素只能在气液表面生成,其最终产量的高低取决于培养基表面积的大小。当培养基表面积一定时,培养基体积增加,其深度亦随之增加,培养基中溶解氧浓度减小,菌体由于供氧不足而生长受到抑制,进而限制了纤维素的产量;培养基太少,由于营养物质有限而限制了菌体的生长和繁殖。据估计,要达到一天生产一吨干重的细菌纤维素,需要 2000 平方英尺的气液表面积。因此,传统静态发酵法的占地面积大,生产周期长,劳动强度高,生产效率低,且容易污染杂菌,不适合工业化的生产。

[0005] 与浅盘静态发酵法相对应的是传统动态发酵法,传统动态发酵包括摇瓶振荡发酵,机械搅拌发酵等,动态发酵法有效解决了浅盘静态发酵法供养不足问题,但在提高氧的传递效率的同时也加大了对菌体的剪切力,即在振荡,搅拌过程中外力对菌种的撞击,特别是对某些对剪切力敏感的菌种如木醋杆菌影响很大。

[0006] 因此,传统动态发酵法不适合细菌纤维素的主要生产菌种——木醋杆菌低剪切力的生理要求,不能用于细菌纤维素的规模生产。

[0007]

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种新的生产细菌纤维素的方法,解决浅盘静态发酵法菌体由于供氧不足而生长受到抑制问题,解决传统动态发酵在提高氧的传递效率的同时加大了对菌体剪切力,对某些剪切力敏感菌种由于低剪切力的生理要求,不能用于细菌纤维素规模生产的问题。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的,本发明一种新的生产细菌纤维素的方法

法,采用淋浇发酵法,以生产食醋的淋浇发酵塔为生产设备,塔底盛接种有三菌种—木醋杆菌、醋酸菌和安琪酵母菌种子液的培养基发酵液,培养基为陈米糖化液及酒精发酵醪的混合液,陈米糖化液的总糖含量在 160-180g/L 之间,酒精发酵醪乙醇含量在 7-9%v/v, 陈米糖化液与酒精发酵醪混合体积比为 3 :5,塔中部为填料层,填玉米芯和谷壳,作菌体附着载体,用泵将塔底三菌种培养基发酵液提升到塔顶,喷淋于填料层,通过填料层又回到塔底,如此循环淋浇,淋浇发酵温度 28-32℃,淋浇频率 1 次 /4h,每次淋浇时间 1min,12h 为一个控制周期,发酵时间总长 144h,停止淋浇发酵后,将玉米芯上的细菌纤维素膜撕下,经洗涤,烘干而得产品。

[0010] 填料层玉米芯与谷壳的重量比 7.5 :5,玉米芯夹在谷壳中间,填料层厚度为淋浇塔容积高度的 1/4-1/3,装塔前玉米芯和谷壳经润湿和 121℃、1 小时灭菌处理备用。

[0011] 培养基中陈米糖化液是指陈米经糊化、液化、糖化和过滤,然后 1 :1 用水稀释而得到的总糖含量为 160-180g/L 的糖化液 ;酒精发酵醪是将陈米糖化液经酵母发酵后过滤,用水调整得到的乙醇含量为 7-9%v/v 的酒精发酵醪,本发明所用的陈米糖化液和酒精发酵醪由贵阳市味苑园食品股份有限公司提供。本发明所用陈米糖化液和酒精发酵醪各主要成分含量如下 :陈米糖化液 :总糖含量 160-180g/L、总酸含量 0.2-0.3g/kg ;酒精发酵醪 :总糖含量 0.7-0.9g/L、总酸含量 3.2-3.5g/kg、乙醇含量 7-9%v/v。

[0012] 所述的种子液是将试管斜面醋酸菌和木醋杆菌接入一环于各自的试管基础培养基中,30℃培养 20 小时以作为醋酸菌和木醋杆菌的种子液,安琪酵母菌种子液是取培养基发酵液重千分之一的安琪酿酒高活性干酵母,用 10 倍酵母用量的 35-40 摄氏度的 2% 的糖水活化 15-20 分钟,然后温度降至 30-34 摄氏度,活化 2 小时即得安琪酵母种子液。

