



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103343151 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201310259219. 9

(22) 申请日 2013. 06. 26

(71) 申请人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇福建师范大学科技处

(72) 发明人 黄祖新 李欣 黄镇 张晓敏

(74) 专利代理机构 福州君诚知识产权代理有限公司 35211

代理人 戴雨君

(51) Int. Cl.

C12P 19/04 (2006. 01)

C12R 1/01 (2006. 01)

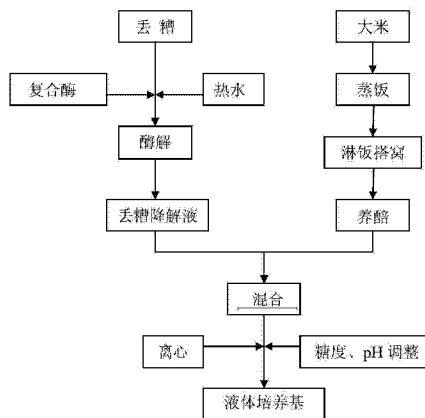
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种细菌纤维素薄膜的液体培养基的制备方法。首先进行大米糖化醪液和丢糟降解液的预制备,混合后成细菌纤维素薄膜的液体培养基,其特征是将大米清洗后清水浸泡、沥干、蒸饭,加入根霉米粉倒入酒缸内进行搭窝糖化,冲入热水养醅后得大米糖化醪液备用;在丢糟中加入热水和复合酶进行酶解,得到丢糟降解液备用;将丢糟降解液和大米糖化醪液按 1 : 1.5 ~ 3 的重量份比例混合,离心并回收清液,进行 pH 值、糖度调整制成本发明所述的细菌纤维素薄膜液体培养基。本发明制备的液体培养基,与现有常用 HS 培养基相比,培养基原料成本低,营养成分丰富,膜片厚度为 > 10mm,得率提高到 7.2 ~ 7.8g/L,发酵周期时间缩短 1.5 ~ 3d。



1. 一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,首先利用大米进行大米糖化醪液的预制备,再进行丢糟降解液的预制备,混合后制备成细菌纤维素薄膜的液体培养基,其特征在于:

所述的大米糖化醪液的预制备,其过程是:

(1) 蒸饭:将大米清洗后清水浸泡、沥干,倒入立式蒸饭机连续蒸饭,饭粒熟透;

(2) 淋饭搭窝:常温下将熟透饭粒与根霉米粉拌匀成混合料,倒入酒缸内,压平实,中间挖个井状窝进行搭窝糖化;

(3) 经过搭窝糖化 60 ~ 72 h 后,井状窝中出现少量糖化液,此时冲入 90 ~ 100℃ 热水以减缓糖化速率,搅拌均匀进行养醅,养醅 2 ~ 3 d 后得大米糖化醪液备用;

所述的丢糟降解液的预制备,其过程是:

在丢糟中加入 50℃ 热水和复合酶,搅拌混合进行 6 h 酶解,得到丢糟降解液备用;

所述的细菌纤维素薄膜液体培养基的制备,其过程是:

(1) 将丢糟降解液和 大米糖化醪液按 1 : 1.5 ~ 3 的重量份比例混合,混合后以 4000r/min 进行离心,回收清液;

(2) 测定清液糖度并进行调整糖度至 12° Brix;

(3) 同时采用 1mol/L 柠檬酸溶液调节清液的 pH 值至 3.0 ~ 4.5,即制成本发明所述的细菌纤维素薄膜液体培养基。

2. 根据权利要求 1 所述的一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,其特征在于所述的丢糟降解液酶解,酶解条件为:品温 45 ~ 52℃, pH6.0。

3. 根据权利要求 1 所述的一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,其特征在于所述的丢糟中加入热水和复合酶,是按一下比例加入的:100 重量份丢糟加 30 ~ 40 重量份热水,100 重量份丢糟加 0.75 重量份的复合酶。

4. 根据权利要求 1 所述的一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,其特征在于所述的复合酶,其组份为:葡聚糖酶 40%,由枯草杆菌制备的蛋白酶 40%、纤维素酶 20%。

