

[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 200510102929.6

[51] Int. Cl.

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12R 1/73 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1932002A

[22] 申请日 2005.9.14

[21] 申请号 200510102929.6

[71] 申请人 中国食品发酵工业研究院

地址 100027 北京市朝阳区霄云路 32 号

[72] 发明人 裴疆森 黄 玲

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘继富 顾晋伟

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

一种解脂假丝酵母菌及其生产赤藓糖醇的方法

[57] 摘要

本发明涉及微生物发酵领域，具体涉及高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母菌(Candida lipolytica)和利用该酵母菌株生产赤藓糖醇的方法，该方法包括：(a)在含葡萄糖的发酵培养基中对高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母进行发酵，以得到含有赤藓糖醇的发酵液；(b)从上述发酵液中分离纯化赤藓糖醇。

1. 一种高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*), 其保藏编号为 CGMCC No.1431。
2. 一种利用权利要求 1 所述的解脂假丝酵母生产赤藓糖醇的方法, 包括下列步骤:
 - (a) 在含葡萄糖的发酵培养基中对权利要求 1 所述的解脂假丝酵母进行发酵, 以得到含有赤藓糖醇的发酵液;
 - (b) 从上述发酵液中分离纯化赤藓糖醇。
3. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述的发酵培养基所含葡萄糖的浓度为 20%~50%。
4. 根据权利要求 2 或 3 的方法, 其中所述的发酵培养基还含有适当的有机氮源, 如 0.1%~4% 的酵母膏或蛋白胨或玉米浆、以及其他营养盐, 如 0~0.5% 的磷酸二氢钾, 0~1.5% 的柠檬酸铵及 0~0.5% 的硫酸镁。
5. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述的发酵在饱和氧分压为 5%~70%、温度为 25℃~37℃ 的条件下进行。
6. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述的主发酵期发酵液的 pH 控制在 3.0 以下的条件下进行。
7. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述的分离纯化赤藓糖醇包括将发酵液进行过滤、浓缩、结晶、脱色、除盐、再次浓缩和结晶。
8. 根据权利要求 7 的方法, 其中所述的脱色使用活性炭和纳滤膜进行。
9. 根据权利要求 7 的方法, 其中所述的除盐通过离子交换进行。
10. 根据权利要求 2-9 中任意一项的方法, 还包括回收菌体细胞、使之发生自发溶解并将溶解物用作发酵培养基配料的步骤。
11. 根据权利要求 2-9 中任意一项的方法, 还包括分离赤藓糖醇分离纯化所得母液中赤藓糖醇和残糖以使残糖返回发酵过程中的步骤。

一种解脂假丝酵母菌及用其生产赤藓糖醇的方法

发明领域

本发明涉及微生物发酵领域，具体涉及高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母和利用该酵母菌株生产赤藓糖醇的方法。

背景技术

由于赤藓糖醇在食品、医药、化妆品、化工等方面都有着广泛应用，对其需求正日益增加。在历史上，人们最早是从藻类、苔藓等植物来源中分离赤藓糖醇，但含量低、提取困难；继而出现了化学合成法，从2-丁烯-1,4-丁二醇合成赤藓糖醇，但成本高，转化率低，产物分离提纯困难无法等工业化实施；后来基本上都转而采用酵母发酵生产的方法生产赤藓糖醇了。

日本专利No. 4741549中公开了利用丝孢酵母属和假丝酵母属的酵母、以甘油作为碳源发酵生产赤藓糖醇的方法，日本专利No. 5121072公开了利用假丝酵母属、球拟酵母属和汉逊酵母属的酵母、以烷烃作为碳源发酵生产赤藓糖醇的方法，但这些方法都没有实现工业化。