[0013] 所述培养基发酵液是将陈米糖化液和酒精发酵醪按体积比 3 :5 混合,混合液中接种三菌种种子液,接种的顺序及量分别为 :接种木醋杆菌种子液 8.2%v/v,6h 后接种醋酸菌种子液 8.2%v/v 和安琪酵母菌种子液 2.1%v/v,得培养基发酵液,静置 2 小时开始由泵提升淋浇,每隔 4 小时淋浇一次,每次淋浇时间 1min,从接种木醋杆菌种子液开始算时间,12 小时为一周期,第一周期不限氧,第二周期开始,每周期限氧 4 小时,限氧期间不淋浇,发酵时间总长 144h,所谓限氧是封闭淋浇塔的通气孔 4。

[0014] 填料层的材料可以用疏松透气的材料包括刨木花、玉米壳、椰子壳及食品包装用塑料及泡沫材料代替。

[0015] 试验证明,用塔底盛接种有两菌种—木醋杆菌和醋酸菌种子液的培养基发酵液代替接种有三菌种—木醋杆菌、醋酸菌和安琪酵母菌种子液的培养基发酵液是可行的,但细菌纤维素的产量低于三菌种发酵。

[0016] 用泵将塔底的培养基发酵液提升至塔顶后喷淋于填料层,如此循环淋浇,一方面为吸附于填料之上的菌种提供充足的营养,另一方面在降低剪切力的同时提高发酵液中溶氧含量,促进木醋杆菌的生长及细菌纤维素的产生。将醋酸菌、酵母菌和木醋杆菌进行混合培养,为木醋杆菌提供乙醇、乙酸等增效因子,促进细菌纤维素的合成,从而提高细菌纤维素的产量。

[0017] 发明人根据生产菌种的最适生长、产纤维素温度以及实际生产条件确定淋浇发酵法生产细菌纤维素的发酵温度控制在 28-32℃。

[0018] 填充层填充方式为玉米芯自然堆放,而谷壳于玉米芯底部和上部分两层平铺 ;发

明人还以发酵液中溶氧浓度作为指标,根据淋浇发酵过程中发酵液菌体浓度、总糖、总酸含量等理化指标得出淋浇发酵法生产细菌纤维素的发酵周期为 144h(6 天)。

[0019] 本发明最佳培养基发酵液总糖含量为 172.28g/L;酒精发酵醪乙醇含量为 8.24%v/v,陈米糖化液与酒精发酵醪体积比 3:5 混合,混合液中接种三菌种—木醋杆菌 8.2% (v/v),6h 后接种醋酸菌 8.2% (v/v)和酵母菌 2.1% (v/v),静置 2h 后开始淋浇,每隔 4 小时淋浇一次,淋浇时间 1min,从接种木醋杆菌开始算时间,12 小时为一周期,第一周期不限氧,第二周期开始,每周期限氧 4 小时,限氧期间不淋浇,发酵时间总长 144h,可获得较高的细菌纤维素产量。

[0020] 本发明一种新的生产细菌纤维素的方法是淋浇发酵法,介于静态和动态发酵之间的细菌纤维素生产方法,很好地适应了木醋杆菌高溶氧,低剪切力的严格的生理特点,而且还有投资小,生产周期短,耗电低,操作简单,占地面积小等诸多优点,有利于提高细菌纤维素的产量和生产效率,降低生产成本,值得一提的是,淋浇发酵生产的细菌纤维素,其结构性上的优越性将会进一步拓宽它的应用范围。淋浇发酵法对细菌纤维素的工业化生产和商业化应用有极大的意义。

