



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103789360 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410036170. 5

(22) 申请日 2014. 01. 24

(73) 专利权人 合肥工业大学

地址 230000 安徽省合肥市屯溪路 193 号

(72) 发明人 李兴江 李硕 姜绍通 潘丽军

吴悦 刘亚 孙婷

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务

所 (普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

C12P 7/46(2006. 01)

C12R 1/845(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103013843 A, 2013. 04. 03,

CN 102559518 A, 2012. 07. 11,

徐晴等. 根霉菌利用木质纤维素发酵生产有机酸的研究进展. 《中国生物工程杂志》. 2009, 第 29 卷 (第 9 期),

审查员 李煦颖

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,通过碱性双氧水对玉米芯预处理,能有效去除玉米芯中的木质素和半纤维素,提高了纤维素的纯度,还使纤维素结构疏松,更易水解,玉米芯的损失率减少到为 26. 85 ~ 27. 16%;在此基础上,将经过预处理后的玉米芯原料,进行预酶解,原料中部分纤维素在此过程中转化为小分子糖,再接入戴尔根霉种子液,酶解和发酵同步进行,酶解过程中葡萄糖不断转化为富马酸,解除了后续酶解过程中的大量葡萄糖积累对酶的反馈抑制作用,提高了纤维素转化率和富马酸得率。本发明以玉米芯为原料,为富马酸的生产开辟了新途径,其工业化微生物转化生产经济意义重大。

1. 一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将干燥玉米芯粉碎至 40 目后与碱性双氧水溶液按质量体积比 1g:(1~15)mL 混合,在 85℃~95℃下处理 18h~20h,水洗至中性,烘干,得到预处理玉米芯纤维素;其中,所述碱性双氧水溶液由质量浓度 5%~7%的双氧水以及 1.5mol/L 氢氧化钠组成;

(2) 将纤维素酶以 1UI/g 玉米芯纤维素的量加入到所述预处理玉米芯纤维素中,并用蒸馏水调节固液比为 1:10 后置于发酵罐中,在 50℃温度、120r/min 搅拌速度条件下水解 16h,得到混合液;

(3) 将发酵罐的温度降低并保持在 37℃~38℃,将戴尔根霉种子液和发酵营养液加入到所述混合液中,在空气通气量 3L/min~3.5L/min、搅拌速度为 180r/min~200r/min 条件下,通过流加无菌氢氧化钙乳液来控制发酵液 pH5.5~6.0,并发酵 66h~78h 后,得到富马酸发酵液;其中,所述戴尔根霉种子液、发酵营养液以及混合液的体积比为 1:1:18。

2. 如权利要求 1 所述的利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,其特征在于,在步骤 (3) 中,所述戴尔根霉种子液制备方法为:将浓度为 $(1\sim10)\times10^5$ CFU/mL 的戴尔根霉孢子液以体积比 1:10 接入种子培养基中,在 30℃~32℃、180r/min~200r/min 条件下培养 16h~18h;其中,所述种子培养基组成为:葡萄糖 30g/L~40g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8g/L~10g/L, 酵母浸粉 1.5g/L~2.0g/L, KH_2PO_4 1.0g/L~1.5g/L, MgSO_4 0.3g/L~0.4g/L, MnSO_4 0.3g/L~0.4g/L, FeSO_4 0.02g/L~0.03g/L。

3. 如权利要求 2 所述的利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,其特征在于,所述戴尔根霉菌种为产富马酸戴尔根霉 (*Rhizopus delemar*) CICC41341,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

4. 如权利要求 1 所述的利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,其特征在于,在步骤 (3) 中,所述发酵营养液组成为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80.0g/L~100g/L, 酵母粉 5.0g/L~6.0g/L, KH_2PO_4 10g/L~12g/L, $\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$ 6.6g/L~7.2g/L, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 6g/L~7g/L, $\text{FeSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g/L~0.5g/L, 以及 CaCl_2 40g/L~50g/L。

一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法

技术领域

[0001] 本发明属于发酵技术领域,尤其涉及一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法。

背景技术

[0002] 纤维质资源的主要成分是纤维、半纤维素和木质素。其中,纤维素、半纤维素是可发酵糖的来源,含量占木质纤维素的 66 ~ 75%(纤维质原料的绝干重量)。纤维质原料的结构非常复杂,必须经过一定的处理,使其降解成为小分子糖,然后通过戴尔根霉发酵成富马酸。

[0003] 最初的纤维素酶解发酵制备有机酸是酶解及发酵分步进行,天然木质纤维素原料经预处理后直接进行酶水解时,由于纤维素结构的特征,造成纤维酶解时间长,完全酶解需要 72 小时以上,同时由于酶解时产生的纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制,使得纤维素酶解糖得率低,糖浓度低(约在 12% 以内)。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,旨在解决现有纤维素酶解、发酵糖得率较低的问题。