已知以葡萄糖作为碳源生产赤藓糖醇的发酵菌株有丛梗孢酵母。日本从自然界分离了一株产赤藓糖醇的丛梗孢酵母，经对其进行化学和物理诱变技术的改造，得到发酵性能优良的菌株。在40~200m³发酵罐中，30%的葡萄糖培养液中发酵，pH5~pH6，34℃~38℃，通气搅拌，发酵8~10天，发酵液赤藓糖醇含量为17%左右，产率为47%。发酵液经过滤除掉菌体，滤清液经脱色脱盐等精制工艺，得到纯度99%以上的白色晶体产品。但是利用丛梗孢酵母、以葡萄糖为碳源的发酵技术所生产的赤藓糖醇成本较高，并且其中仍含有少量核糖醇和甘油和色素，对提高产品的纯度不利。由于发酵时间较长，pH控制得较高，所以发酵过程中污染杂菌的概率增加。

因此，需要以较低成本生产纯度更高的赤藓糖醇的方法。

发明内容

本发明通过提供一种高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母及使用该酵母菌株生产赤藓糖醇的方法，解决了现有技术中存在的上述技术问题。

因此，本发明的一个目的是提供一种高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母（*Candida lipolytica*），该酵母菌株已于2005年8月1日于地址为北京市海淀区中关村北一条13号（中国科学院微生物研究所，邮编：100080）的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提交保藏，保藏编号为CGMCC No.1431。

本发明的另一个目的是提供一种利用上述高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母生产赤藓糖醇的方法，该方法包括：

(a) 在含葡萄糖的发酵培养基中对上述的解脂假丝酵母进行发酵，以得到含有赤藓糖醇的发酵液；

(b) 从上述发酵液中分离纯化赤藓糖醇。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的发酵培养基所含葡萄糖的浓度为25%~50%。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的发酵培养基还含有适当的有机氮源，如0.1%~4%的酵母膏或蛋白胨或玉米浆、以及其他营养盐，如0~0.5%的磷酸二氢钾，0~1.5%的柠檬酸铵及0~0.5%的硫酸镁。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的发酵在饱和氧分压为5%~70%、温度为25~37℃的条件下进行。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的主发酵期发酵液的pH控制在3.0以下的条件下进行。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的分离纯化赤藓糖醇包括将发酵液进行过滤、浓缩、结晶、脱色、除盐、再次浓缩和结晶。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的脱色使用活性炭和纳滤膜进行。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，所述的除盐通过离子交换进行。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，还包括回收菌体细胞、使之发生自体溶解并将溶解物用作发酵培养基配料的步骤。赤藓糖醇发酵醪液中含有15~20%的菌体细胞。将该发酵醪液进行膜过滤，并将过滤分离出的菌体细胞于45~55℃下搅

拌 48 小时，使之催化发生细胞自体溶解反应，将该营养丰富的溶解物作为培养基配料用到发酵过程中。本发明中对发酵废菌渣加以回收利用，可以提高生产效率，减少对环境污染排放。

在本发明发酵生产赤藓糖醇的一个实施方案中，还包括分离赤藓糖醇分离纯化所得母液中赤藓糖醇和残糖以使残糖返回发酵过程中的步骤。赤藓糖醇精制过程中产生的母液粘度高，固形物含量为70%以上，赤藓糖醇只有0-30%。本发明设计了工艺以提高母液利用率，将母液稀释至含固形物含量为50%，经强酸性钙离子型柱分离出固形物中的赤藓糖醇和残糖组分，使赤藓糖醇得以回收，而残糖返回到发酵流程中。

因此，本发明的一个优点是：本发明中高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母克服了野生菌株产率低纯度低的缺点，通过发酵工艺优化调控目标产物的代谢流，可实现赤藓糖醇的高得率。

