



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102776244 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201210212582. 0

(22) 申请日 2012. 06. 21

(71) 申请人 北京化工大学

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路 15 号

(72) 发明人 袁其朋 王乐 朱新涛

(74) 专利代理机构 北京思海天达知识产权代理有限公司 11203

代理人 刘萍

(51) Int. Cl.

C12P 7/18(2006. 01)

C08H 7/00(2012. 01)

C12R 1/74(2006. 01)

C12R 1/22(2006. 01)

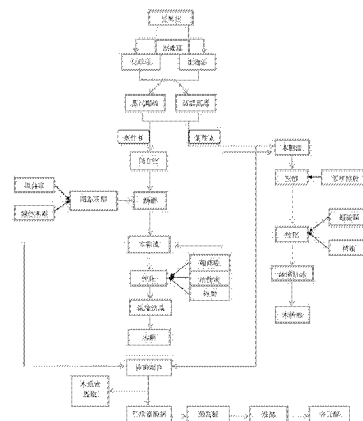
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

综合利用玉米芯等农林废弃物生产多元糖醇及木质素的工艺

(57) 摘要

综合利用玉米芯等农林废弃物生产多元糖醇及木质素的工艺属于生物化工领域,特别涉及一种综合利用玉米芯等农林废弃物原料,生产多元糖醇及木质素化合物的新工艺。本工艺通过对原料进行化学或生物法进行预处理后,采用高温蒸煮或蒸汽爆破的方式生产出木糖水解液,进而生产木糖产品,或者生物法生产木糖醇产品,同时充分利用原料中含有的纤维素和木质素成分,开发和生产出相应产品的工艺技术。



1. 综合利用玉米芯农林废弃物生产多元糖醇及木质素的工艺,其特征在於,包括以下步骤:

1). 粉碎至 10 目以下的农林废弃物采用稀酸浸泡的方式进行预处理,或者采用白腐菌或褐腐菌通过降解生物质中木质素的方式进行生物法预处理;

上述的浸泡方式所使用的浸泡液为稀硫酸、稀盐酸或者稀草酸中的一种,稀酸的质量分数为 0.1-0.5%,浸泡温度为 30~100°C,浸泡时间为 6~24h;浸泡处理完成后,将玉米芯抽滤并冲洗至 pH 大于 5;

将湿度控制在 50%~80% 的玉米芯中接入预先培养好的白腐菌或褐腐菌种子液,接种量为 0.5ml/g 玉米芯干重,固态发酵培养温度为 28°C,预处理时间为 14~40 天;

以下固液比没有特别说明,固体均以干重计;

2). 预处理后的玉米芯原料经过清洗,采用高温蒸煮或者蒸汽爆破的方式进行半纤维素的水解;每种方式按水解的剧烈程度又具体分为 A、B 两种反应条件,

高温蒸煮 A: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 120~150°C,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150rpm,水解完成后得到蒸煮混合物 A;

高温蒸煮 B: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 150~180°C,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150rpm,水解完成后得到蒸煮混合物 B;

蒸汽爆破 A: 蒸汽压力为 1~2MPa,维持压力时间为 2~8min;

蒸汽爆破 B: 蒸汽压力为 0.5~1MPa,维持压力时间为 2~8min;

3). 2) 中蒸汽爆破得到的固体以固液比例为 1g:1~5ml,水提温度 20°C~70°C,搅拌转速为 50~100rpm,分三次水提,合并得到固液混合物,按照蒸汽爆破 A、B 两种方式,不同分别记为固液混合物 A、固液混合物 B;

4). 采取固态发酵的方法生产富含木聚糖酶系的酶液,产木聚糖酶的菌株为黑曲霉、绿色木霉、里氏木霉中的一种;其中黑曲霉种子培养基采用查氏培养基,培养温度 30°C,振荡转速 100-150rpm,培养时间 72h,接入玉米芯固体培养基进行固态发酵产酶,其中固态培养基以玉米芯为碳源 20%~30%,尿素为氮源 0.5%~2%, KH_2PO_4 0.1%,其余为水,调节初始 pH=5.0,接种量为 0.05ml/g 玉米芯干重,培养 3-5 天后,采用 pH=5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸润固态发酵体系,50°C 振荡提取,过滤提得酶液;

5). 以 2) 中蒸煮混合物 B 或者 3) 中固液混合物 B 为底物,采用 4) 中的自制酶液进行酶解,酶解条件如下,酶液与底物的体积比为 1:50~100,酶解反应初始 pH=5.0,酶解温度为 45~50°C,搅拌转速为 30-60rpm,酶解时间为 8-10h,得到固液混合物 1;

6). 5) 中固液混合物 1 经过抽滤后,得到固体 1 和木糖液 1;2) 中蒸煮混合物 A 过滤后得到木糖液 2 和固体 2;3) 中固液混合物 A 过滤后得到木糖液 3 和固体 3;

7). 合并 6) 中 3 种木糖液用于纯化浓缩结晶制备木糖晶体;木糖液纯化采用活性炭脱色、离子交换树脂脱盐、膜过滤的两种或者三种;木糖液浓缩过程中,采用浓缩罐和旋转薄膜蒸发器二级浓缩,第一次在浓缩罐中减压条件下脱水至木糖浓度 20% 以上时送入旋转薄膜蒸发器中第二次脱水至木糖浓度 80% 以上直接进入结晶罐中结晶;结晶过程中,将浓缩到 80%~85% 的糖膏投入结晶机后加入糖膏中 1% 的无水乙醇,使无水乙醇夺取一定的水分而使糖膏达到过饱和,搅拌转速为 3~4rpm,以每小时 1°C 的降温速率降至 40~45°C,加入 1% 木糖粉末作为晶种,每小时 2~3°C 继续降温至 10°C,离心,晶体真空干燥;

8). 合并6)中3种木糖液用于生物法制备木糖醇,采用热带假丝酵母 *Candida tropicalis* As2.1776,按照菌种活化、扩大培养、发酵产醇流程顺序进行;得到的木糖醇发酵液经过滤后按顺序先采用超滤膜选择性的截留分子量在1~5kDa的大分子色素和蛋白质,再用阴阳离子交换树脂结合大孔吸附树脂脱色和脱盐;再应用NF-270进行纳滤浓缩,纳滤浓缩时的温度范围是30~50℃,操作压强为3~5Mpa,最后采用梯度程序降温的方式结晶产木糖醇,采取初始温度为60~75℃,终止温度为25~35℃,降温采取每小时1.0~2.0℃的方式,在45~50℃时加入固含量质量分数为0.1%的商品木糖醇和作为晶种,并在终止温度下养晶14~22h,过滤得到晶体真空干燥;

