

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012年11月29日 (29.11.2012)



WIPO | PCT



(10) 国际公布号
WO 2012/159446 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 23/00 (2006.01) *A61P 3/02* (2006.01)
A23L 1/303 (2006.01) *C07C 403/24* (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01) *C12N 1/14* (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/000655
- (22) 国际申请日: 2012年5月15日 (15.05.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110132328.5 2011年5月20日 (20.05.2011) CN
- (71) 申请人(对除美国外的所有指定国): 浙江医药股份有限公司新昌制药厂 (ZHEJIANG MEDICINE CO., LTD. XINCHANG PHARMACEUTICAL FACTORY) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 许新德 (XU, Xinde) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。 焦明庆 (JIAO, Mingqing) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。 邵东 (SHAO, Dong) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。 邵斌 (SHAO, Bin) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。 虞雷明 (YU, Leiming) [CN/CN]; 中国浙江省新昌环城东路59号, Zhejiang 312500 (CN)。
- (74) 代理人: 北京乾诚五洲知识产权代理有限公司 (FAITHFUL&WATSON INTERNATIONAL IP LAW OFFICE); 中国北京市西城区北三环中路甲29号3号楼A-1101室, Beijing 100029 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING NATURAL β -CAROTENE BY FERMENTATION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种发酵法生产天然 β -胡萝卜素的方法和应用

(57) Abstract: Provided are a method for producing and purifying β -carotene by *Blakeslea trispora* fermentation and use thereof. The method comprises the following steps: a) separately inoculating the *Blakeslea trispora* strains onto a PDA culture medium so as to obtain a spore suspension; b) propagating spores in a seeding tank so as to obtain seeds for fermentation; c) inoculating the seeds for fermentation onto a fermenter and fermenting said seeds; d) by using an organic or inorganic base, adjusting the fermentation liquid to be basic, and filtering so as to obtain wet mycelia; e) treating the wet mycelia with a hydrophobic non-polar organic solvent; f) mixing the wet mycelia with an organic solvent of ester and obtaining a concentrated solution by extracting; g) adding a saturated monohydric alcohol into the concentrated solution, and filtering and crystallizing so as to obtain pure β -carotene. The content of the β -carotene in the present invention exceeds 96%, and the yield is above 81%.

(57) 摘要: 本发明提供一种通过三孢布拉霉发酵生产并提纯 β -胡萝卜素的方法及其应用, 该方法包括以下步骤: a) 将三孢布拉霉菌株分别接种到PDA培养基上, 得到孢子悬浮液; b) 孢子在种子罐中繁殖成发酵用种子; c) 将发酵用种子接种到发酵罐中进行发酵; d) 用有机碱或无机碱调节发酵液为碱性, 经过滤得湿菌丝体; e) 疏水性非极性有机溶剂处理湿菌丝体; f) 用酯类有机溶剂与湿菌丝体混合, 经萃取得到浓缩液; 和 g) 向浓缩液中加入饱和一元醇, 过滤结晶得到纯 β -胡萝卜素。本发明的 β -胡萝卜素的含量达96%以上, 收率在81%以上。



WO 2012/159446 A1

说明书

一种发酵法生产天然 β -胡萝卜素的方法和应用

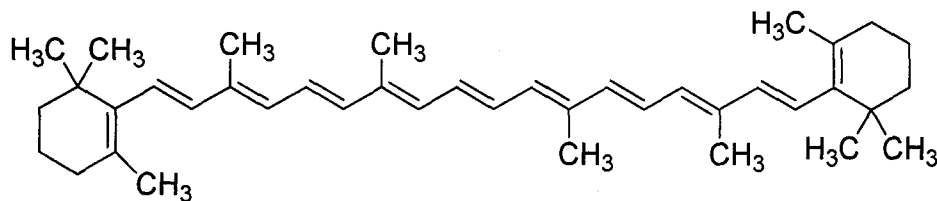
技术领域

本发明利用微生物发酵生产 β -胡萝卜素, 包括发酵方法的改进及 β -胡萝卜素的提取纯化方法, 属于生物化工领域。

发明背景

类胡萝卜素是自然界中发现最多且分布广泛的一类色素物质, 类胡萝卜素化合物广泛应用于食品、化妆品、药品等的着色, 近年来, 研究发现类胡萝卜素对预防、延缓和治疗某些疾病, 提高机体免疫力方面具有较好的疗效。

