



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114107403 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202111430501.X

C12R 1/07 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.29

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114107403 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(73) 专利权人 郑州轻工业大学

地址 450000 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道136号

(72) 发明人 杨旭 魏涛 宋丽丽 张志平

张靖楠 马歌丽 孟祥玉 史志远
李宁博

(74) 专利代理机构 郑州优盾知识产权代理有限
公司 41125

专利代理师 乔玉萍

(51) Int. Cl.

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

C07D 493/06 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20200064249 A, 2020.06.08

AU 2020102334 A4, 2020.10.29

CN 110301526 A, 2019.10.08

CN 102250981 A, 2011.11.23

CN 106967645 A, 2017.07.21

高新鹏. 石榴皮制取鞣花酸技术研究进展.
《现代农业科技》. 2020, (第14期), 第218-220页.

Federica Moccia. Ellagic Acid Recovery
by Solid State Fermentation of
Pomegranate Wastes by *Aspergillus niger*
and *Saccharomyces cerevisiae*: A
Comparison. 《Molecules》. 2019, 第24卷第1-11
页.

审查员 周奋进

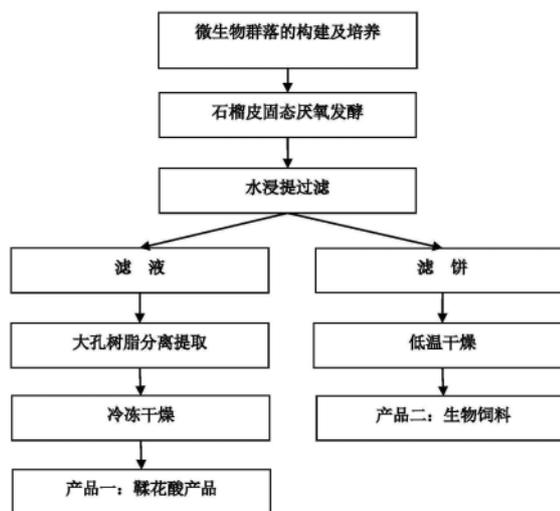
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和
生物饲料的方法

(57) 摘要

本发明属于药品、保健品技术领域和饲料加
工技术领域, 特别是指一种微生物群落发酵石榴
皮联产鞣花酸和生物饲料的方法。本发明方法采
用厌氧固态发酵技术对石榴皮进行预处理, 降解
纤维素和半纤维素, 打开石榴皮紧密的结构以富
集提取鞣花酸, 提高了鞣花酸的提取率, 具有成
本低廉, 工艺简单, 制作过程无污染的优点; 同
时将石榴皮滤饼低温干燥得到生物饲料, 得到的
生物饲料一方面具有较强抗氧化能力, 另一方面
在经过微生物发酵后, 有利于动物消化吸收利用,
且可以产生乳酸类风味物质, 使生物饲料变得酸
香, 动物适口性增强, 提高了农产品的附加值, 有
一定的经济效益。



1. 一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 构建及培养微生物群落:配制液态培养基3瓶,灭菌后分别单独接种凝结芽孢杆菌,发酵乳杆菌和干酪乳酸菌,同时培养后将3瓶种子液按照体积比混合均匀,得到微生物群落种子液;

(2) 厌氧固态发酵石榴皮:将石榴皮粉碎,加入水,然后接种微生物群落种子液,厌氧固态发酵,得到发酵石榴皮;

(3) 联产鞣花酸和生物饲料:向发酵石榴皮中加水,搅拌,过滤,滤液经分离提取、冷冻干燥后得到鞣花酸产品;滤饼经低温干燥得到生物饲料;

所述步骤(1)中凝结芽孢杆菌,发酵乳杆菌和干酪乳酸菌均购自于中国工业微生物菌种保藏中心,其菌种编号分别为Bio-53285,Bio-60997,Bio-67166。

2. 根据权利要求1所述的微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于:所述步骤(1)中液态培养基为MRS培养基。

3. 根据权利要求1所述的微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于:所述步骤(1)中培养温度为37 °C,培养时间为12-18 h,种子液体积比为1:1:1。

4. 根据权利要求1所述的微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于:所述步骤(2)中石榴皮粉碎尺寸为0.1-1.0 cm,形态为粉末。

5. 根据权利要求1所述的微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于:所述步骤(2)中加水量为石榴皮质量的0.5-1倍,微生物群落种子液的接种量为10-15 %,厌氧固态发酵时间为16-72 h。