9). 合并6)中得到的三种固体进行碱液脱木素或采用乙醇抽提木质素的方式进行处理制得木质素,具体条件如下,碱液抽提:氢氧化钠的质量浓度为0.1%~0.5%,处理温度为80~100℃,处理时间为1~2h,过滤后得到纤维素残渣和木质素液,木质素液加入盐酸调节pH至5~6,木质素开始析出,继续加入盐酸至木质素析出完全,最后经分离干燥得到木质素;乙醇抽提:配制30~90%体积浓度的乙醇溶液,固体1与乙醇溶液的固液比例为1g:5~15ml,反应温度为180℃~240℃,反应时间为3~7小时,自然降温至50℃,过滤分离纤维素残渣和木质素液;以乙醇溶液洗涤固体残渣,收集洗涤液和木质素液,木质素液中加入蒸馏水,木质素自动析出,再次过滤收集木质素,室温下真空干燥;以上两种抽提方式获得的纤维素残渣用水洗至中性;

10). 9)处理后得到纤维素残渣,加入纤维素酶酶液,体积质量比例为3~5L:1Kg,酶液的酶活浓度为1000U/L,调节pH为4.5~5.5,酶解温度为50℃,搅拌转速为30~80rpm,酶解10~20h后获得葡萄糖液;

11). 10)中葡萄糖液通过生物法制备多元醇;以产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*ZU-03作为发酵菌株,发酵体系组成如下:纤维素酶解液葡萄糖浓度80,玉米浆60, K_2HPO_4 8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $FeSO_4$ 1, $CaCO_3$ 3,初始pH是6.0~6.5,发酵54~68h得到2-3丁二醇。

2. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述的农林废弃物是玉米芯,棉籽壳,玉米秸秆,高粱秸秆、小麦秸秆,稻秆,甘蔗渣或桦木。

综合利用玉米芯等农林废弃物生产多元糖醇及木质素的工艺

技术领域：

[0001] 本发明属于生物化工领域，特别涉及一种综合利用玉米芯等农林废弃物原料，生产多元糖醇及木质素化合物的新工艺。

背景技术：

[0002] 木质纤维素是地球上资源量最大的可再生资源和最主要的生物质资源，每年仅陆生植物产纤维素约 500 亿吨，木质纤维素占地球生物总量的 60%–80%。如何综合高效地利用这些生物质资源是一个关系到资源、环境、经济、能源等的重要课题。为解决这个问题，近年来主要西方国家及部分发展中国家都投入了大量人力和物力对纤维素资源转化进行了大量的研究开发工作，尤其是我国。来源丰富、品种多、再生时间短等是木质纤维素类资源的优点，这些植物纤维原料可望通过生物或者化学转化，生产葡萄糖单体、木糖单体、燃料乙醇、多元醇类以及小分子木质素等化工原料，进而把储量巨大的木质纤维素资源转化为人类的食品仓库、能源仓库和有机化工原料仓库。

[0003] 我国是一个农业大国，农林废弃纤维素类资源异常丰富，仅玉米芯一项每年产量就达 2 亿多吨，而且大部分被焚烧甚至掩埋而未被利用，造成巨大的资源浪费和环境污染问题。玉米芯等农林废弃物的主要成分是半纤维素、纤维素和木质素等木质纤维素类资源。纤维素的分子排列规则，聚集成束，从而构成细胞壁的构架。在纤丝构架之间充满了半纤维素和木质素。植物细胞壁的结构非常紧密，在纤维素、半纤维素和木质素分子之间存在着不同的结合力。纤维素和半纤维素或木质素分子之间的结合主要依赖于氢键；半纤维素和木质素之间除氢键外，还存在化学键的结合，因此，从木制纤维素原料中分离的木质素中含有少量的碳水化合物。半纤维素和木质素间的化学键结合主要在半纤维素分子支链上的半乳糖基和阿拉伯糖基与木质素之间。

[0004] 玉米芯中最容易被降解而且含量最多的的半纤维素目前最主要的应用是生产木糖以及木糖醇产品。虽然木糖是单糖的一种，但和人们日常食用的六碳糖葡萄糖及果糖不同，木糖不能为人体提供热量，但有增加人体肠道双歧杆菌等的某些特殊功能。另外木糖不被口腔内微生物所利用，具备膳食纤维的部分生理功能，可降低血清胆固醇的预防肠癌等，未来的应用前景广泛。而木糖醇作为一种重要的工业用精细化学品、糖基化学品、食品及饲料添加剂，具备许多优异特性，广泛用于化工、医药、皮革、国防、涂料、食品及饲料等行业。木糖醇是所有食用糖醇中，生理活性最好的品种。作为一种高效的功能性营养添加剂。它味甜低热，口感清凉，甜度与蔗糖相当，具有特殊的生理活性，易为人体吸收。在防龋齿、不增加血糖值、均显示出比山梨醇、麦芽糖醇、甘露醇等更为明显的优越性，因而应用广泛，尤其适用于糖尿病和肝炎患者的临床营养剂和治疗剂。

[0005] 采用高温蒸煮或蒸汽爆破的手段处理玉米芯中的半纤维素，使其降解获得木糖，发酵生产木糖醇，是一种对环境友好的生物炼制新工艺，具有良好的发展前景。玉米芯中半纤维素的含量较高，高温蒸煮和蒸汽爆破后可以得到木糖液，木糖液可以结晶制木糖，也可

以作为木糖醇发酵的直接底物。更难以被破坏的纤维素和木质素以固渣的形式被废弃,如何综合利用玉米芯,清洁和高效生产木糖和木糖醇的同时,科学与合理的处理和利用水解后的固渣,采取一定的生产工艺,以获得木质纤维素产品或木质素降解产物以及以纤维素降解产物葡萄糖为原料得到的高附加值多元醇产品也是本发明需要解决的问题。

[0006] 目前,纤维素主要用于纺织造纸。此外,以分离纯化的纤维素为原料,可以制造人造丝,赛璐玢以及硝酸酯、醋酸酯等酯类衍生物和甲基纤维素、乙基纤维素、羟甲基纤维素等醚类衍生物,用于塑料、炸药、电工及科研器材等方面。而在生物能源化工领域,以纤维素为原料,发酵生产燃料乙醇是比较热门的应用方向,另外纤维素酶解葡萄糖进而发酵生产多元醇也是纤维素的一个重要应用方向。

[0007] 多元醇是以农产品为原料,利用生物工程技术及物理化学方法联合生产的生化产品。发酵生产多元醇主要以玉米淀粉、糖类为起始原料,经加工生成 2 个以上羟基的醇,如六元醇(山梨醇、甘露醇、麦芽糖醇、异麦芽酮糖醇、淀粉糖浆氢化物等);五元醇(木糖醇、阿拉伯醇);四元醇(赤藓醇);三元醇(丙三醇);二元醇(乙二醇、丙二醇)等。大部分产品具有功能性,作为保健食品的配料广泛用于食品、化工等工业。根据有关资料,目前我国多元醇主要产品有山梨醇、麦芽糖醇、低聚糖醇、低聚异麦芽糖醇、赤藓糖醇、氢化淀粉糖浆、木糖醇、异麦芽酮糖醇、乳糖醇、甘露醇、乙二醇、丙二醇、甘油、丁二醇等 10 余种。以玉米为原料生物发酵生产多元醇较化工法生产更具优越性。(1)以淀粉、糖类为起始原料氢化还原生产多元醇,得率高于其他技术路线,比如,1 吨多淀粉能生产 1 吨山梨醇或麦芽糖醇;(2)生物合成的多元醇不仅安全卫生,而且有可降解性,是今后发展绿色环保型表面活性剂和可降解材料的起始原料;(3)玉米是可再生资源,较之以石油为原料化学合成多元醇更具竞争力。