[0005] 本发明是这样实现的,一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,包括以下步骤:

[0006] (1) 将干燥玉米芯粉碎至 40 目后与碱性双氧水溶液按质量体积比 1g:(1 ~ 15) mL 混合,在 85℃ ~ 95℃ 下处理 18h ~ 20h,水洗至中性,烘干,得到预处理玉米芯纤维素;其中,所述碱性双氧水溶液由质量浓度 5% ~ 7% 的双氧水以及 1.5mol/L 氢氧化钠组成;

[0007] (2) 将纤维素酶以 1UI/g 玉米芯纤维素的量加入到所述预处理玉米芯纤维素中,并用蒸馏水调节固液比为 1:10 后置于发酵罐中,在 50℃ 温度、120r/min 搅拌速度条件下水解 16h,得到混合液;

[0008] (3) 将发酵罐的温度降低并保持在 37℃ ~ 38℃,将戴尔根霉种子液和发酵营养液加入到所述混合液中,在空气通气量 3L/min ~ 3.5L/min、搅拌速度为 180r/min ~ 200r/min 条件下,通过流加无菌氢氧化钙乳液来控制发酵液 pH5.5 ~ 6.0,并发酵 66h ~ 78h 后,得到富马酸发酵液;其中,所述戴尔根霉种子液、发酵营养液以及混合液的体积比为 1:1:18。

[0009] 优选地,在步骤(2)中,所述纤维素酶为依照文献:“高星星,潘丽军,杨培周,王秀洋.里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的条件优化[J].食品科学,2012,33(19):193-198”所记载的制备方法制备得到。

[0010] 优选地,在步骤(3)中,所述戴尔根霉种子液制备方法为:将浓度为(1 ~ 10) × 10⁵CFU/mL 的戴尔根霉孢子液以体积比 1:10 接入种子培养基中,在 30℃ ~ 32℃、180r/min ~ 200r/min 条件下培养 16h ~ 18h;其中,所述种子培养基组成为:葡萄糖 30g/

L ~ 40g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8g/L ~ 10g/L, 酵母浸粉 1.5g/L ~ 2.0g/L, KH_2PO_4 1.0g/L ~ 1.5g/L, MgSO_4 0.3g/L ~ 0.4g/L, MnSO_4 0.3g/L ~ 0.4g/L, FeSO_4 0.02g/L ~ 0.03g/L。

[0011] 优选地,所述戴尔根霉菌种为产富马酸戴尔根霉(*Rhizopus delemar*)CICC41341,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0012] 优选地,在步骤(2)中,所述发酵营养液组成为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80.0g/L ~ 100g/L,酵母粉 5.0g/L ~ 6.0g/L, KH_2PO_4 10g/L ~ 12g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.6g/L ~ 7.2g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6g/L ~ 7g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g/L ~ 0.5g/L,以及 CaCl_2 40g/L ~ 50g/L。

[0013] 本发明克服现有技术的不足,提供一种利用玉米芯纤维素发酵制备富马酸发酵液的方法,通过将玉米芯用碱性双氧水预处理,将预处理玉米芯用纤维素粗酶液酶解,再加入戴尔根霉菌种子液和发酵营养液进行发酵后得到富马酸发酵液,所得富马酸发酵液中,富马酸含量达到 53.24 ~ 56.37g/L,富马酸得率为 0.46 ~ 0.53g/g 玉米芯纤维素。

[0014] 在本发明中,通过碱性双氧水对玉米芯预处理,能有效去除玉米芯中的木质素和半纤维素,提高了纤维素的纯度,还使纤维素结构疏松,更易水解,玉米芯的损失率减少到为 26.85 ~ 27.16%。

[0015] 此外,要提高纤维素酶解率,必须解决酶解过程中的纤维二糖及葡萄糖对酶的反馈抑制问题,在本发明中,将经过预处理后的玉米芯原料,进行预酶解,原料中部分纤维素在此过程中转化为小分子糖,再接入戴尔根霉菌种子液,酶解和发酵同步进行。酶解过程中葡萄糖不断转化为富马酸,解除了后续酶解过程中的大量葡萄糖积累对酶的反馈抑制作用,提高了纤维素转化率和富马酸得率。

具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0017] 以下实施例所用材料来源:玉米芯来自安徽省北部徐淮地区;粉碎机为摇摆式粉碎机,型号 HK-10B;; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母粉、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 均为国药集团生产;戴尔根霉 *Rhizopus delemar* CICC41341 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0018] 纤维素酶的制备参考“高星星,潘丽军,杨培周,王秀洋. 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 食品科学,2012,33(19):193-198;”的方法,具体制备过程如下:

