

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610041291.4

[51] Int. Cl.

C12P 39/00 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

C12R 1/845 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1908184A

[22] 申请日 2006.8.5

[21] 申请号 200610041291.4

[71] 申请人 中国科学院等离子体物理研究所

地址 230031 安徽省合肥市蜀山湖路 350 号

[72] 发明人 王冬梅 李 文 杨英歌 吴跃进
余增亮

[74] 专利代理机构 合肥华信专利商标事务所
代理人 余成俊

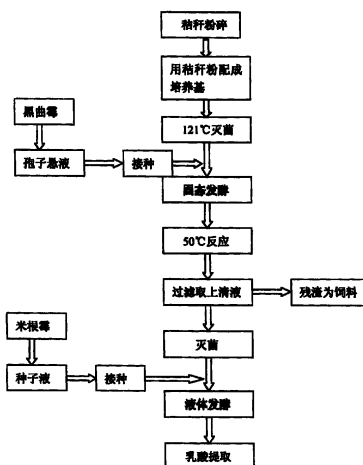
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

以木质纤维素类物质发酵制取高光学纯度 L-乳酸的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种以木质纤维素类物质发酵制取高光学纯度 L-乳酸的方法，该工艺涉及一种以木质纤维素类物质为原料，只需粉碎，不经过任何酸碱处理，添加适当的营养物质，第一步接种黑曲霉进行固态发酵 64-72 小时，第二步，发酵液过滤后滤液接种米根酶进行液态发酵 12-36 小时。经过两次发酵后，每 100g 干物质可以产生 6-12g 左右的乳酸，其对木质纤维素类物质的转化率达到 8-15%。固态发酵后的残渣则由于经过了木聚糖酶的消化消除“抗营养因子”戊聚糖可以作为畜类饲料。本发明据有生产成本低，步骤简单，时间短，对环境友好，经济价值高等优点，非常值得推广和应用。



1、一种以木质纤维素类物质发酵制取高光学纯度 L-乳酸的方法，其特征在于依次进行以下步骤：

- (1)、含木质纤维素类物质的预处理：将含木质纤维素类物质粉碎，备用；
- (2)、配制黑曲霉培养基：称取一定量的木质纤维素类物质，加入黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液，灭菌；
- (3)、进行黑曲霉接种：在黑曲霉培养基中接种；
- (4)、黑曲霉发酵：发酵培养，得到木聚糖酶及纤维素酶；
- (5)、加水，反应：向发酵液中加入无菌水，使木聚糖酶及纤维素酶与底物充分反应，产生还原糖类，作为下一步液体发酵的碳源；
- (6)、过滤：将发酵液过滤，木质纤维素类物质的残渣为畜类饲料；
- (7)、配制米根霉培养基：向滤液中加入米根霉发酵所需营养物质，灭菌；
- (8)、进行米根霉接种：在米根霉培养基中接种；
- (9)、米根霉发酵：发酵培养，得到 L-乳酸。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液成份为 (g/l)： KH_2PO_4 3.0； NaNO_3 5.0；玉米浆粉 5.0； MgSO_4 0.25，起始 PH 为 5.0，木质纤维素类物质加入到营养盐液后，其含水量为 65%。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于黑曲霉发酵采用 32°C — 28°C 变温发酵，培养 64-72 小时。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于向发酵液中加入无菌水后，PH 值为 5.0 左右，反应温度为 50°C ，使木聚糖酶及纤维素酶与底物充分反应。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于滤液中加入的米根霉发酵所需要的营养物质，其成份为： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g /l； $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g /l； KH_2PO_4 0.3 g /l； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g /l； CaCO_3 10 g /l (单独灭菌)，接种量为 5-10%。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于米根霉发酵条件为： 37°C 、摇床转速为 200rpm, 经 12-36 小时后发酵完毕。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述的黑曲霉和米根霉，其分