[0008] 木质素是植物界中含量仅次于纤维素的第二丰富的天然高分子。相对于其它天然高分子,木质素具有更为复杂的组成及多级结构,是最难认识和应用的天然高分子之一。但是,木质素分子具有众多不同种类的活性官能基,兼具可再生、可降解、无毒等优点。目前,大多数类型的木质素因缺乏应用途径而只能被燃烧或废弃,因此急需通过适当的化学和物理方法,发现新的利用途径,变废为宝。在应用和研究较为活跃的木质素高分子材料领域,主要方法是通过化学反应如接枝共聚和物理共混将木质素与聚氨酯、聚烯烃、橡胶、聚酯、聚醚、纤维素、淀粉、大豆蛋白、聚乙烯醇等复合,改善木素与共混、共聚材料的相容性并提高材料的各种性能。木质素可以通过生物降解、化学降解、热降解的方法生产有机化工原料。从理论上讲,对木质素进行有控制的生物降解,可以由这一复杂的高聚物生产出目前从石油中制取的各种有用的苯酚类物质,如香草醛、丁香酸、苯酚等。这种办法一旦成功,将为今后的化学品生产开辟新的原料来源。

发明内容

[0009] 本工艺通过对原料进行化学或生物法进行预处理后,采用高温蒸煮或蒸汽爆破的方式生产出木糖水溶液,进而生产木糖产品,或者生物法生产木糖醇产品,同时充分利用原料中含有的纤维素和木质素成分,开发和生产出相应产品的工艺技术。

[0010] 综合利用玉米芯农林废弃物生产多元糖醇及木质素的工艺,其特征在于,包括以下步骤:

[0011] 1). 粉碎至 10 目以下的农林废弃物采用稀酸浸泡的方式进行预处理,或者采用白腐菌或褐腐菌通过降解生物质中木质素的方式进行生物法预处理;

[0012] 上述的浸泡方式所使用的浸泡液为稀硫酸、稀盐酸或者稀草酸中的一种,稀酸的质量分数为 0.1-0.5%,浸泡温度为 30~100°C,浸泡时间为 6~24 h;浸泡处理完成后,将玉米芯抽滤并冲洗至 pH 大于 5;

[0013] 将湿度控制在 50%~80% 的玉米芯中接入预先培养好的白腐菌或褐腐菌种子液,接种量为 0.5ml/g 玉米芯干重,固态发酵培养温度为 28°C,预处理时间为 14~40 天;

[0014] 以下固液比没有特别说明,固体均以干重计;

[0015] 2). 预处理后的玉米芯原料经过清洗,采用高温蒸煮或者蒸汽爆破的方式进行半纤维素的水解。每种方式按水解的剧烈程度又具体分为 A、B 两种反应条件,

[0016] 高温蒸煮 A: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 120~150°C,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150 rpm,水解完成后得到蒸煮混合物 A;

[0017] 高温蒸煮 B: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 150~180°C,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150rpm,水解完成后得到蒸煮混合物 B;

[0018] 蒸汽爆破 A: 蒸汽压力为 1~2MPa,维持压力时间为 2~8min;

[0019] 蒸汽爆破 B: 蒸汽压力为 0.5~1MPa,维持压力时间为 2~8min;

[0020] 3). 2) 中蒸汽爆破得到的固体以固液比例为 1g:1~5ml,水提温度 20°C~70°C,搅拌转速为 50~100rpm,分三次水提,合并得到固液混合物,按照蒸汽爆破 A、B 两种方式,不同分别记为固液混合物 A、固液混合物 B;

[0021] 4). 采取固态发酵的方法生产富含木聚糖酶系的自制酶液,产木聚糖酶的菌株为黑曲霉、绿色木霉、里氏木霉中的一种;以优选黑曲霉为例,种子培养基采用查氏培养基,培养温度 30°C,振荡转速 100-150rpm,培养时间 72h,接入玉米芯固体培养基进行固态发酵产酶,其中固态培养基以玉米芯为碳源 20%~30%,尿素为氮源 0.5%~2%, KH_2PO_4 0.1%,其余为水,调节初始 pH=5.0,接种量为 0.05ml/g 玉米芯(干重),培养 3-5 天后,采用 pH=5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸润固态发酵体系,50°C 振荡提取,过滤提得自制酶液。

[0022] 5). 以 2) 中蒸煮混合物 B 或者 3) 中固液混合物 B 为底物,采用 4) 中的自制酶液进行酶解,酶解条件如下,酶液与底物的体积比为 1:50~100,酶解反应初始 pH=5.0,酶解温度为 45~50°C,搅拌转速为 30-60 rpm,酶解时间为 8-10 h,得到固液混合物 1;

[0023] 6). 5) 中固液混合物 1 经过抽滤后,得到固体 1 和木糖液 1;2) 中蒸煮混合物 A 过滤后得到木糖液 2 和固体 2;3) 中固液混合物 A 过滤后得到木糖液 3 和固体 3;

[0024] 7). 合并 6) 中 3 种木糖液用于纯化浓缩结晶制备木糖晶体;木糖液纯化采用活性炭脱色、离子交换树脂脱盐、膜过滤等手段中的两种或者三种;木糖液浓缩过程中,采用浓缩罐和旋转薄膜蒸发器二级浓缩,第一次在浓缩罐中减压条件下脱水至木糖浓度 20% 以上时送入旋转薄膜蒸发器中第二次脱水至木糖浓度 80% 以上直接进入结晶罐中结晶;结晶过程中,将浓缩到 80%~85% 的糖膏投入结晶机后加入糖膏中 1% 的无水乙醇,使无水乙醇夺取一定量的水分而使糖膏达到过饱和,搅拌转速为 3~4rpm,以每小时 1°C 的降温速率降至 40~45°C,加入 1% 木糖粉末作为晶种,每小时 2~3°C 继续降温至 10°C,离心,晶体真空干燥;

[0025] 8). 合并 6) 中 3 种木糖液用于生物法制备木糖醇优选采用热带假丝酵母 *Candida tropicalis* As2.1776,按照菌种活化、扩大培养、发酵产醇流程顺序进行。得到的木糖醇

发酵液经过滤后按顺序先采用超滤膜选择性的截留分子量在 1~5 kDa 的大分子色素和蛋白质,再用阴阳离子交换树脂结合大孔吸附树脂脱色和脱盐;再应用 NF-270 进行纳滤浓缩,纳滤浓缩时的温度范围是 30~50℃,操作压强为 3~5 Mpa,最后采用梯度程序降温的方式结晶产木糖醇,采取初始温度为 60~75℃,终止温度为 25~35℃,降温采取每小时 1.0~2.0℃的方式,在 45~50℃时加入固含量质量分数为 0.1%的商品木糖醇和作为晶种,并在终止温度下养晶 14~22 h,过滤得到晶体真空干燥;