[0019] (1) 菌种:里氏木霉(*Trichoderma reesei* CGMCC3.03711) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,黑曲霉(*Aspergillus niger* CICC41254) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0020] 原料:玉米秸秆,购自安徽省合肥市肥东县,将其粉碎至 40 目,碱性双氧水溶液浸泡 30h,用自来水洗至中性,放入烘箱中烘干,作为发酵产酶基质备用。

[0021] (2) 菌种保藏斜面培养基:马铃薯培养基(PDA)。

[0022] (3) Mandel's 菌丝体培养液配方:常量元素液: KH_2PO_4 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g, MgSO_4 0.3g, CaCl_2 0.3g, 加 600mL 蒸馏水使之溶解。微量元素液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0mg/L,

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4mg/L, CoCl_2 2.0mg/L, 加蒸馏水 200mL 使之溶解。将常量元素液与微量元素液混合后,用 HCl 调 pH5.5,再以蒸馏水定容于 1000ml 即为 Mandel's 无机盐营养液。都以 0.1M pH4.8 柠檬酸 / 柠檬酸钠缓冲溶液配制。

[0023] (4) 产纤维素酶培养基 (g/L): 葡萄糖 1, 蒸汽爆破渣 30 (绝干), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.20, 尿素 0.5, 蛋白胨 1, KH_2PO_4 2.0, CaCl_2 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014, CoCl_2 0.0037, Tween80 2 滴, 初始 pH 值 4.8, 装液量 50mL。

[0024] (5) 里氏木霉和黑曲霉种子液制备: 以洗孢子的形式将 PDA 培养基上的里氏木霉或黑曲霉接入到 250mL 三角瓶中, 装液量 100mL, 接种量 10% (v/v, 孢子悬液浓度为 1×10^6 个/mL), 32℃、200r/min 的条件下培养 18h ~ 24h。

[0025] (6) 产酶条件: 黑曲霉延迟接种时间 36h, 里氏木霉与黑曲霉接种比例 5:1, 发酵时间 7d, 固液比为 2:50 (g/mL) Tween-80 浓度 4mL/L、pH5.0 和装液量 50mL/250mL。

[0026] (7) 粗酶液制备: 将发酵液于 4℃、6000r/min 离心 10min 所得上清液即为纤维素酶粗酶液。

[0027] (8) 纤维素酶滤纸酶活 (FPA) 的测定方法: 取新华定性滤纸一条 (60mm×10mm, 约 50mg) 卷成筒状, 投入试管底部, 加 1.4mL pH4.8 的 0.05M 柠檬酸缓冲液, 再加入适当稀释的酶液 0.1mL, 盖上塞子, 将其置于 50℃ 恒温水浴摇床中振荡保温 30 分钟 (先将酶液预热 5 分钟)。取出试管迅速加入 DNS 试剂 3mL, 沸水中煮 5 分钟, 冷却至室温, 加蒸馏水定容至 25mL, 混合均匀。当滤纸沉降后, 取上清液在 540nm 处测吸光度。根据事先做好的葡萄糖标准曲线计算出生成的还原糖量 (mg), 并按下式计算酶活 (IU/mL):

[0028] $\text{FPA} = \text{生成的糖 (mg)} \times 1000 \times \text{总稀释倍数} / 130 \times 30 \times \text{纤维素酶体积 (mL)}。$

[0029] 测得, 自制纤维素酶滤纸酶活为 1.224IU/mL。

[0030] 实施例 1

[0031] 10L 发酵罐规模下利用玉米芯预水解同步发酵产富马酸具体操作步骤如下:

[0032] (1) 将晒干的 1.5kg 的玉米芯粉碎至 40 目后, 加入到承有 15kg 的质量浓度为 3% 的双氧水、1.5mol/L NaOH 的碱性双氧水溶液的半自动加热过滤桶中混匀, 调节温度到 90℃, 时间为 18h, 进行预处理。处理后通过过滤装置回收碱性双氧水, 并将滤渣洗至中性, 烘干, 获得预处理玉米芯纤维素。

[0033] (2) 称取 1kg 所述预处理玉米芯纤维素, 加入到 10L 发酵罐中, 在 121℃ 下灭菌 15min。待冷却至 50℃ 时, 向发酵罐中加入纤维素酶液 820mL, 无菌水 8.18L, 控制温度为 50℃, 搅拌转速为 120r/min, 预水解 16h。

[0034] (3) 预水解完成后, 将发酵罐的温度降低, 并保持在发酵温度 38℃。向发酵罐中接入 500mL 戴尔根霉 (*Rhizopus delemar*) CICC41341 的种子液和 500mL 无菌发酵营养液, 营养液组分为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80.0g/L, 酵母粉 5.0g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.6g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g/L, CaCl_2 40g/L。调节空气通气量为 3L/min, 搅拌转速为 180r/min, 流加无菌氢氧化钙乳液来控制发酵液 pH5.5 ~ 6.0, 培养 72h, 最终发酵液中富马酸含量为 55.64g/L。