本发明的另一个优点是根据本发明方法生产的赤藓糖醇纯度高，为99.7%以上，不含上述杂糖醇类物质。

本发明的另一个优点是采用葡萄糖为原料，可以避免从石油带来的不可食的污染成分。

本发明的另一个优点是采用可以进行低 pH 的高酸性条件发酵的发酵菌种和发酵条件，可以显著降低发酵过程中污染有害野生杂菌的风险。

本发明的另一个优点是采用膜过滤技术提高了发酵液的提取收率，而不是采用传统的能耗、水耗较高的高成本色谱分离技术，因此大大降低了生产成本。

本发明的又一个优点是综合设计了赤藓糖醇发酵流程中的清洁生产和循环经济工艺，实现了发酵废菌渣和发酵母液的回收利用，进一步提高了生产效率，减少了对环境的污染排放。

本发明还有一个优点是采用微滤膜和纳滤膜相结合的产品提取精制工艺，减少了活性炭等的用量，减少产品的损失。

具体实施方式

下面通过具体的实施方案描述本发明的高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母菌的获得以及利用该菌株发酵生产赤藓糖醇的方法。除非特别指明，本发明中所用的实验方

法均为本领域技术人员所公知的方法。此外，实施方案应理解为说明性的，而不是要限制本发明的范围，本发明的实质和范围仅由权利要求书限定。对于本领域技术人员而言，在不背离本发明实质和范围的前提下，对这些实施方案中的培养基组分、含量、培养条件、分离提取条件进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

通过定向诱变技术产生高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母

通过对解脂假丝酵母（CICC No. 1675）进行定向诱变来产生高产赤藓糖醇的菌株。所述的定向诱变技术是将一定浓度的酵母细胞悬液用物理方法和化学诱变剂反复处理，包括用 15w 紫外灯在 30cm 距离处室温下照射 20~40 分钟，并用亚硝基胍 100~200ppm 室温下处理 30~40 分钟，在含 30%木糖醇/5%葡萄糖的高渗透压培养基上筛选出快速生长变异株。使用所得变异株以 40%葡萄糖作为碳源进行发酵，液相色谱分析赤藓糖醇含量，最终选出高产赤藓糖醇的解脂假丝酵母。

该酵母菌培养于平板（30℃）4 天，菌落可长到 1~2 毫米。初期菌落呈光滑状，经过延长的培养菌落会出现皱褶。在固体或液体的培养基上生长时，细胞形态呈圆形或卵圆形，有时细胞也会拉长呈类似假丝状生长，细胞大小约为 4~6×6~8 微米。该酵母菌株已于 2005 年 8 月 1 日于地址为北京市海淀区中关村北一条 13 号（中国科学院微生物研究所，邮编：100080）的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提交保藏，保藏编号为 CGMCC No.1431。

解脂假丝酵母发酵工艺的优化

将菌株在三角瓶摇瓶发酵条件下研究培养基成分的配比。葡萄糖为碳源，适合的浓度在 25%—40%（w/v）；氮源包括有机无机含氮化合物，如铵盐、尿素、蛋白胨、酵母膏、玉米浆和麸皮；无机盐包括镁、钾、铁等的磷酸盐和硫酸盐；微量矿物元素如锰、铜、锌；生长因子如维生素、氨基酸。研究上述培养基组分及浓度对于菌株的赤藓糖醇发酵含量和转化率的影响，获得菌株生产赤藓糖醇的最佳培养配方。

大规模的赤藓糖醇发酵是通过将酵母培养物从斜面→三角瓶摇瓶→500 升罐→5 吨罐→50 吨罐进行逐级扩大实现的。发酵过程中利用计算机自动控制系统对包括溶氧水平、温度、罐压、搅拌速度、泡沫和液位进行连续监控，以使菌体浓度、活力以及原料和中间代谢物水平维持在最佳范围内，从而缩短发酵时间、提高产物浓度和转化率，同时控制发酵动力输入和平均降温负荷至最低水平。

培养基组分和发酵条件的上述优化过程是本领域技术人员易于根据实验结果和经验确定的, 其中优选的培养基组分和发酵条件如下:

斜面培养基组分为: 葡萄糖 30%、酵母膏 1.5%、琼脂粉 1.5%;

三角瓶培养基组分为: 葡萄糖 30%、酵母膏 1.5%;