[0026] 9). 合并 6) 中得到的三种固体进行碱液脱木素或采用乙醇抽提木质素的方式进行处理制得木质素,具体条件如下,碱液抽提:氢氧化钠的质量浓度为 0.1%~0.5%,处理温度为 80~100℃,处理时间为 1~2h,过滤后得到纤维素残渣和木质素液,木质素液加入盐酸调节 pH 至 5~6,木质素开始析出,继续加入盐酸至木质素析出完全,最后经分离干燥得到木质素;乙醇抽提:配制 30~90% 体积浓度的乙醇溶液,固体 1 与乙醇溶液的固液比例为 1g:5~15ml,反应温度为 180℃~240℃,反应时间为 3~7 小时,自然降温至 50℃,过滤分离纤维素残渣和木质素液。以乙醇溶液洗涤固体残渣,收集洗涤液和木质素液,木质素液中加入蒸馏水,木质素自动析出,再次过滤收集木质素,室温下真空干燥。以上两种抽提方式获得的纤维素残渣用水洗至中性;

[0027] 10). 9) 处理后得到纤维素残渣,加入纤维素酶酶液,体积质量比例为 3~5L:1Kg,酶液的酶活浓度为 1000U/L,调节 pH 为 4.5~5.5,酶解温度为 50℃,搅拌转速为 30~80rpm,酶解 10~20h 后获得葡萄糖液;

[0028] 11). 10) 中葡萄糖液可通过生物法制备多元醇。以产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*ZU-03 作为发酵菌株,发酵体系组成如下:纤维素酶解液葡萄糖浓度 80,玉米浆 60, K_2HPO_4 8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $FeSO_4$ 1, $CaCO_3$ 3,初始 pH 是 6.0~6.5,发酵 54~68h 得到 2-3 丁二醇;

[0029] 所述的农林废弃物可以是玉米芯,棉籽壳,玉米秸秆,高粱秸秆、小麦秸秆,稻杆,甘蔗渣,桦木等,其中优选为玉米芯。

[0030] 所述步骤 1 中酸法浸泡预处理,优先采用操作容易,工艺简单的浸泡法来处理,能显著增大半纤维素的暴露程度,提高半纤维素的水解率,同时浸泡预处理过程能进一步清除中所含的部分胶质、色素等不可发酵物质。可以用于浸泡的溶液有硫酸溶液、草酸溶液,盐酸等。本发明优先采用浓度为 0.2% 质量分数的稀硫酸溶液,浸泡温度为 30℃,浸泡时间为 6h~24h,浸泡完成后,将玉米芯抽滤并冲洗至 pH 大于 4,抽滤所得浸泡液可以反复利用于下一批次的预处理;

[0031] 所述步骤 1 中采用白腐菌降解木质素的预处理,白腐菌是自然界中最有效的选择性降解木质素的高效菌株,它在含木质素的培养基上能够胞内合成并胞外释放以漆酶、赖锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶为主的木质素降解酶系,从而降解玉米芯中和半纤维素以氢键结合的木质素,使半纤维素更容易被高温水解而获得木糖。根据权利要求书的方法,在湿度控制在 60%~90% 的玉米芯中接入预先培养好的白腐菌种子液,接种量为 0.05ml/g 玉米芯(干重),静置培养温度为 28℃,预处理时间为 14-40 天;

[0032] 所述步骤 1 中白腐菌种子液的制备,特征在于菌种为黄孢原毛平革菌 40299,菌株购自中国工业微生物保藏中心,培养基配方为:马铃薯提取液 1L,葡萄糖 20g, KH_2PO_4 3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g,维生素 B10.05g,琼脂 20g,自然 pH。接种量控制在 1~5% (v/v),设定转速

为 200~250rpm,防止白腐菌菌丝体成团,28℃培养 3~4 天后即可用于生物预处理的接种。

[0033] 所述步骤 2 中,经过前处理和预处理后的玉米芯或棉籽壳等农林废弃物采取高温蒸煮的方法获得木糖,条件如下高温蒸煮 A: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 120~150℃,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150rpm 高温蒸煮 B: 固液比为 1:5~20,蒸煮温度为 150~180℃,蒸煮时间为 0.5~2h,搅拌转速为 80-150rpm 蒸煮水解完毕后,断开电源,收集固液混合物分别记为蒸煮混合物 A 和蒸煮混合物 B,缓慢打开排气装置使高温蒸汽从高温管路中排出至储罐为下一步原料蒸煮提供热能,并且蒸汽带走了一部分挥发性杂质,起到了除杂的效果;

[0034] 所述步骤 2 中,经过前处理和预处理后的玉米芯或棉籽壳等农林废弃物也可以采取蒸汽爆破的方法获得木糖,条件如下,蒸汽爆破 A: 采用稀酸法浸泡预处理过的玉米芯,蒸汽压力为 0.5~2MPa,维持压力时间为 2~8min, 蒸汽爆破 B: 采用水浸泡过的玉米芯,蒸汽压力为 0.5~2MPa,维持压力时间为 2~8min。未蒸汽爆破主要是利用高温高压水蒸汽处理纤维原料,并通过瞬间泄压过程实现原料的组分分离和结构变化蒸汽爆破过程中,高压热蒸汽进入纤维原料中,并渗入纤维内部的空隙。由于水蒸汽和热的联合作用产生纤维原料的类酸性降解以及热降解,低分子物质溶出,纤维聚合度下降。采用水浸泡可以使半纤维素和纤维素充分溶胀,利于蒸汽渗透进入木质纤维素的结构内部,压力瞬间释放的过程中,蒸汽迅速从缝隙中膨胀,产生爆破效果,从而破坏掉半纤维素结构产生小分子低聚木糖甚至是木糖,而采用稀酸浸泡的玉米芯,半纤维素被初步破坏,在蒸汽爆破的过程中更容易被酸性降解成木糖。

[0035] 所述步骤 3 中对爆破后玉米芯进行水提,固液比例为 1g:1~5ml,水提温度 20℃~70℃,搅拌转速为 50~100rpm,分三次水提,合并得到固液混合物,根据蒸汽爆破条件不同分别记为固液混合物 A、固液混合物 B;

[0036] 所述步骤 4 中固态发酵产酶,特征在于产木聚糖酶的菌株为黑曲霉、绿色木霉、里氏木霉中的一种,固态发酵培养基与气体的接触面积大,供氧充足能量消耗低,产物浓度高,没有大量有机废液产生。以优选黑曲霉为例,种子培养基采用查氏培养基,培养温度 30℃,振荡转速 100-150rpm,培养时间 72h,接入玉米芯固体培养基进行固态发酵产酶,其中固态培养基以玉米芯为碳源 20%~30%,尿素为氮源 0.5%~2%,KH₂PO₄0.1%,其余为水,调节初始 pH=5.0,接种量为 0.05ml/g 玉米芯(干重),培养 3-5 天后,采用 pH=5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸润固态发酵体系,50℃振荡提取,过滤提得酶液。