别选取 N 脉冲式辐照处理, 其中黑曲霉处理的能量为 $10 \sim 15\text{keV}$, 剂量为 $20 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 120 \times 2.6 \times 10^{13}\text{ions/cm}^2$, 米根霉处理得能量为 $10 \sim 15\text{keV}$, 剂量为 $40 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 60 \times 2.6 \times 10^{13}\text{ions/cm}^2$ 。

8、根据权利要求1所述的方法, 其特征在于所述的含木质纤维素类的物质是指一些工农业的废弃物, 农业废弃物如秸秆粉, 玉米芯, 甘蔗渣等, 工业上的废弃物如废木屑等。

以木质纤维素类物质发酵制取高光学纯度 L-乳酸的方法

技术领域

本发明涉及一种木质纤维素类物质经过微生物两步发酵制取高光学纯度 L-乳酸及优质饲料的方法。

背景技术

乳酸,英文名Lactic acid,学名 α -羟基丙酸(α -hydroxypropanoic acid),结构式为 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$,分子量为90.08,是一种天然存在的有机酸,广泛存在于人体、动物、植物和微生物中,具有D-型和L-型两种构型,乳酸在食品、医药、化工、环保等领域有广泛的用途,由于人体只具有代谢L-乳酸的L-乳酸脱氢酶,因此只有L-乳酸能被人体完全代谢利用。而D-乳酸和DL-乳酸过量摄入则有可能引起代谢紊乱甚至导致中毒。因此,从健康角度来考虑,世界卫生组织明确规定,成人每天摄入D-乳酸的量不得超过100mg/kg体重,对于三个月以下的婴儿食品中不应加入D-乳酸,而对于L-乳酸则不加限制。L-乳酸的生产及其聚合物作为可降解塑料和医用材料的研究日益深入,因此,高光学纯度的L-乳酸均具有广阔的应用前景。

目前,乳酸的生产主要是由微生物利用葡萄糖或木糖进行发酵生成,存在的一个很大的问题是生产成本的问题,而在我国存在很大的木质纤维素类物质资源,例如农作物秸秆,工厂废弃物如糖蜜、木屑、废纸等,据了解我国每年仅农作物秸秆和农产品谷壳等就有7亿多吨,再加上工业上的纤维废弃物的话数量就更加庞大了,就地焚烧不仅浪费资源,还导致严重的环境污染,但是由于没有很好的菌种及有效的方法一直限制着这些资源的应用。

公开号为 CN1594584 的一项专利公开了一种由农作物秸秆发酵同时制取乳酸及饲料的方法,前后经过了固态发酵→液态发酵→固态发酵三次发酵才能生产

出乳酸及饲料,原料来源为农作物秸秆,在秸秆的前处理中利用了碱液处理,对环境又造成了二次污染。

发明内容

本发明的目的在于提供一种以天然木质纤维素类物质为原料,通过微生物两步发酵制取高光学纯度L-乳酸及优质饲料的工艺,不仅较好的解决了木质纤维素类物质的利用问题,而且为L-乳酸的生产大大降低了成本。

本发明的技术方案为:

一种以木质纤维素类物质发酵制取高光学纯度 L-乳酸的方法,其特征在于依次进行以下步骤:

- (1)、含木质纤维素类物质的预处理:将含木质纤维素类物质粉碎,备用;
- (2)、配制黑曲霉培养基:称取一定量的木质纤维素类物质,加入黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液,灭菌;
- (3)、进行黑曲霉接种:在黑曲霉培养基中接种;
- (4)、黑曲霉发酵:发酵培养,得到木聚糖酶及纤维素酶;
- (5)、加水,反应:向发酵液中加入无菌水,使木聚糖酶及纤维素酶与底物充分反应,产生还原糖类,作为下一步液体发酵的碳源;
- (6)、过滤:将发酵液过滤,木质纤维素类物质的残渣为畜类饲料;
- (7)、配制米根霉培养基:向滤液中加入米根霉发酵所需营养物质,灭菌;
- (8)、进行米根霉接种:在米根霉培养基中接种;
- (9)、米根霉发酵:发酵培养,得到 L-乳酸。

黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液成份为(g/l): KH_2PO_4 3.0; NaNO_3 5.0; 玉米浆粉 5.0; MgSO_4 0.25, 起始 PH 为 5.0, 木质纤维素类物质加入到营养盐液后,其含水量为 65%。

黑曲霉发酵采用 32℃—28℃变温发酵,培养 64-72 小时。

向发酵液中加入无菌水后,PH 值为 5.0 左右,反应温度为 50℃,使木聚糖酶及纤维素酶与底物充分反应。

所述的滤液中加入的米根霉发酵所需要的营养物质,其成份为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/l; KH_2PO_4 0.3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/l; CaCO_3 10 g/l (单独灭菌),接种量为 5-10%。

米根霉发酵条件为：37℃、摇床转速为200rpm，经12-36小时后发酵完毕。

所述的黑曲霉和米根霉，其分别选取N⁺脉冲式辐照处理，其中黑曲霉处理的能量为10~15keV，剂量为 $20 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 120 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²，米根霉处理得能量为10~15keV，剂量为 $40 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 60 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²。

所述的含木质纤维素类的物质是指一些工农业的废弃物，农业废弃物如秸秆粉，玉米芯，甘蔗渣等，工业上的废弃物如废木屑等。

本发明只需经过两步发酵即可生产出L-乳酸及饲料，木质纤维素类物质不需要经过碱液处理，同时本发明所选用的这个菌种发酵所产生的乳酸经测定光学纯度大于98%，是一种非常优良的生产高光学纯度L-乳酸的菌种。所用原料为所有木质纤维素类物质，来源更加广泛。

本发明具有以下优点：工艺流程简单，利用离子注入选育的黑曲霉作为固态发酵产酶出发菌，产酶量高，达到了国际先进水平，第二步利用离子注入选育的米根霉进行发酵产酸，实验证明其不但能够利用六碳糖，利用五碳糖的水平也非常高，所以大大增加了半纤维素的利用率，并且所产L-乳酸光学纯度高，经济价值高，步骤简单，发酵时间短，投资少，同时产生的废渣还可以作为优质饲料，具有较大的经济效益。

附图说明

图1为木质纤维素类物质两步发酵制取高光学纯度L-乳酸和优质饲料的工艺流程图。

具体的实施方式

两株高产菌株的制备：

一株黑曲霉突变株 (*Aspergillus niger mutant* P602) 是由黑曲霉中间突变株 *Aspergillus niger mutant* N218 经过能量为10~15keV，剂量为 $20 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 120 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²的进行N⁺注入处理得到的。

一株米根霉突变株 (*Rhizopus oryzae* 6041) 是由米根霉出发菌经过能量为10~15keV，剂量为 $40 \times 2.6 \times 10^{13} \sim 60 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²的进行N⁺注入处理得到的高产菌。