5. 根据权利要求 1 所述的一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,其特征在于所述的淋饭搭窝中,熟透饭粒与根霉米粉混合料是按 100 重量份的大米拌入 8 ~ 12 重量份根霉米粉;倒入酒缸内的混合料占酒缸容量的 55 ~ 65%。

6. 根据权利要求 1 所述的一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法,其特征在于所述的淋饭搭窝糖化后冲入热水的量是大米重量的 1.5 ~ 1.8 倍。

## 一种细菌纤维素薄膜的液体培养基制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种微生物发酵技术领域,具体涉及一种细菌纤维素薄膜的液体培养基的制备方法。

### 背景技术

[0002] 由微生物合成的细菌纤维素,它具有良好的生物适应性,韧性强度和水合度,是许多植物纤维素无法比拟的优良性能。目前,生产细菌纤维素的制造成本过高和应用领域较窄,限制了细菌纤维素的有效应用和产业发展。除了产细菌纤维素优良菌株外,生产细菌纤维素需要适合发酵条件的培养基,而培养基的组成对细菌纤维素产量和经济性有很大关系的影响。细菌纤维素培养基所需要的碳源如葡萄糖、氮源如酵母膏等的成本比较高,制约了细菌纤维素的规模化生产与应用。因此,要想获得大量细菌纤维素和广泛普及使用优良的纳米纤维材料—细菌纤维素,首先降低制造成本,增加产率。

[0003] 丢糟又称丢料糟,也就是固态酿造大曲白酒完成之后必须丢掉或者进行其他处理,不能重新酿酒利用的料糟。由于丢糟酸度大,水分含量 65% 以上,难于加工处理,酒厂一般都没有有效利用而直接放弃既没有经济效益又带来环境污染。干燥的丢糟中除淀粉含量低于玉米外,其它成分,如粗蛋白、粗脂肪、粗纤维均高于玉米,从能量来讲,丢糟几乎与玉米相等,且含有少量的乙醇、丰富的氨基酸、维生素等发酵产物,因而具有一定的开发价值。

### 发明内容

[0004] 本发明利用大米和白酒企业大量丢弃的丢糟,分别经过糖化和降解,混合后制备成细菌纤维素薄膜的液体培养基,利用该培养基制备细菌纤维素薄膜。

[0005] 为实现本发明的目的而采用技术方案如下:

#### 1、大米糖化醪液的预制备

(1) 蒸饭:将大米清洗后清水浸泡 6~10h,将水沥干,倒入立式蒸饭机连续蒸饭,饭粒熟透。

[0006] (2) 淋饭搭窝:常温下将熟透饭粒与根霉米粉拌匀成混合料,倒入酒缸内,压平实,中间挖个井状窝进行搭窝糖化。100 重量份的大米拌入 8~12 重量份根霉米粉。倒入酒缸内的混合料占酒缸容量的 55~65%。室温低于 20℃,需要盖麻袋保温。

[0007] (3) 经过搭窝糖化 60~72 h 后,井状窝中出现少量糖化液,此时冲入 90~100℃ 热水以减缓糖化速率,搅拌均匀进行养醅,养醅 2~3 d 后得大米糖化醪液备用。冲入热水的量是大米重量的 1.5~1.8 倍。

#### 2、丢糟降解液的预制备

在丢糟中加入 50℃ 热水和复合酶,搅拌混合进行 6 h 酶解,得到丢糟降解液备用。酶解条件为:品温 45~52℃,pH6.0。100 重量份丢糟中加入 30~40 重量份热水、0.75 重量份的复合酶。

所述的复合酶,其组份为:葡聚糖酶 40%,由枯草杆菌制备的蛋白酶 40%、纤维素酶 20%。

### [0009] 3、细菌纤维素薄膜液体培养基的制备:

以丢糟降解液和大米糖化醪液按 1:1.5~3 的重量份比例混合,混合后以 4000r/min 进行离心,回收清液;测定清液糖度并进行调整糖度至 12° Brix。同时采用 1mol/L 柠檬酸溶液调节清液的 pH 值至 3.0~4.5,即制成本发明所述的细菌纤维素薄膜液体培养基。