[0037] 所述步骤 5 中,特征在于,酶解底物是蒸煮混合物 B 或者固液混合物 B,酶液中主要是以 1,4-β-木聚糖酶和木糖苷酶为主的木聚糖酶系,可以将未完全降解的木聚糖、低聚木糖等酶解为木单糖,酶解条件如下,酶液与底物的体积比为 1:50~100,调节 pH=5.0,酶解温度为 45~50℃,酶解时间为 8-10h,搅拌转速为 30-60rpm 酶解后得到固液混合物 1。

[0038] 所述步骤 6 中,步骤 5 中固液混合物 1 经过抽滤后,得到固体 1 和木糖液 1;步骤 2 中蒸煮混合物 A 过滤后得到木糖液 2 和固体 2;步骤 3 中固液混合物 A 过滤后得到木糖液 3 和固体 3;

[0039] 所述步骤 7 中,木糖液纯化过程中,采用活性炭脱色、离子交换树脂脱盐、膜过滤等手段中的两种或者三种。其中活性炭处理的条件如下:木糖液的纯化过程中,首先活性炭脱色处理,采用粉状活性炭,活性炭加入量为 0.8g/L,搅拌转速为 180rpm,处理温度保持在

50℃,处理半小时后,趁热过滤,收取滤液;离子交换树脂处理的条件如下:经过活性炭初步脱色的木糖液由泵打入阴阳离子交换树脂柱,采用阳离子交换树脂 732,阴离子交换树脂 D201 串联的方式进行脱色脱盐处理,阳离子树脂和阴离子树脂的树脂柱径高比为 1:4.5,进料量为每小时 1~1.5 个柱体积,工作温度为室温,出料液的电导率控制在小于 $5\ \mu\text{s}/\text{cm}$;选用具有适宜截留量的膜,利用超滤技术,可较好地截留色素及胶质等杂质,提高木糖液的纯度,有利于离子交换过程的进行,从而提高木糖纯度。超滤是一种将溶液进行净化、分离或浓缩的膜分离技术,20 多年来发展迅速,已成为膜分离领域中最为广泛应用的品种之一。超滤具有设备体积小、结构简单、投资费用低和易于实施的特点。超滤膜过滤的条件如下:压力为 20~30 kPa,流量为 35~55 L/h,试验温度为 25~50℃。

[0040] 所述步骤 7 中,木糖液浓缩过程中,采用浓缩罐和旋转薄膜蒸发器二级浓缩,第一次在浓缩罐中减压条件下脱水至木糖浓度 20% 以上时送入旋转薄膜蒸发器中第二次脱水至木糖浓度 80% 以上直接进入结晶罐中结晶;结晶过程中,将浓缩到 80%~85% 的糖膏投入结晶机后加入糖膏中 1% 的无水乙醇,使无水乙醇夺取一定量的水分而使糖膏达到过饱和,搅拌转速为 3~4rpm,以每小时 1℃ 的降温速率降至 40~45℃,加入 1% 木糖粉末作为晶种,每小时 2~3℃ 继续降温至 10℃,离心,晶体真空干燥;

[0041] 所述步骤 8 中,根据权利要求书所述,采用木糖醇发酵菌株对木糖液进行生物转化,得到含有木糖醇的发酵液。

[0042] 本发明所述发酵产醇步骤包括以下内容:

[0043] (1)本发明所用的菌种主要来自 *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida spandovensis*, *Candida fragi*, *Candida utilis* 和 *Candida intermedia* 中的一种,优选热带假丝酵母 *Candida tropicalis* As2.1776 (原始菌株购买自中科院微生物所)。

[0044] (2)液体种子培养基的制备与菌种的活化。每升种子培养基成分包括:木糖母液 100~200 ml,酵母粉或蛋白胨 5~10 g,磷酸二氢钾或磷酸二氢钠 5~10 g,无水硫酸镁 0.5~5 g,pH 自然。将固体斜面保存的菌种挑去一环放入灭菌后的种子培养基中进行摇瓶培养。摇瓶装液量在 100~400 ml/l,摇床温度 25~35℃,摇床转速 100~300 rpm,培养时间 10~30 h。

[0045] (3)菌种的扩大培养。将摇瓶震荡培养好的种子按照 5~20% 的接种量接种到 5 L 灭菌后的种子罐中,培养基为液体种子培养基,通气量为 $1\sim 3\ \text{vv}^{-1}\text{m}^{-1}$,搅拌转速为 200~500 rpm,培养温度 25~35℃,培养时间 10~30 h。

[0046] (4)发酵培养基的制备与发酵培养。每升发酵培养基成分包括:木糖母液 400~600 ml,酵母膏或玉米浆 4~10 g,磷酸二氢钾或磷酸二氢钠 3~8 g,磷酸氢二铵或磷酸氢二钠 2~6 g,无水硫酸镁 0.4~4 g,pH 自然。将种子罐中培养好的种子按照 5~10% (v/v) 的接种量接种到 50 L 灭菌后的发酵罐中,培养基为发酵培养基,发酵温度 25~35℃,在发酵时间 0~30 h 内调节通气量为 $2\sim 4\ \text{vv}^{-1}\text{m}^{-1}$,搅拌转速为 500~1000 rpm,在发酵时间 20~60 h 内调节通气量为 $0\sim 2\ \text{vv}^{-1}\text{m}^{-1}$,搅拌转速为 100~300 rpm。

[0047] 所述步骤 8 中,根据权利要求书所述,木糖醇发酵液的固液分离,纯化,浓缩,结晶方式以及条件如下:

[0048] (1)固液分离得到发酵液的方法为沉降法或者过滤的方法。沉降法可以采用静置

或离心沉降的方式,过滤可以采用板框过滤、或滤布抽滤的方式。

[0049] (2) 采用膜技术对发酵液进行预处理,能够更有效地除去培养基中的大分子蛋白等有机物,还可以有效分离发酵液中的菌体等物质,分离过程中产品的损失率极低,而且分离过程清洁无污染,分离条件温和,能很好的保护产品的性质。不同的膜有不同的截留分子量以及膜性质,对产品选择性好,分离能耗低。按顺序先采用超滤膜选择性的截留分子量在 1~5 kDa 的大分子色素和蛋白质,再用阴阳离子交换树脂结合大孔吸附树脂脱色和脱盐,树脂选择强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 001*7,大孔强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂 D072、D061、D001-CC,强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 201*4,大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 D296、D201、D280,大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 D301 R、D392 等。优选阳离子树脂 D072、阴离子树脂 D296、D301 的 3 柱串联离子交换树脂对水解液进行脱盐脱色处理。树脂柱径高比为 1:4,树脂柱的材质为玻璃钢或碳钢塑料,进料量为每小时 1.3~1.5 个柱体积,工作温度为室温,出料电导率 $<5 \mu \text{ s/cm}$ 。