6. 根据权利要求1所述的微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,其特征在于:所述步骤(3)中加水量为石榴皮质量的3-6倍,搅拌温度为60-70 °C,搅拌时间为30-60 min。

7. 权利要求1-6任一项所述的方法在制备生物饲料中的应用。

一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法

技术领域

[0001] 本发明属于药品、保健品技术领域和饲料加工技术领域,特别是指一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法。

背景技术

[0002] 我国石榴栽培历史悠久,经过长期自然选择与人工驯化,形成了不同的生态栽培群体,种质资源丰富,如河南省荥阳市河阴石榴,是中国国家地理标志产品,距今已有2100多年的历史。河南省淅川县因地制宜发展种植软籽石榴5万余亩,建成千亩以上基地8个。石榴具有高营养食用价值和高效用药物价值,深受人们喜爱。现阶段,石榴产业收入主要源于石榴果及其浅层次加工品的销售,但效果不太理想。一方面是新鲜石榴果若未及时出售或储存不当造成易裂口变质而滞销或是贱卖,另一方面是相关浅层次加工品附加值低,利润低且市场需求量小。石榴产业发展依然处在初始产品农业阶段,市场上没有通过深加工挖掘石榴的营养价值和药用价值来研发附加值较高的系列产品。2020年中央一号文件颁布,支持各地立足资源优势打造各具特色的农业全产业链,建立健全农民分享产业链增值收益机制,形成有竞争力的产业集群,推动农村一二三产业融合发展。近年来,国家政策鼓励支持农产品加工业发展,石榴产业可依托“大粮仓”“大厨房”“大餐桌”的优势,积极发展精深加工,培育全产业链农业产业化集群,变资源优势为经济优势、品牌优势为竞争优势。因此,顺应时代特征完善石榴深加工拓宽产业链条是提升特色农产品附加值、促进农民增收及推动产业化发展进程的有效途径。

[0003] 石榴中存在酚类物质、木质素、有机酸、脂肪酸、萜类、类固醇和生物碱等300余种植物化学物质,含量最为丰富的是酚类物质。酚类物质是植物体内最重要的次生代谢物质之一,石榴果皮、果汁、种子、叶片和花等部位存在不同种类和含量的酚类物质,石榴果皮中酚类物质含量最为丰富,主要为类黄酮化合物、酚酸类和单宁类等。鞣花酸是一类天然的多酚活性物质,由于鞣花酸对人体健康有很大的益处,因此生产和纯化这种次生代谢物具有十分重要的意义。例如,鞣花酸对实验小鼠有抗癫痫作用。在许多报道的饮食来源中,EA对醛固酮还原酶活性的抑制作用被评估并得出结论:鞣花酸具有预防或治疗糖尿病并发症的治疗前景。天然的鞣花酸能以游离的形式存在于多种植物的果实中,但更多的是以缩合形式在自然界中存在,比如鞣花单宁,丹宁发生氧化反应后才会生成鞣花酸。现阶段,市场上的大多数鞣花酸产品都是通过酸水解和溶剂萃取生产得到的,除了回收纯化成本较高之外,还存在大量污染。

[0004] 最近,有报道利用真菌发酵农业废物进行鞣花酸生产,如使用固态发酵方式利用鞣花酸酶为生物催化剂开发了用于鞣花酸生产的连续系统。专利CN102250981B公开了一种以石榴皮为原料固态发酵制备鞣花酸的方法,以石榴皮为原料,选用黑曲霉为发酵菌种,进行固态发酵,其中石榴皮需要水提前润湿,润湿液中提供氮源,发酵5-7天,发酵后产物经纯化、脱水得到鞣花酸(鞣花酸纯度在95%以上,收率为75.7%)。专利CN101701234A公开了一种用生物酶提取石榴皮渣中鞣花酸的方法,以石榴皮为原料,水为溶剂,用生物酶将鞣花单宁

降解为鞣花酸(实施例鞣花酸提取率为1.18g/100g原料)。以上两个专利中鞣花酸的提取率按石榴皮原料计,均低于本发明方法中的提取率(超过10 g/100g原料)。专利CN107400686A公开了一种固态发酵石榴皮制备的鞣花酸及其制备方法,以石榴皮为原料,以能合成单宁酶的黑曲霉和大肠杆菌为发酵菌种,经过制备发酵菌悬液、制备石榴皮发酵床、固态发酵石榴皮和萃取得到鞣花酸,发酵时间4-5天,发酵时间较长。而且,以上发明专利都是利用黑曲霉或/和大肠杆菌进行好氧固态发酵方式,需要通入大量空气(或者氧气)才能保证发酵顺利进行,过程耗能较高导致生产成本高。本发明利用厌氧乳酸菌进行隔绝空气厌氧发酵方式,过程不易染菌、不消耗能量,且发酵过程易于控制。