种子罐培养基组分为: 葡萄糖 20%、酵母膏 1%、磷酸二氢钾 0.1%、硫酸镁 0.7%、氨 0.1%、柠檬酸 0.4%;

发酵培养基组分为: 葡萄糖 35%、酵母膏 1.0%、磷酸二氢钾 0.1%、柠檬酸铵 0.7%、硫酸镁 0.05%;

发酵条件为: 搅拌转速 200r.p.m、风量 30m³/h、溶解氧 20%、罐压 0.5atm、温度 30~31℃;

经过 96 小时左右的发酵, 残糖可达 0.2%以下, 发酵液中的赤藓糖醇浓度可达 17%以上。

赤藓糖醇的提取

赤藓糖醇提取工艺包括以下步骤:

过滤: 发酵液用孔径为 0.1 微米的锯齿膜过滤机进行过滤, 收集滤液, 浓缩液加水透析, 直到残留产品浓度降至很低, 菌体也得到浓缩以便于综合利用。

浓缩/结晶: 滤液在减压条件下浓缩至原体积 20%, 送入结晶罐, 冷却结晶。晶浆通过离心机分离出母液, 粗结晶进行脱色精制。母液经过纳滤膜处理后进行重复浓缩或再次浓缩结晶得到二次和三次结晶。

脱色: 粗结晶加水溶解后加入 0.5%的活性炭, 搅拌升温, 于 80℃下保持 30 分钟, 进入板框回流过滤直至滤液澄清;

除盐: 将样液以 20 升/升树脂/小时的流速通过阳离子交换柱和阴离子交换柱;

浓缩: 在减压浓缩罐中于 65℃将料液浓缩至固形物含量 70%以上;

结晶: 结晶罐中以一定的降温速度缓慢达到 10℃以下, 直至晶粒成熟。

下面通过优选的实施例来说明本发明中发酵生产赤藓糖醇的各个方面。

实施例 1

在 5 吨发酵罐中, 投入含培养基的料液 3.5 吨, 所述培养基配比如下: 葡萄糖 900 公斤、酵母膏 21 公斤、磷酸二氢钾 3 公斤、硫酸镁 1.5 公斤、硫酸铵 20 公斤。

接种量 10%，搅拌转速 200r.p.m，风量 30m³/h，溶解氧 20%，罐压 0.5atm，温度 30℃~31℃，发酵时间 132 小时，其中，在 24 小时后，发酵液的 pH 被控制在 2.6~2.9 之间，所得发酵液中赤藓糖醇 15.4%，残糖低于 0.5%，糖醇转化率为 47%。将发酵液进行膜过滤，滤掉固形菌渣，将滤液用活性炭脱色，经离子交换柱脱盐，在减压条件下于 65℃将料液浓缩至赤藓糖醇含量为 60%以上，在结晶罐中结晶，所得晶体熔点为 121℃，有甜味，高压液相色谱以标准样品做参比分析确定结晶产品是赤藓糖醇。

实施例 2

本实施例采用较为廉价的玉米浆替代酵母膏，并简化培养基组分来降低发酵培养基成本。在 5 吨发酵罐中，投入含有培养基的料液 3.5 吨，所述培养基配比如下：葡萄糖 1120 公斤、玉米浆 157.5 公斤、氯化铜 35 克。接种量 10%，搅拌转速 200r.p.m，风量 30m³/h，溶解氧 20%，罐压 0.5atm，温度 30℃~31℃，发酵时间 130 小时，所得发酵液中赤藓糖醇为 15.3%，残糖低于 0.5%，糖醇转化率为 45.4%。将发酵液进行膜过滤，滤掉固形菌渣，将滤液用活性炭脱色，经离子交换柱脱盐，在减压条件下于 65℃将料液浓缩至赤藓糖醇含量为 60%以上，在结晶罐中结晶，所得晶体熔点为 121℃，有甜味，高压液相色谱（HPLC）以标准样品做参比分析确定结晶产品是赤藓糖醇。