[0050] (3) 采用的浓缩方式为纳滤浓缩工艺。纳滤浓缩是利用合适的纳滤膜对蒸煮液进行选择性的浓缩同时还兼具部分脱盐的效果,以减轻后序离子交换的负担。从能耗方面考虑,工艺上蒸发浓缩能耗很大,大量的能耗也带来环境污染,纳滤浓缩可以大大降低蒸发的能耗,缩短蒸发的时间,提高产品品质。针对本工艺的研究内容为富含木糖的高温蒸煮液的浓缩处理,通过考察纳滤膜自身性质,包括膜的选择性、膜的通量及截留率、膜的稳定性,针对蒸煮液中主要物质木糖的分子量为 150 左右、离子的浓度 $<10 \mu \text{ s/cm}$ 、中性电价、溶液 pH 值在 6.0~8.0 等因素,选用了的纳滤膜的截留分子量为 200~300 Da 的三种水相纳滤膜,分别为 NF~200、NF~270 和 SPES1,并筛选出纳滤膜 NF~270 为该工艺最佳的纳滤膜。通过考察纳滤浓缩的具体操作条件,包括操作压力、操作温度、操作时间、料液流速与料液回收率等最终得出纳滤膜 NF-270 具有相对较大的通量为 $50.1 \sim 52.3 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$,截留率达到 97.0~97.3%,回收率为 96.7~97.0%。应用 NF-270 进行纳滤浓缩,通过响应面实验,确定纳滤浓缩时的温度范围是 30~50℃,操作压强为 3~5 Mpa。

[0051] (4) 采用梯度程序降温的方式结晶产木糖醇,采取初始温度为 60~75℃,终止温度为 25~35℃,降温采取每小时 1.0~2.0℃的方式,在 45~50℃时加入固含量质量分数为 0.1%的商品木糖醇和作为晶种,并在终止温度下养晶 14~22 h,过滤得到晶体真空干燥。

[0052] 所述步骤 9 中,固体物料采用碱溶酸析的方法将木质素分离出来,主要是造纸制浆工业中的碱法制浆技术。即使用烧碱或者是含 S 的碱性化合物在高温下蒸煮原料,木质素的化学键发生断裂,逐渐降解后,形成亲水的木质素盐后进入液相,从而与固相的纤维素分离。此时木质素以小分子的木质素盐形式存在于强碱性的“黑液”中,构成稳定的亲水性胶体溶液。通过加酸中和黑液,发生亲电取代反应,即 H^+ 取代 Na^+ ,破坏了碱木质素的胶体,生成难溶于水的木质素,从黑液中分离出来。具体条件如下,氢氧化钠的浓度为 0.1%~0.5%,处理温度为 80~100℃,处理时间为 1~2h,过滤后得到纤维素和木质素液,木质素液加入稀盐酸调节 PH 至析出木质素,最后经分离干燥得到木质素;纤维素残渣水洗至近中性。

[0053] 所述步骤 9 中,固体部分也可以采用有机溶剂高温高压处理抽提木质素,这是一种新型的木质素分离方法,是以有机溶剂替代碱性溶液处理生物质。有机溶剂在一定的温度和压力等条件下,主要对木质素中的 α -芳基醚和 β -芳基醚键进行催化裂解,形成木质素小分子,并将其溶解从而与纤维素分离。对反应后的液体加入一定体积的水后,木质素

的有机溶剂胶体溶液稳定性被破坏,木质素形成沉淀析出。本方法得到的木质素保留了较多的酚羟基,反应活性高,易于改性利用。使用的溶剂主要为乙醇、甲醇、乙二醇、醋酸、甲酸等有机物,可以通过蒸馏等方法回收循环利用,对环境影响小。由于不使用碱性物质,纤维素的剥皮反应不明显,纤维素的各项性质指标也比较高,而且可以改善纤维素的酶解性能。配制 30~90% 体积浓度的乙醇溶液,固液比例为 1g:5~15ml,反应温度为 180℃~240℃,反应时间为 3~7 小时,自然降温至约 50℃,过滤分离纤维素残渣和木质素液。以 50℃的 55% 乙醇溶液洗涤固体残渣,合并洗涤液和木质素液,加入 5 倍水解液体积的蒸馏水,木质素自动析出,再次过滤收集木质素,室温下真空干燥。纤维素残渣用水洗至中性。

[0054] 所述步骤 10 中,9 中得到的纤维素残渣用纤维素酶进行酶解,特征在于酶液与纤维素的体积质量比例为 3~5L:1Kg,控制酶液的酶活浓度为 1000U/L,调节 pH 为 4.5~5.5,酶解温度为 50℃,搅拌转速为 30~80rpm,酶解 10~20h 后获得葡萄糖液。

[0055] 所述步骤 11 中,10 中得到的葡萄糖液作为生产多元醇 2,3-丁二醇的底物,发酵生产 2,3-丁二醇的微生物有自然界中有很多细菌可以生产 2,3-丁二醇,包括产气气杆菌、解淀粉芽孢杆菌,地衣芽孢杆菌、多黏芽孢杆菌、多钻类芽孢杆菌、产气肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、肺炎克雷伯氏菌等。在这些细菌中,产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 和多黏芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 具有较好的应用前景,前者的优势在于可以利用广泛的底物利用范围,可以利用葡萄糖、木糖、糖蜜作为发酵的原料。优选产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*ZU-03 作为发酵菌株,发酵体系组成如下:纤维素酶解液葡萄糖浓度 80,玉米浆 60, K_2HPO_4 8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $FeSO_4$ 1, $CaCO_3$ 3,初始 pH=6.0。发酵生产 2,3-丁二醇的适宜初始 pH 是 6.0~6.5,单批发酵适宜的初始糖浓度为 80-100g/L,当初始总糖浓度为 80g/L,发酵 64h,糖的利用率可达 99.36%,2,3-丁二醇产率可达 0.468。

附图说明

[0056] 图 1 本发明流程图。

具体实施方式

[0057] 1. 玉米芯预处理实例

[0058] (1) 选择农林废弃物玉米芯为原料,对玉米芯进行粉碎至 10 目处理后,加入质量分数为 0.2% 的稀硫酸溶液,固液比为 1:4,浸泡温度为 30℃,浸泡时间为 24 小时,浸泡结束后,采用板框过滤的方式,对浸泡体系进行固液分离得到预处理后的原料与浸泡液,浸泡液可反复利用,固体原料水洗至接近中性。

[0059] (2) 在湿玉米芯中接入预先培养好的白腐菌种子液,保持 75% 的湿度,种子液与玉米芯的体积质量比为 0.05ml/g 玉米芯(干重),培养温度为 28℃,预处理时间为 40 天,其中木质素的含量减少了 40%,利于半纤维素的下一步降解;白腐菌种子液的培养基配方如下:马铃薯提取液 1L,葡萄糖 20g, KH_2PO_4 3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g,维生素 B10.05g,琼脂 20g,自然 pH,28℃,200rpm 培养 3 天。

[0060] 2. 木糖提取实例

[0061] (1) B 条件高温蒸煮,稀酸浸泡预处理后的固体原料玉米芯 5kg (干重) 加入高温反应釜内,加入 60L 水,密闭高压加热,温度设定为 145℃,70rpm 搅拌,维持此温度 2h。蒸