发明内容

[0005] 针对现有技术中鞣花酸化学提取法存在回收纯化成本高及污染的问题以及生物发酵提取鞣花酸法提取率低、发酵时间长的问题,本发明提出一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和饲料的方法,并对残余的发酵石榴皮残渣作为饲料的可行性进行性质评定。本发明中石榴皮原料选定可因地制宜,根据当地石榴种植情况,选择石榴加工后的剩余物石榴皮作为主要原料。

[0006] 为了达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法,步骤如下:

[0008] (1) 构建及培养微生物群落:配制液态培养基3瓶,灭菌后分别单独接种凝结芽孢杆菌,发酵乳杆菌和干酪乳酸菌,同时培养后将3瓶种子液按照体积比混合均匀,得到微生物群落种子液;

[0009] (2) 厌氧固态发酵石榴皮:将石榴皮粉碎,加入水,然后接种微生物群落种子液,厌氧固态发酵,得到发酵石榴皮;

[0010] (3) 联产鞣花酸和饲料:向发酵石榴皮中加水,搅拌,过滤,滤液经分离提取、冷冻干燥后得到鞣花酸产品;滤饼经低温干燥得到生物饲料。

[0011] 所述步骤(1)中液态培养基为MRS培养基。

[0012] 所述步骤(1)中凝结芽孢杆菌,发酵乳杆菌和干酪乳酸菌均购自于中国工业微生物菌种保藏中心,其菌种编号分别为Bio-53285,Bio-60997,Bio-67166。

[0013] 所述步骤(1)中培养温度为37 °C,培养时间为12-18 h,种子液体积比为1:1:1。

[0014] 所述步骤(2)中石榴皮粉碎尺寸为0.1-1.0 cm,形态为粉末。

[0015] 所述步骤(2)中加水量为石榴皮质量的0.5-1倍,微生物群落种子液的接种量为10-15 %,厌氧固态发酵时间为16-72 h。

[0016] 所述步骤(3)中加水量为石榴皮质量的3-6倍,搅拌温度为60-70 °C,搅拌时间为30-60 min。

[0017] 所述步骤(3)中石榴皮发酵后得到的滤液用非离子型大孔树脂Amberlite XAD-16分离提取,洗脱液为蒸馏水,洗脱剂为乙醇。

[0018] 上述方法联产的鞣花酸在药品、保健品中的应用。

[0019] 上述方法联产的生物饲料在生物饲料中的应用。

[0020] 本发明具有以下有益效果:

[0021] 1、我国是石榴种植大国,石榴具有高营养食用价值和高效用药物价值,深受人们

喜爱,但只有少部分果皮被用于中药药材,大部分被丢弃,造成了很大的浪费,本发明以石榴皮为原料,提取鞣花酸和制备生物饲料,原料成本低,在一定程度上解决了石榴皮浪费的问题。

[0022] 2、目前,市场上的大多数鞣花酸产品都是通过酸水解和溶剂萃取生产的,除了回收纯化成本较高之外,还存在大量污染。本工艺采用固态厌氧发酵技术对石榴皮进行预处理,降解纤维素和半纤维素,打开石榴皮紧密的结构联产鞣花酸和饲料,发酵样品的鞣花酸提取率超过10 g/100g原料(未发酵石榴皮提取率为5.17g/100g原料),比未发酵石榴皮鞣花酸提取率高两倍,发酵时间短(16-72 h),工艺简单;且得到的生物饲料有较强的抗氧化能力,同时石榴皮滤饼中的蛋白质经微生物发酵后一定程度降解了氨基酸类物质,利于动物消化吸收,可以直接作为生物饲料使用,提高了农产品的附加值,具有一定的经济效益。

[0023] 3、本发明利用厌氧乳酸菌进行隔绝空气厌氧发酵方式,过程不易染菌、不消耗能量,且发酵过程易于控制。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0025] 图1为本发明实施例1,2中利用微生物群落厌氧固态发酵石榴皮提取鞣花酸和联产生物饲料的方法流程图。

[0026] 图2为本发明实施例1,2中发酵石榴皮蛋白电泳图。

具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有付出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 实施例1