[0010] 本发明所述的根霉米粉,其制作过程如下:将台湾根霉 3066 (*Rhizopus formosaensis*) 菌株接到试管 PDA 培养基中活化培养 72h 待用。将过 60 目大米粉 80g 装入 500mL 的三角瓶中,塞上棉花塞包牛皮纸,高压锅杀菌成根霉米粉培养基备用。挑取试管 PDA 培养基中经活化培养的根霉菌丝接入根霉米粉培养基中,放入 33℃ 培养箱中,进行 48h 扩大培养。在超净工作台上将根霉米粉培养基中经扩大培养根霉用接种铲挖取约 40g,接入经杀菌的装有 1 kg 米粉的面盆中,拌匀混匀,盖上盆盖,放到 33℃ 培养室中进行培养,培养过程品温不超过 36℃,培养 48 h 后即制成根霉米粉备用。当品温超过 36℃ 时,翻盖迅速用无菌玻棒松动米粉降温。

[0011] 台湾根霉 (*Rhizopus formosaensis*) 菌株(编号 3066)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。

[0012] 木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌株(编号 1.01812)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

[0013] 复合酶的组份为葡聚糖酶、由枯草杆菌制备的蛋白酶、纤维素酶均由诺维信公司购得。

[0014] 应用本发明制备的细菌纤维素薄膜液体培养基制备细菌纤维素薄膜时,在液体培养基中接入 10% 木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌种液,每 8 小时通入无菌空气 15 分钟充气,增殖培养 2 d 制成菌体扩大培养液;将菌体扩大培养液倒入浅盘常温下静置培养 4~6 d,生长出一定厚度的细菌纤维素菌膜,压平烘干得到细菌纤维素薄膜。

[0015] 木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌种液制备:将 100mL HS 培养基装入 300mL 三角瓶中,灭菌,冷却后接入活化的木糖葡萄糖酸醋杆菌斜面种子,于 30℃、60r/min 振荡培养 3d。

[0016] HS 培养基:葡萄糖 20g,酵母粉 5g,蛋白胨 5g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.7g,柠檬酸 1.2g,以蒸馏水补足 1L,pH 调整为 6.0。

[0017] 采用本发明制备的细菌纤维素薄膜液体培养基,与现有常用 HS 培养基相比,培养基原料成本低,营养成分丰富,制备的细菌纤维素的膜片厚度为 > 10mm,烘干的细菌纤维素薄膜的得率提高到 7.2~7.8g/L,制备时间缩短 1.5~3d,缩短生成细菌纤维素的发酵周期,提高细菌纤维素薄膜的拉伸强度和断裂伸长率。

## 附图说明

[0018] 图 1 是本发明所述的细菌纤维素薄膜液体培养基的流程图。

## 具体实施方式

[0019] 实施例 1

### 1、大米糖化液的预制备

按照技术方案中详细描述步骤,将 200kg 大米蒸饭、淋饭搭窝,经过搭窝糖化得到糖化醪液备用。

### [0020] 2、丢糟降解液的预制备

按照技术方案中详细描述步骤,将 300kg 丢糟加热水、复合酶搅拌混合,进行酶解,得到丢糟降解液。

### [0021] 3、液体培养基制备:

以丢糟降解液和大米糖化醪液按 1:1.5 的重量份比例,各取 200 kg 丢糟降解液和 300 kg 大米糖化醪液混合,混合液通过离心机,以 4000r/min 离心,弃取固形物,清液回收,用 Brix 糖度计测定清液的糖度,显示清液的糖度为 16.5° Brix,此时逐步加水调整清液的糖度至 12° Brix,同时采用 1mol/L 柠檬酸溶液调整清液的 pH 值至 3.5,即制成具有营养成分丰富的细菌纤维素膜液体培养基。

### [0022] 4、细菌纤维素膜制备:

1) 加热灭菌:将制备的液体培养基加热 95°C,加热时间 15 分钟,自然冷却至 30°C。

[0023] 2) 充氧增殖培养:将 3L 冷却 30°C 液体培养基装入 5L 发酵罐中,接入 10% 木糖葡萄糖醋酸杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*) 菌种液,每 8 小时通入无菌空气 15 分钟充氧,控温 30°C 左右进行菌体扩大增殖培养,时间 2 d,制成菌体扩大培养液。