煮液中木糖的得率为 15.5%，含有未被完全水解的木聚糖以及低聚木糖等，故不进行固液分离，直接进入酶解过程。

[0062] (2) A 条件高温蒸煮，稀酸浸泡预处理后的固体原料玉米芯 5kg (干重) 加入高温反应釜内，加入 60L 水，密闭高压加热，温度设定为 175℃，70rpm 搅拌，维持此温度 2h。蒸煮水解完毕后，高温蒸汽从高温管路中排出至储罐；蒸煮液中木糖的得率为 25.7%，蒸煮后混合物通过传送管道运送到板框压滤机中，适合的蒸煮混合物的颗粒浓度为 10%，操作压力为 0.5MPa，板框为圆形，滤框直径为 1m，过滤面积为 50m²，板框压紧后，由供料泵将蒸煮混合物压入，在滤布上形成滤渣，直至充满滤室。滤液穿过滤布并沿滤板沟槽流至板框边角通道，集中排出，然后加入 50℃ 水 5L，对固体进行洗涤，重复洗涤 2 次，停机后卸除滤渣，清洗滤布，重新压紧板框，开始下一工作循环。木糖液进入木糖纯化结晶或者发酵产醇，滤渣水洗后进行木质素抽提过程。

[0063] (3) B 条件蒸汽爆破，水浸泡预处理后的固体原料玉米芯 1kg (干重)，加入蒸汽缸，密封缸体后，通入蒸汽，升压至 0.7MPa，维持压力 3min，开启排气阀，释放压力，瞬间蒸汽爆破，收集爆破后玉米芯及混合物并加入 2 倍体积水进入酶解过程。重复进行下一批次蒸汽爆破过程。

[0064] (4) A 条件蒸汽爆破，稀酸浸泡预处理后的固体原料玉米芯 1kg (干重)，加入蒸汽缸，密封缸体后，通入蒸汽，升压至 1.5MPa，维持压力 6min，开启排气阀，释放压力，瞬间蒸汽爆破，收集爆破后玉米芯及混合物，在进行下一批次蒸汽爆破过程。所得固体进行水提，第一次水提固液比例为 1:2，水提温度为 40℃，搅拌转速为 50rpm，板框过滤后得到水提液，固渣进行第二次水提，固液比例为 1:1，水提温度为 30℃，搅拌转速为 40rpm，板框过滤得到水提液，合并两次水提液，木糖得率为 23.6%，进入木糖纯化结晶或者发酵产醇过程。固渣部分水洗后进入木质素抽提过程。

[0065] 3, 黑曲霉固态发酵酶液酶解实例

[0066] (1) 黑曲霉固态发酵，玉米芯 25%，尿素含量 1.5%，磷酸二氢钾 0.1%，初始含水量为 70%，接种量为 0.05ml/g 玉米芯干重，培养 3-5 天后，采用 pH=5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液浸润固态发酵体系，过滤提取酶液。

[0067] (2) 黑曲霉种子培养，查氏培养基 121℃ 灭菌 30min，培养温度 30℃，振荡转速 150rpm，培养时间 72h；

[0068] (3) 酶液与底物的体积比为 1:100，调节 pH=5.0，酶解温度为 50℃，酶解时间为 8h，搅拌转速为 30rpm。

[0069] (4) 低压过滤得到酶解液进入木糖液纯化结晶或者发酵产醇过程。固渣清洗后进入木质素抽提过程。

[0070] 4, 木质素抽提实例

[0071] (1) 碱抽提方法实例

[0072] 氢氧化钠的浓度为 0.2%，处理温度为 100℃，处理时间为 2h，过滤后得到纤维素和木质素液，木质素液加入稀盐酸调节 pH 至析出木质素，最后经分离干燥得到木质素，木质素得率为 19%

[0073] (2) 醇抽提方法实例

[0074] 根据乙醇溶液的密度，准确配制 65% 体积浓度的乙醇溶液备用。称量一定质量的

固体物料加入水解釜中,按 1:10 固液比例加入乙醇溶液,拧紧水解釜盖,放入已经至 200℃ 的鼓风干燥箱中,设定反应时间为 5 小时,开始计时至反应结束,取出水解釜自然降至约 50℃,过滤分离残渣和水解液。以 50℃ 的 55% 乙醇溶液洗涤稻壳残渣,收集洗涤液和水解液后,加入 5 倍水解液体积的蒸馏水,木质素自动析出,再次过滤收集木质素,室温下真空干燥。木质素得率为 12%

[0075] 5, 纤维素酶解实例

[0076] 抽提木质素后的固渣水洗至中性,使用购买的纤维素酶进行酶解,配制酶液与纤维素的体积质量比例为 3L:1Kg,控制酶液的酶活浓度为 1000U/L,调节 pH 为 5.0,酶解温度为 50℃,搅拌转速为 80rpm,酶解 15h 后获得葡萄糖液。

[0077] 6, 葡萄糖液发酵产 2-3 丁二醇实例

[0078] 纤维素酶解液葡萄糖浓度 80,玉米浆 60, K_2HPO_4 8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $FeSO_4$ 1, $CaCO_3$ 3, pH=6.0。以上培养基均在 121℃ 下,灭菌 30min。发酵生产 2,3- 丁二醇的适宜初始 pH 是 6.0-6.5,单批发酵适宜的初始糖浓度为 80~100g/L,当初始总糖浓度为 80g/L,发酵 64h,糖的利用率可达 99.36%,2,3- 丁二醇产率可达 0.468。

[0079] 7, 木糖纯化结晶实例

[0080] (1) 木糖液的纯化过程中,首先活性炭脱色处理,采用粉状活性炭,活性炭加入量为 0.8g/L,搅拌转速为 180rpm,处理温度保持在 50℃,处理半小时后,趁热过滤,收取滤液;离子交换树脂处理的条件如下:经过活性炭初步脱色的木糖液由泵打入阴阳离子交换树脂柱,采用阳离子交换树脂 732,阴离子交换树脂 D201 串联的方式进行脱色脱盐处理,阳离子树脂和阴离子树脂的树脂柱径高比为 1:4.5,进料量为每小时 1.5 个柱体积,工作温度为室温,出料液的电导率控制在小于 $5 \mu s/cm$;

[0081] (2) 浓缩过程中,采用浓缩罐和旋转薄膜蒸发器二级浓缩,第一次在浓缩罐中减压条件下脱水至木糖浓度 20% 以上时送入旋转薄膜蒸发器中第二次脱水至木糖浓度 80% 以上直接进入结晶罐中结晶;

[0082] (3) 结晶过程中,将浓缩到 85% 的糖膏投入结晶机后加入糖膏中 1% 的无水乙醇,使无水乙醇夺取一定量的水分而使糖膏达到过饱和,搅拌转速为 4 转每分,以每小时 1℃ 的降温速率降至 44℃,加入 1% 木糖粉末作为晶种,每小时 2~3℃ 继续降温至 10℃,离心,晶体真空干燥整个结晶周期为 60 h,然后经离心分离,晶体洗涤,干燥得到结晶木糖。木糖结晶的回收率为 70%,木糖晶体纯度为 99%。;