[0029] 一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法:

[0030] 称取200 g石榴皮原料(水分含量:8.65%,纤维素含量17.38%,半纤维素含量9.29%,原料DPPH清除率91.40%),加入自来水200 g,接入合成微生物群落种子液(接种量为 0.5×10^7 个/g原料),在厌氧条件下进行微生物固态常温发酵24 h(纤维素含量16.24%,半纤维素含量7.16%)。向发酵石榴皮中加入1500 g水,60 °C搅拌反应30 min,经过滤器过滤,滤饼经在80 °C条件下气流烘干12 h得到生物饲料136 g(产品DPPH清除率97.68%),滤液用非离子型大孔树脂Amberlite XAD-16分离提取,用蒸馏水作为洗脱液,乙醇作为洗脱剂,经冷冻干燥获得富集鞣花酸产品18.91 g(未经处理的石榴皮原料,可提取鞣花酸产品9.45 g)。

[0031] 实施例2

[0032] 一种微生物群落发酵石榴皮联产鞣花酸和生物饲料的方法:

[0033] 称取200 g石榴皮原料(水分含量:8.65%,纤维素含量17.38%,半纤维素含量9.29%,原料DPPH清除率91.40%),加入自来水200 g,接入微生物群落种子液(接种量为 0.5×10^7 个/g原料),在厌氧条件下进行微生物固态常温发酵72 h(纤维素含量15.50%,半纤维素含量7.10%)。向发酵石榴皮中加入1500 g水,60 °C搅拌反应30 min,经过滤器过滤,滤饼经在80 °C条件下气流烘干12 h得到生物饲料123 g(产品DPPH清除率89.89%),滤液用非离子型大孔树脂Amberlite XAD-16分离提取,用蒸馏水作为洗脱液,乙醇作为洗脱剂,经冷冻干燥获得富集鞣花酸产品16.37 g(未经处理的石榴皮原料,可提取鞣花酸产品9.45 g),表1为石榴皮原料及发酵后的石榴皮的组分质量分数、鞣花酸提取率、DPPH清除率的实验数据。

[0034] 通过实验结果可以发现,随着发酵时间增长,石榴皮中纤维素和半纤维素含量逐渐减少,说明石榴皮在微生物群落作用下,原料中纤维素和半纤维素得到一定程度的降解,纤维素和半纤维素的降解打开了石榴皮细胞紧密的结构,有利于后续提取过程对鞣花酸的富集。经过微生物群落发酵的石榴皮样品与未经发酵原料的DPPH清除率皆比较高,说明发酵样品清除DPPH自由基的能力增强,代表样品抗氧化能力越强,即可知经微生物群落发酵过的石榴皮样品有着较强抗氧化能力,可作为饲料的产品优势之一。原料中的蛋白质经过微生物发酵一定程度地降解为氨基酸类物质,有利于动物的消化吸收利用,见图2蛋白电泳图。电泳图结果表明石榴皮原料与发酵16 h样品蛋白条带在97.2 KDa附近,再延长发酵时间后的样品的蛋白条带只能看到大致的轮廓或者消失,主要是因为石榴皮原料发酵过后蛋白质分子量明显低于未经发酵的石榴皮原料的蛋白质分子量,说明石榴皮原料内的大分子蛋白质因乳酸菌群落发酵而发生降解为游离的氨基酸或者多肽类物质,有利于动物的消化吸收利用。

[0035] 表1 石榴皮原料及发酵后石榴皮的组分质量分数、鞣花酸提取量、DPPH清除率

样品	纤维素	半纤维素	酸不溶木质素	酸溶木质素	鞣花酸提取量 (g/100g原料)	DPPH清除率
石榴皮原料	17.38%	9.29%	39.12%	12.47%	5.17	91.40
石榴皮发酵16h	16.22%	8.83%	34.81%	11.82%	10.00	99.25
石榴皮发酵24h	16.24%	7.16%	34.83%	11.31%	10.35	97.68
石榴皮发酵40h	16.25%	7.44%	33.90%	12.26%	8.65	96.37
石榴皮发酵48h	16.37%	7.47%	32.69%	12.57%	8.82	96.74
石榴皮发酵64h	15.84%	7.10%	33.43%	12.64%	8.90	96.05
石榴皮发酵72h	15.50%	7.10%	30.58%	12.28%	8.96	89.89

[0036] [0037] 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、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