离子注入在中国科学院等离子体物理研究所离子注入机上进行，它由离子源、聚焦系统、质量分析、加速系统、真空系统、靶室和测控系统等基本部分组

成。工作原理是：在离子源中产生等离子体，其中离子经引出系统引出，经质量分析器选择后，在加速系统中获得能量，就可以注入样品。

经离子注入诱变处理后这两种菌的产酶及产酸水平均有大幅度提高。

例 1

种子培养：

黑曲霉：取 10ml 无菌水将培养好的新鲜产孢子斜面上的孢子洗下，制成孢子悬液备用。

米根霉：37℃，200r/min，培养 12h。装液量：250mL 三角瓶装入 50mL 液体培养基。

(1)、木质纤维素类物质的预处理：将玉米芯、秸秆粉等木质纤维素类物质粉碎至 40-60 目，备用。

(2)、利用黑曲霉进行固体发酵产酶：称取一定量的干物质，加入黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液，成份为(g/l)：KH₂PO₄ 3.0；NaNO₃ 5.0；玉米浆粉 5.0；MgSO₄ 0.25，起始 PH 为 5.0，起始含水量为 65%，培养基配好后装入 250ml 的锥形瓶中，121℃灭菌 20 分钟，等到培养基灭好冷却后进行接种，取 10ml 无菌水将培养好的新鲜产孢子斜面上的孢子洗下，制成孢子悬液，吸取底物重量的 10-15%于配好并灭菌的发酵培养基中，进行变温发酵[32℃—28℃]，培养 64-72 小时，经测定此时产生了大量了木聚糖酶及纤维素酶。

黑曲霉能够发酵利用的木质纤维素类物质非常的广泛，但是要想使其产酶达到最高水平，就要合理调整各类物质的配比，为了使其产酶高，还要添加合适的营养盐液，本发明优先推荐如下条件：需要的营养盐液，成份为(g/l)：KH₂PO₄ 3.0；NaNO₃ 5.0；玉米浆粉 5.0；MgSO₄ 0.25，起始 PH 为 5.0，起始含水量为 65%，培养基配好后装入 200ml 的锥形瓶中进行变温发酵[32℃—28℃]，摇床转速 200rpm，培养 64-72 小时。

(3)、固体发酵完毕后，往发酵瓶中加入 80-100ml 无菌水，置于 50℃条件下，并使其轻轻摇动，使产生的能消化木素类物质的酶类与木素类物质充分反应（固态发酵完毕后，其 PH 值为 5.0 左右，为酶反应的最适 PH），产生还原糖类，作为下一步液体发酵的碳源。

(4)、将发酵液过滤，过滤后的木质纤维素类物质残渣则由于经过了木聚糖

酶的消化消除“抗营养因子”戊聚糖可以作为畜类饲料。取一定量的滤液，加入米根霉发酵所需要的营养元素，米根霉发酵产酸培养基组成为(g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75。同时为了控制发酵过程中的PH值，在发酵液中加入了一定量的 CaCO_3 。温度为 37°C 、摇床转速为 200rpm, 接种量为 5-10%，具体接种过程同黑曲霉相同，经测定 12-36 小时后发酵完毕，产生 L-乳酸。

例 2

将玉米芯、秸秆粉碎至 40-60 目，备用。

利用黑曲霉进行固体发酵产酶：将玉米芯、秸秆粉按一定比例混合，并加入麸皮作为营养因子，最终玉米芯：麸皮：秸秆粉=4: 2.5: 1，称取 7.5 克干物质，加入黑曲霉固体发酵所需要的营养盐液，成份为(g/l): KH_2PO_4 3.0; NaNO_3 5.0; 玉米浆粉 5.0; MgSO_4 0.25, 起始 PH 为 5.0, 起始含水量为 65%，培养基配好后装入 250ml 的锥形瓶中， 121°C 灭菌 20 分钟，等到培养基灭好冷却后进行接种，取 10ml 无菌水将培养好的新鲜产孢子斜面上的孢子洗下，制成孢子悬液，吸取 1ml 于配好并灭菌的发酵培养基中，进行变温发酵 [32°C — 28°C]，培养 64 小时，经测定此时产生了大量了木聚糖酶及纤维素酶。

经测定，产生的木聚糖酶的酶活为 6320IU/g，纤维素酶酶活为 28 IU/g。

固体发酵完毕后，往发酵瓶中加入 100ml 无菌水，置于 50°C 条件下，并使其轻轻摇动，使产生的能消化木质纤维素类物质的酶类与底物充分反应，产生还原糖类，作为下一步液体发酵的碳源。