[0083] 8, 木糖液发酵产木糖醇实例

[0084] (1) 菌种采用购买于中科院微生物保藏中心的热带假丝酵母 As2.1776,按照常规制备方法由斜面种子转接到含有木糖母液总糖 5%,酵母粉 1%,磷酸二氢钾 0.5%,无水硫酸镁 0.04% 的液体种子培养基中,摇瓶装液量 50 ml/250 ml,在 30℃,200 rpm 的摇床里培养 20 h 后,按 6% 的接种量接入到 5L 灭菌后的种子罐液体种子培养基中,调节无菌空气通气量为 $2 \text{ vv}^{-1} \text{ m}^{-1}$,搅拌转速为 300 rpm,30℃ 培养 22h。

[0085] (2) 发酵采用种子罐接种发酵罐的方式,通过蠕动泵将培养好的种子按 6% 的接种量接种含有木糖母液总糖 26% (其中木糖占 15%,葡萄糖占 5%,L-阿拉伯糖占 5%,其他杂糖占 1%),酵母膏 0.6%,磷酸二氢钾 0.3%,磷酸氢二铵 0.2%,无水硫酸镁 0.05% 的发酵培养基中,发酵罐装液量为 30 L/50 L,发酵温度 30℃。自接种后,每隔 5 h 取一次样,镜检观察

菌体细胞生长情况,有无染菌情况。发酵结束后,紫外分光光度计测定菌体浓度为 25~30 g/L, HPLC 测定其中木糖醇和木糖含量分别为 11.2% 和 0.5% (质量浓度)。

[0086] 9, 木糖醇纯化浓缩结晶实例

[0087] (1) 发酵液在 2.5 bar 的操作压力下,通过截留分子量在 30 KD 陶瓷膜错流过滤除菌装置,去除菌体及大分子物质,再在 8 bar 的操作压力下通过截留分子量在 3 KD 的超滤膜错流过滤除菌装置,去除小分子蛋白和部分色素。将膜透过液通过装填有阳离子树脂 D072、阴离子树脂 D296、D301 的 3 柱串联离子交换树脂,树脂上样流速为 1 L/h。定时收集树脂流出液,测定电导值,当电导值大于 200 us/cm,停止收集,得到发酵清液。树脂用 4% 的盐酸和氢氧化钠溶液反冲再生。用 HPLC 测定发酵清液中木糖醇和木糖含量分别为 11% 和 0.2% (质量浓度)。

[0088] (2) 将上述所得的木糖醇相和 L-阿拉伯糖相分别在 50°C,压强为 5 Mpa 下进行纳滤浓缩。其中所用的纳滤浓缩膜为亲水性并能高效截留木糖醇的水相膜 NF270;纳滤浓缩至木糖醇相的固形物含量在 800 g/L 左右。

[0089] (3) 将经浓缩后的木糖醇相升温至 70°C,使固形物充分溶解,再按照 3°C/h 的降温速率降温到 40°C,加入相当于木糖醇质量 1% 的品种育苗 0.5 h 后,再以 2°C/h 的降温速度降到 30°C,并在终止温度下养晶 18 h,结束结晶过程。离心将上清液与色谱系统分离出的木糖醇流分合并,重复浓缩结晶过程,离心得到的固体相用无水乙醇冲洗 2 次,然后在 60°C 烘箱内烘干, HPLC 检测产品木糖醇的纯度大于 99%,结晶收率大于 90%。

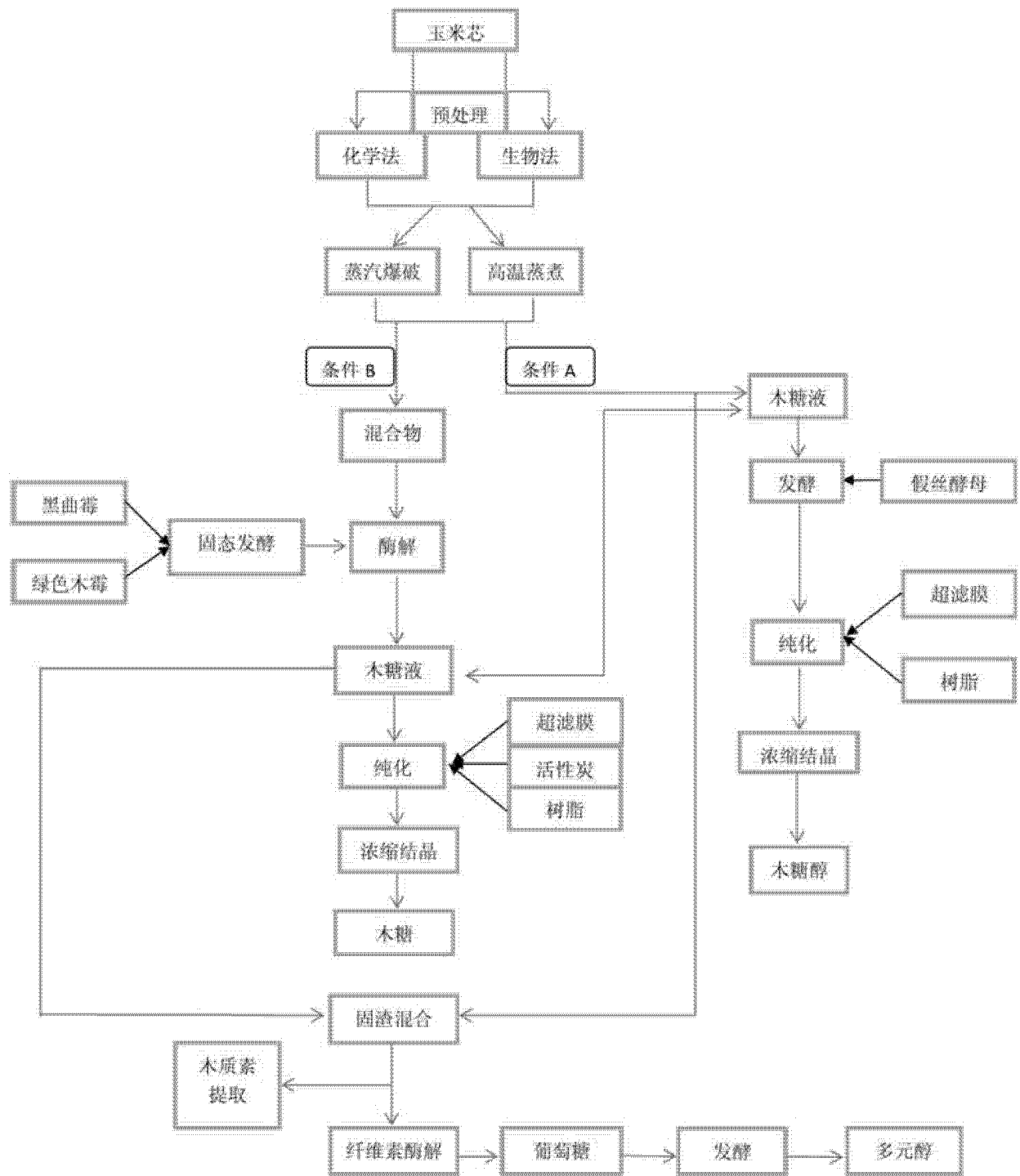


图 1