[0021] 本发明解决了现有细菌纤维素生产方法难以同时满足木醋杆菌高溶氧量和低剪切力要求的矛盾,提高了细菌纤维素的产量和生产效率。

附图说明

[0022] 图 1,淋浇发酵法生产细菌纤维素所利用的食醋淋浇发酵塔示意图,图中:1. T 形浇罐器、2. 填料层、3. 温度计、4. 通气孔、5. 液位罐、6. 球形阀、7. 过滤器、8. 泵。

[0023] 图 2,实施例 1 双菌体淋浇发酵与静态单菌发酵细菌纤维素产量的比较图。

[0024] 图 3,实施例 2 三菌种淋浇发酵细菌纤维素产量与静态单菌发酵和双菌淋浇发酵细菌纤维素产量比较图。

[0025]

具体实施方式

[0026] 实施例 1:总糖含量 171.28g/L 糖化液与乙醇含量为 8.24%v/v 的酒精发酵醪按 3:5(v:v) 的比例混合后,准确量取 8L 上述混合液加入经沸水消毒 30min 的淋浇发酵塔底,将 121℃ 下灭菌的玉米芯 7.5kg 和谷壳 5kg 趁热转移至淋浇发酵塔假底之上的填料层(其中玉米芯自然堆放,谷壳于玉米芯底部和顶部分两层平铺),盖好顶盖后夹套通冷却水强制冷却,当塔内温度降至 35℃ 后进一步自然冷却至 30℃,然后接种 10%(v/v) 木醋杆菌和 3% 醋酸菌种子液,静置培养 12h 后每隔 4h 淋浇一次,每次淋浇 1min,直至发酵结束(144h),整个过程采用 33℃ 左右的温水进行控温,使塔内温度维持在 28℃-32℃。结果表明,稳定生长期菌体浓度在静态发酵的 1.35 倍以上,发酵液中残糖含量(33.8g/L)比静态发酵(43.45g/L)低 22.21%,总酸含量(19.80g/kg)比静态发酵(17.88g/kg)高 10.74%,细菌纤维素最终产量为 4.792g/L,是静态发酵法(2.667g/L)的 1.8 倍。双菌体淋浇发酵与静态单菌发酵细菌纤维素产量的比较图如附图 2。

[0027] 实施例 2:总糖含量 171.28g/L 糖化液与乙醇含量为 8.24% (v/v)的酒精发酵醪按 3:5(v:v),准确量取 8L 上述混合液加入经沸水消毒 30min 的淋浇发酵塔底部,将 121℃

下灭菌的玉米芯 7.5kg 和谷壳 5kg 趁热转移至淋浇发酵塔底之上的填料层（其中玉米芯自然堆放，谷壳于玉米芯底部和顶部分两层平铺），盖好顶盖后夹套通冷却水强制冷却，当塔内温度降至 35℃ 后进一步自然冷却至 30℃，然后接种 8.2% (v/v) 木醋杆菌、1.9% (v/v) 醋酸菌、2.1% (v/v) 酵母菌种子液，以 12h 为一个控制周期，第一周期不进行限氧，从第二周期开始淋浇频率为 2 次 /12h（其中限氧 4h），每次淋浇 1min，直至发酵结束（144h），整个过程采用 33℃ 左右的温水进行控温，使塔内温度维持在 28℃ -32℃。结果表明，细菌纤维素的产量为 7.810g/L，比双菌淋浇发酵（4.792g/L）的提高了 63%，是最初的单菌静态发酵（2.121g/L）的 3.68 倍。三菌种淋浇发酵细菌纤维素产量与静态单菌发酵和双菌淋浇发酵细菌纤维素产量比较图为附图 3。