### [0024] 3) 细菌纤维素薄膜培养:

将 1L 菌体扩大培养液倒入 A 浅盘,常温 28°C 下静置培养 4 d,生长出细菌纤维素菌膜;生长出菌膜后,从 A 浅盘中将新生长细菌纤维素菌膜并倒出 1/3L 的菌体扩大培养液,一并加到 B 浅盘,再补足 2/3L 制备的液体培养基进行增殖培养;A 浅盘中原有剩余 2/3L 的菌体扩大培养液中,加入补足 1/3L 制备的液体培养基进行增殖培养。继续培养时间 4 d,A 浅盘和 B 浅盘都生长细菌纤维素菌膜。即得到厚度为 11.8mm 的细菌纤维素薄膜。烘干的细菌纤维素薄膜的产量为 7.3g/L,细菌纤维素的膜制备时间缩短 1.5d,缩短生成细菌纤维素的发酵周期。

[0025] 本实施例中使用的台湾根霉 *Rhizopus formosaensis* 菌株(编号 3066)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。根霉米粉制作方案如技术方案所述。木糖葡萄糖醋酸杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)菌株(编号 1.01812)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

### [0026] 实施例 2

#### 1、大米糖化液的预制备

与实施例 1 相同。

### [0027] 2、丢糟降解液的预制备

与实施例 1 相同。

### [0028] 3、液体培养基制备:

以丢糟降解液和大米糖化醪液按 1:3 的重量份比例,各取 100 kg 丢糟降解液和 300 kg 大米糖化醪液混合,混合液通过离心机,以 4000r/min 离心,弃取固形物,清液回收,用 Brix 糖度计测定清液的糖度,显示清液的糖度为 14.5° Brix,此时逐步加水调整清液的糖度至 12° Brix,同时采用 1mol/L 柠檬酸溶液调整清液的 pH 值至 4.5,即制成具有营养成分丰富

的细菌纤维素膜液体培养基。

[0029] 4、细菌纤维素膜制备：

1) 加热灭菌：将制备的液体培养基加热 100℃，加热时间 12 分钟，自然冷却至 30℃。

[0030] 2) 充氧增殖培养：将 3L 冷却 30℃ 液体培养基装入 5L 发酵罐中，接入 10% 木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌种液，每 8 小时通入无菌空气 15 分钟充氧，控温 30℃ 左右进行菌体扩大增殖培养，时间 2 d，制成菌体扩大培养液。

[0031] 3) 细菌纤维素薄膜培养：

将 1L 菌体扩大培养液倒入 A 搪瓷浅盘，常温 30℃ 下静置培养 4 d，生长出细菌纤维素菌膜；生长出菌膜后，从 A 浅盘中将新生长细菌纤维素菌膜并倒出 1/3L 的菌体扩大培养液，一并加到 B 浅盘再补足 2/3L 制备的液体培养基进行增殖培养；A 浅盘中原有剩余 2/3L 的菌体扩大培养液中，加入补足 1/3L 制备的液体培养基进行增殖培养，继续培养时间 4d，从 A 浅盘和 B 浅盘都生长出细菌纤维素菌膜。即得到厚度为 11.6mm 的细菌纤维素薄膜。烘干的细菌纤维素薄膜产量为 7.2g/L，细菌纤维素膜制备时间缩短 1d，缩短生成细菌纤维素的发酵周期。

[0032] 本实施例中使用的台湾根霉 *Rhizopus formosaensis* 菌株(编号 3066) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。根霉米粉制作方案如技术方案所述。木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌株(编号 1.01812) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

[0033] 实施例 3

1、大米糖化液的预制备

与实施例 1 相同。

[0034] 2、丢糟降解液的预制备

与实施例 1 相同。

[0035] 3、液体培养基制备：

以丢糟降解液和 大米糖化醪液按 1 :2.5 的重量份比例，各取 100 kg 丢糟降解液和 250 kg 大米糖化醪液混合，混合液通过离心机，以 4000r/min 离心，弃取固形物，清液回收，用 Brix 糖度计测定清液的糖度，显示清液的糖度为 15.5° Brix，此时逐步加水调整清液的糖度至 12° Brix，同时采用 1mol/L 柠檬酸溶液调整清液的 pH 值至 4.0，即制成具有营养成分丰富的细菌纤维素膜液体培养基。