β -胡萝卜素是一种重要的类胡萝卜素, 其化学式 $C_{40}H_{56}$, 分子量 536.88, 由四个异戊二烯双键首尾相连而成, 主要由全反式、9-顺式、13-顺式及 15 顺式四种形式, 分子结构式如下:



在其分子结构的两端各有一个 β -紫罗酮环, 此 β -紫罗酮可能以异构性、取代型、开环形式的形式存在。

β -胡萝卜素具有重要的生理功能, 可以作为维生素 A 的前体, 是联合国粮农组织和世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会认定的

A 类营养食品强化剂。有研究表明 β -胡萝卜素作为维生素 A 的前体具有抗氧化、影响繁殖和甲状腺功能等作用。 β -胡萝卜素分子中的多个双键，在光、热、氧气及活泼性较强的自由基离子存在下，易被氧化，从而起到抗氧化的作用，保护机体不被破坏。除此之外研究还表明 β -胡萝卜素还具有增强免疫力，提高人体抗癌能力；促进细胞间的连接与交流；抗尼古丁作用等。

β -胡萝卜素具有全化学合成和天然来源。全化学合成法得到的 β -胡萝卜素由于可能存在着一些化学中间体杂质，近年来，人们越来越偏向于天然来源的 β -胡萝卜素，而天然来源的 β -胡萝卜素往往又有三种生产方法，分别是天然植物中提取，通过盐藻养殖得到以及通过微生物发酵法生产。通过从胡萝卜等含微量 β -胡萝卜素蔬菜中提取、分离，可获得一定量的天然 β -胡萝卜素，采用这种方法生产的不足很显然是耗费原料多、产量低。第二种方法是通过大面积养殖盐藻获得，如大面积养殖杜氏盐藻，通过溶剂萃取法获得，但是盐藻养殖受外界环境条件的严格限制，使其规模很难壮大，远远不能满足市场需求。第三种方法是通过微生物发酵法生产，采用这种方法生产天然 β -胡萝卜素因不受环境条件限制、产量高、易于实现工业化生产而受到重视，有越来越多的研究机构和生产厂家投入到这方面的研究中去。国内外用于生产天然 β -胡萝卜素的微生物菌种主要有分支杆菌、红酵母等，但应用最为广泛的还是丝状真菌，如三孢布拉霉、好食脉孢霉等，其中又以三孢布拉霉应用为多。

应用三孢布拉霉生产天然 β -胡萝卜素一般是通过其两种菌株如(+)

和(-)菌株进行混合发酵生产的，其具体的代谢途径在先前文献 WO 00/77234, Caglioti L. et al. (1966)中有较为详尽的描述，在近阶段的研究中主要集中于如何改变发酵条件或添加前体物质以提高发酵单位，以及如何有效地从发酵菌丝体中分离得到高质量的 β -胡萝卜素纯品。较多的专利文献中有这方面的报道，并提出了很多改进措施，但这些措施或者生产工艺中往往存在着这样或那样的技术缺陷，或者由于发酵单位低以至成本高，不利于工业化生产；或者没有采用合适的方法，不仅使提取纯化 β -胡萝卜素的工艺复杂，而且使发酵得到的胞内产物不易被提取完全；或者在提取纯化过程中用到毒性较大的有机溶剂，存在食用安全风险；或者得到的 β -胡萝卜素含量不高，存在较多的杂质。

U.S. Patent 3,752,740 通过在培养基中添加 7.5%的柠檬酸，应用三孢布拉霉发酵生产天然 β -胡萝卜素，但最终发酵液中发酵单位很低，不适于工业化生产。

U.S. Patent 7,252,965 中公开了对三孢布拉霉的筛选优化，并在发酵过程中通过添加前体物质 β -紫罗兰酮和强制增大溶解氧等措施以增加发酵液中 β -胡萝卜素的产量，最终发酵液中 β -胡萝卜素单位可达 9g/l，此工艺中并未涉及到任何从菌丝体中提取 β -胡萝卜素的过程。

CN1,193,048 A 中提供了一种在气升式发酵罐中培养丝状真菌发酵制备 β -胡萝卜素的工艺。其过程包括一级种培养和二级种培养及发酵过程。其 PDA 培养基由葡萄糖、马铃薯和琼脂培养基组成，二级种培养和发酵培养时培养基组成为淀粉、葡萄糖、淀粉、玉米浆、磷