实施例 3

本实施例采用回收的酵母经过自溶替代商品酵母膏，可使培养基成本显著降低，同时减少含有固体杂质的废水的排放，起到改善环境的效果。取新鲜酵母泥（含水率为 80%），用 1mol/l 的氢氧化钠溶液调整 pH 为 6.5~7.5，于 45~55℃下保温 24~48 小时，过滤后回收滤液。在 5 吨发酵罐中，投入含有培养基的料液 3.5 吨，所述培养基配比如下：葡萄糖 1120 公斤、固形物含量 7% 的酵母自溶物 500 公斤、磷酸二氢钾 1.05 公斤、硫酸镁 0.7 公斤、氨 3.5 公斤、氯化铜 35 克。灭菌后接种，接种量 10%，搅拌转速 200r.p.m，风量 30m³/h，溶解氧 20%，罐压 0.5atm，温度 30℃~31℃，发酵时间 120 小时，所得发酵液中赤藓糖醇为 16.2%，残糖低于 0.5%，糖醇转化率为 46.3%。将发酵液进行膜过滤，滤掉固形菌渣，将滤液用活性炭脱色，经离子交换柱脱盐，在减压条件下于

65℃将料液浓缩至赤藓糖醇含量为60%以上，在结晶罐中结晶，所得晶体熔点为121℃，有甜味，高压液相色谱（HPLC）以标准样品做参比分析确定结晶产品是赤藓糖醇。

实施例4.

赤藓糖醇发酵液总体积为31m³，赤藓糖醇浓度为156kg/ m³，总赤藓糖醇量为4836kg。经过膜过滤除菌后，得到透析液体积为45 m³，赤藓糖醇含量为107 kg/m³；浓缩液体积为6.0m³，残留赤藓糖醇含量为7.6kg/m³；过滤的回收率为99%。浓缩结晶过程中，经过3次结晶共回收2860kg、1261kg和455kg的赤藓糖醇，回收率为95%。经过溶解脱色和离子交换后进行再次结晶，共得到含量为99.7%以上的成品3275kg；母液中残留赤藓糖醇1182kg，总回收率为98%。各步骤的总综合回收率为92.2%。

实施例5.

将含有20%赤藓糖醇，以及约50%可溶性杂质的结晶母液，稀释至固形物含量为50%，加热至80℃，按30%的树脂体积的液量以顺流方式加入装填有钙型磺酸型阳离子交换树脂的交换柱中。然后用同样温度的无离子水进行洗脱，连续监测流出液中的组分情况，前期流出的料液中含有较多的盐类，被丢弃；中期的组分中含有较多的未发酵糖类和含氮物质，收集后用于发酵培养基的配制；后期的级分中含有较多的赤藓糖醇，被返回到结晶阶段进行回收结晶，回收情况如下表1所示。

表 1. 钙型磺酸型阳离子交换树脂色谱法回收结晶母液中赤藓糖醇

	料液体积 [树脂床体积(%)]	总固形物 (%)	赤藓糖醇 含量(%)	占总固形物 比例(%)	总赤藓糖醇回收比例 及处置方法
加样量	30%	49	10.5%	21.5	100%
流出液					
级分1	40%	0	0	0	高盐分级分，丢弃。
级分2	10%	11.2	0	0	
级分3	10%	15	0	0	
级分4	10%	17.1	0.45	0.045	低赤藓糖醇级分回收， 用于发酵培养基配制。
级分5	10%	20.2	1.53	0.153	
级分6	10%	21.5	3.86	0.25	高赤藓糖醇级分回收， 总回收率为81.8%。
级分7	10%	21.5	6.45	0.38	

级分8	10%	18	8.31	0.4	
级分9	10%	9.3	6.75	0.3	
级分10	10%	4.4	2.8	0.28	高杂质部分，放弃。
级分11	10%	2.2	1.21	0.121	
级分12	10%	1.2	0	0	
级分13	10%	0.9	0	0	
级分14	10%	0.5	0	0	