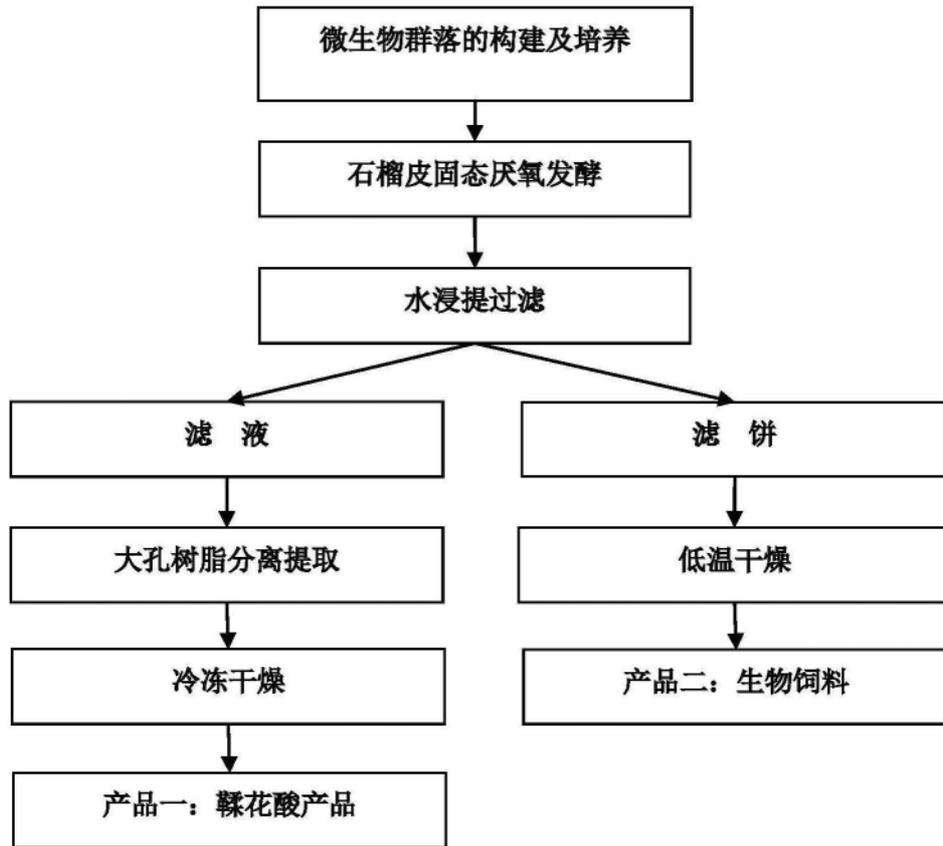


图1

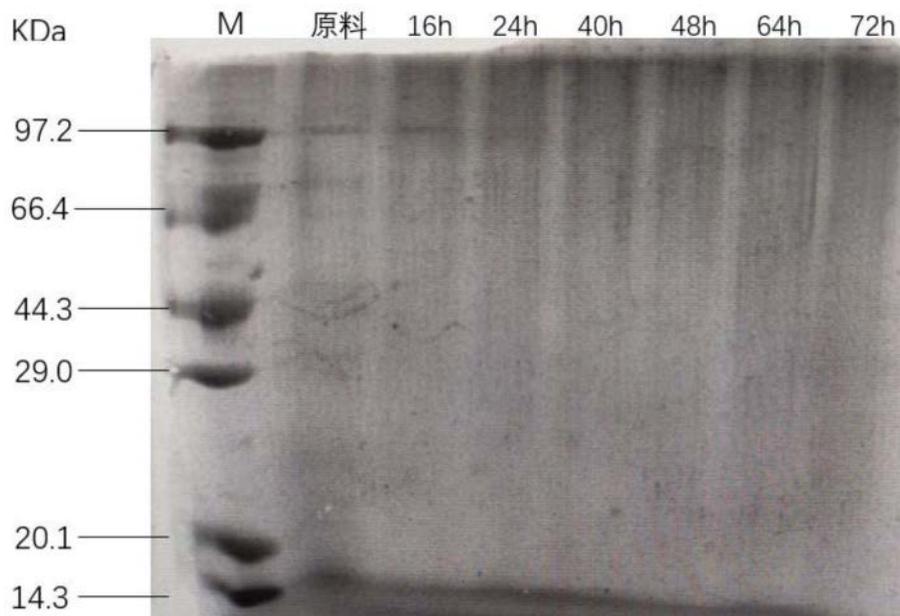


图2