将发酵液过滤，过滤后的木质纤维素类物质残渣则由于经过了木聚糖酶的消化消除“抗营养因子”戊聚糖可以作为畜类饲料。取滤液 50ml，加入米根霉发酵所需要的营养盐液，米根霉发酵产酸培养基组成为(g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75。同时为了控制发酵过程中的PH值，我们在发酵液中加入了一定量的 CaCO_3 。进行米根霉发酵时培养条件为装液量为 50ml，温度为 37°C 、摇床转速为 200rpm, 接种量为 5%，具体接种过程同黑曲霉相同，经测定 12-36 小时后发酵完毕，产生 L-乳酸，产生的量为 7-8 mg / g 干物质，也就是说经过两次发酵后，每 100 g 干物质可以产生 10 g 左右的乳酸，其对木质纤维素类物质的转化率达到 10% 左右。

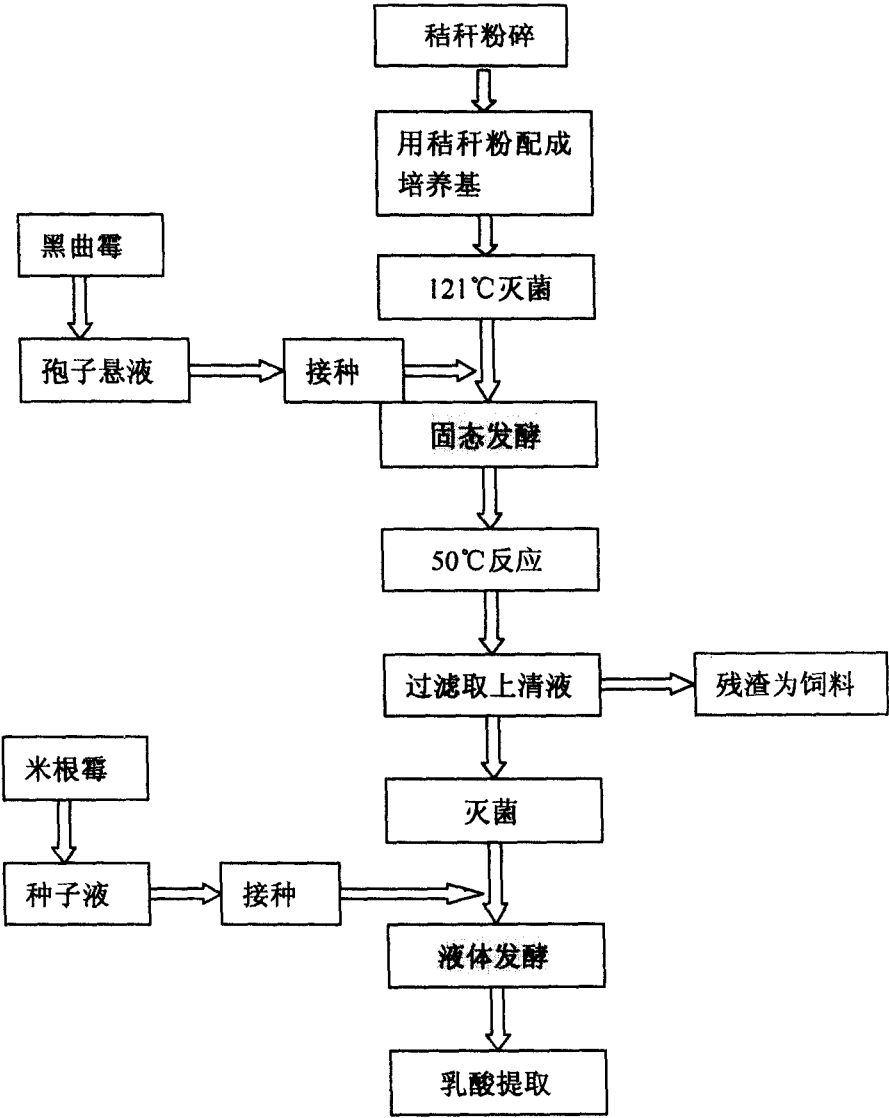


图 1