[0036] 4、细菌纤维素膜制备：

1) 加热灭菌：将制备的液体培养基加热 100℃，加热时间 15 分钟，自然冷却至 30℃。

[0037] 2) 充氧增殖培养：将 3L 冷却 30℃ 液体培养基装入 5L 发酵罐中，接入 10% 木糖葡萄糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 菌种液，每 8 小时通入无菌空气 15 分钟充氧，控温 30℃ 左右进行菌体扩大增殖培养，时间 2 d，制成菌体扩大培养液。

[0038] 3) 细菌纤维素薄膜培养：

将 1L 菌体扩大培养液倒入 A 搪瓷浅盘，常温 32℃ 下静置培养 4 d，生长出细菌纤维素菌膜；生长出菌膜后，从 A 浅盘中将细菌纤维素菌膜并倒出 1/3L 的菌体扩大培养液，一并加到 B 浅盘再补足 2/3L 制备的液体培养基进行增殖培养；A 浅盘中原有剩余 2/3L 的菌体扩大培养液中，加入补足 1/3L 制备的液体培养基进行增殖培养，培养时间 4d，从 A 浅盘和 B 浅盘

都生长出细菌纤维素菌膜。即得到厚度为 12.2mm 的细菌纤维素薄膜。烘干的细菌纤维素薄膜的产量为 7.8g/L, 细菌纤维素膜制备时间缩短 1d, 缩短生成细菌纤维素的发酵周期。

[0039] 本技术方案中细菌纤维素薄膜液体培养基与 HS 培养基同时进行发酵生产细菌纤维素, 对细菌纤维素薄膜拉伸强度和伸长率进行测试, 试验结果相比较, 有如下特点:

试验组	细菌纤维素产量 (g/L)	拉伸强度 (Mpa)	断裂伸长率 (%)
HS 培养基	6.4	20.8	5.8
实例 1	7.3	29.7	16.6
实例 2	7.2	26.8	10.8
实例 3	7.8	28.2	13.6

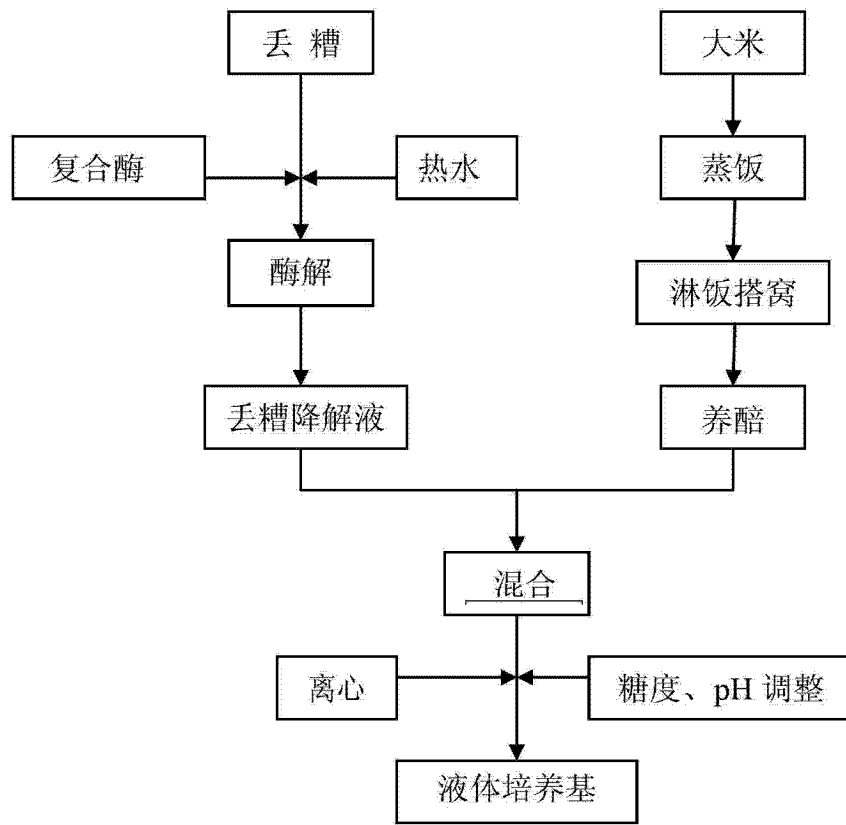


图 1