[0035] 实施例 2

[0036] 500L 规模发酵罐下利用玉米芯预水解同步发酵产富马酸具体操作步骤如下:

[0037] (1) 将晒干的 75kg 的玉米芯粉碎至 40 目后, 加入到盛有 750kg 的 3% 双氧水、1.5mol/LNaOH 的碱性双氧水溶液的半自动加热过滤桶中混匀, 调节温度到 90℃, 时间为 18h, 进行预处理。处理后通过过滤装置回收碱性双氧水, 并将滤渣洗至中性, 烘干, 获得预处理玉米芯纤维素。

[0038] (2) 称取 50kg 玉米芯纤维素, 加入到 500L 发酵罐中, 在 121℃ 下灭菌 15min。待冷却至 50℃ 时, 向发酵罐接入纤维素酶液 41L, 无菌水 409L, 控制温度为 50℃, 搅拌转速为 120r/min, 预水解 16h。

[0039] (3) 预水解完成后, 将发酵罐的温度降低, 并保持在发酵温度 38℃。向发酵罐中接入 25L 戴尔根霉(*Rhizopus delemar*) CICC41341 的种子液和 25L 无菌发酵营养液, 营养液组分为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80.0g/L, 酵母粉 5.0g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.6g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g/L, CaCl_2 40g/L。调节空气通气量为 200L/min, 搅拌转速为 100r/min, 流加无菌氢氧化钙乳液来控制发酵液 pH5.5-pH6.0, 培养 72h, 得到最终发酵液中富马酸含量为 53.64g/L。

[0040] 实施例 3

[0041] 实验室摇瓶下利用玉米芯预水解同步发酵产富马酸具体操作步骤如下:

[0042] (1) 将晒干的 15g 的玉米芯粉碎至 40 目后, 加入到盛有 150g 的 3% 双氧水、1.5mol/LNaOH 的碱性双氧水溶液的烧杯中混匀, 放置于水浴摇床中, 调节温度到 90℃, 时间为 18h, 转速为 100r/min, 进行预处理, 处理后用 100 目纱布过滤, 回收碱性双氧水, 将滤渣洗至中性, 烘干, 获得预处理玉米芯纤维素。

[0043] (2) 称取 10g 玉米芯纤维素, 倒入 250mL 三角瓶中, 封口, 在 121℃ 下灭菌 15min。待冷却至 50℃ 时, 向三角瓶中接入纤维素酶液 8.2mL, 无菌水 81.8mL, 控制水浴摇床温度为 50℃, 转速为 150r/min, 预水解 16h。

[0044] (3) 预水解完成后, 将三角瓶降温至 38℃, 接入 5mL 戴尔根霉(*Rhizopus delemar*) CICC41341 的种子液和 5mL 无菌发酵营养液, 营养液组分为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80.0g/L, 酵母粉 5.0g/L, KH_2PO_4 10g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.6g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g/L, CaCO_3 700g/L。然后置于恒温培养箱中, 在 38℃, 转速为 200r/min 的条件下, 培养 72h, 最终发酵液中富马酸含量为 56.37g/L。

[0045] 相比与现有技术的缺点和不足, 本发明具有以下有益效果:

[0046] (1) 本发明以玉米芯为原料, 为富马酸的生产开辟了新途径; 生物质转化发酵的方法不仅能够避免使用不可再生的化石原料, 而且耗能少, 污染小; 富马酸作为一种重要的四碳平台化合物, 其工业化微生物转化生产意义重大。

[0047] (2) 本发明采用的碱性双氧水处理方法, 该方法能有效去除木质素和半纤维素, 提高纤维素的纯度, 并且处理条件不剧烈, 能耗小。

[0048] (3) 本发明采用预酶解可有效提高发酵初始糖浓度, 还可有效抑制纤维素酶中杂菌的生长, 有利于戴尔根霉的培养; 并且预水解阶段水解效率高, 能有效缩短生产富马酸的时间, 从而降低生产成本, 提高经济效益。

[0049] (4) 本发明采用同步发酵生产富马酸; 同步发酵是水解和发酵同步进行, 其优点在于纤维素酶水解速率相对较稳定, 能够提供比较稳定、适中的糖浓度, 适于菌株的持续发酵; 在同步发酵过程中戴尔根霉不断将对纤维素酶具有反馈抑制作用的单糖转化为有机

酸,保证了纤维素酶的活性,有效提高了纤维素的水解率和水解速度,从而提高富马酸的产量和产酸强度。

[0050] (5) 菌株的发酵制备工艺稳定,有利于工业化生产。

[0051] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。