[0028] 实施例 3：总糖含量 165g/L 糖化液与乙醇含量为 7.2% (v/v) 的酒精发酵醪按 3:5 (v:v)，准确量取 8L 上述混合液加入经沸水消毒 30min 的淋浇发酵塔中，将 121℃ 下灭菌的玉米芯 7.5kg 和谷壳 5kg 趁热转移至淋浇发酵塔假底之上（其中玉米芯自然堆放，谷壳于玉米芯底部和顶部分两层平铺），盖好顶盖后夹套通冷却水强制冷却，当塔内温度降至 35℃ 后进一步自然冷却至 30℃，然后接种 11%v/v 木醋杆菌，以 12h 为一个控制周期，第一周期不进行限氧，从第二周期开始淋浇频率为 2 次 /12h（其中限氧 4h），每次淋浇 1min，直至发酵结束（144h），整个过程采用 33℃ 左右的温水进行控温，使塔内温度维持在 28℃ -32℃。结果表明，细菌纤维素的产量为 7.130g/L，低于实施例 2 的细菌纤维素的产量（7.810g/L）。

[0029] 实施例 4：总糖含量 178g/L 糖化液与乙醇含量为 8.8% (v/v) 的酒精发酵醪按 3:5 (v:v)，准确量取 8L 上述混合液加入经沸水消毒 30min 的淋浇发酵塔中，将 121℃ 下灭菌的玉米芯 7.5kg 和谷壳 5kg 趁热转移至淋浇发酵塔假底之上（其中玉米芯自然堆放，谷壳于玉米芯底部和顶部分两层平铺），盖好顶盖后夹套通冷却水强制冷却，当塔内温度降至 35℃ 后进一步自然冷却至 30℃，然后接种 11%v/v 木醋杆菌，以 12h 为一个控制周期，第一周期不进行限氧，从第二周期开始淋浇频率为 2 次 /12h（其中限氧 4h），每次淋浇 1min，直至发酵结束（144h），整个过程采用 33℃ 左右的温水进行控温，使塔内温度维持在 28℃ -32℃。结果表明，细菌纤维素的产量为 6.920g/L，低于实施例 2 的细菌纤维素的产量（7.810g/L）。

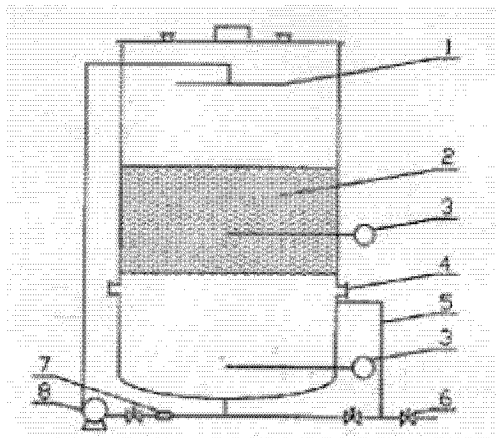


图 1

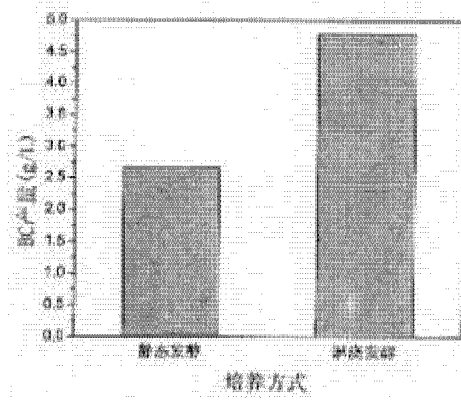


图 2

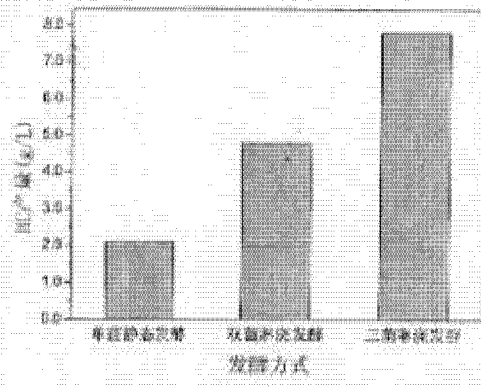


图 3