酸氢二钾、硫酸镁、盐酸硫酸胺、植物油等。此工艺中只是通过设备方面的改进来改善溶氧，发酵液中单位低，而且浸提时用到大量如正己烷等毒性较大的有机溶剂。

EP1,306,444 B1 中涉及一种应用三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素并从菌丝体中提取 β -胡萝卜素的方法。在发酵过程中需要添加卵磷脂及分阶段调节发酵液 pH，而在提取纯化 β -胡萝卜素过程中要经历多个步骤如醇类精制过滤后的菌丝体，干燥并粉碎菌丝体，有机溶剂萃取，浓缩浸提后的有机溶剂，加醇类溶剂结晶，过滤并干燥等。此工艺特别是 β -胡萝卜素的提取纯化方法十分复杂繁琐，要涉及至少三次干燥和粉碎步骤，分别为精制后湿菌丝体干燥和粉碎，提取后 β -胡萝卜素纯品干燥及粉碎及 β -胡萝卜素提取完成后菌丝体残渣的干燥。同样也就必然涉及到三次粉状物料的转移过程，这在工业化生产中会带来一系列设备和技术上的额外要求，而且两次受热干燥过程对 β -胡萝卜素这种受热时不稳定的物质来说是十分不利的，会使最终产物的收率降低。另外，菌丝体的粉碎过程一方面会增加工序，另一方面粉碎过程产生的微粉对职业健康来说也是不利的。

总之，这些现有技术中往往存在着工艺复杂，不适合工业化生产等方面的缺陷，有必要找到一种方法使通过三孢布拉霉高产量地生产 β -胡萝卜素，并且运用一种有效的方式将孢内发酵产生的 β -胡萝卜素方便地提取出来，本专利就揭示了一种通过培养三孢布拉霉高收率地得到天然 β -胡萝卜素的方法。

发明内容

本专利涉及一种改进的方法，运用丝状真菌特别是三孢布拉霉生产 β -胡萝卜素及其提取纯化过程。

在丝状真菌特别是三孢布拉霉发酵培养生产 β -胡萝卜素的过程中，为了提高发酵液中 β -胡萝卜素的单位，往往采取两种方法，一种是在培养基中添加前体物质，另一种就是尽量增加溶氧。因为丝状真菌生产 β -胡萝卜素是有氧发酵，所以增加培养基中氧的浓度是非常必要和有益的，通常采取的措施是改变发酵罐的搅拌形态或加快搅拌速度，和强制通氧，但这些措施效果也不是很理想，不仅增加能耗，而且搅拌速度加快会使生长的菌丝体断裂，生物量下降，带来负面效果。

目前有较多的报道认为在培养基中添加植物油能增加 β -胡萝卜素的发酵单位，但添加植物油时一个问题就是由于植物油是脂溶性的，其在水基质的培养基中不能很好地分散，导致植物油的利用率不高，另一方面，植物油的大量加入会减少培养基中氧的浓度，这又会降低最终发酵液中 β -胡萝卜素的浓度。在培养基中加入一定量的乳化剂能使植物油较好地分散于水基培养基中，但乳化剂的大量加入可能会使发酵时泡沫较多，给操作带来不便。

本发明找到了一种方便的方法使加入到水基培养基中的植物油能较好地分散，同时能加大培养基中氧的浓度。

本发明提供了通过三孢布拉霉发酵生产并提纯 β -胡萝卜素的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 将三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株分别接种到 PDA

培养基上，在 25-30℃条件下培养 48-60 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液；其中，三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*) “+” “-” 菌株购自 ATCC，编号分别为 ATCC 14271 (+)，ATCC 14272 (-)；

b) 上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中在 pH=6.3~6.8 和培养温度 25-30℃下培养繁殖成发酵用种子；其中的种子培养基组成包括：玉米淀粉、葡萄糖、植物油、盐酸硫胺素、硫酸镁、乳化剂；

c) 将步骤 b)的种子罐中所述发酵用种子接种到发酵罐中在 pH=6.5~6.8 和培养温度 27-30℃下发酵培养生成发酵液；其中，接种前培养基经过胶体磨高速剪切乳化，发酵罐的培养基组成包括：玉米淀粉、玉米浆、粕饼粉、植物油、磷酸氢二钾、硫酸镁、盐酸硫胺素、和/或乳化剂；

d) 向步骤 c)的所述发酵液中加入有机碱或无机碱调节发酵液为碱性 pH=8.0~8.5，过滤得到湿菌丝体；

e) 在温度 0℃~60℃下用疏水性非极性有机溶剂处理步骤 d)的湿菌丝体，浸提、连续压滤后得到去除脂溶性杂质的湿菌丝体；

f) 用酯类有机溶剂与步骤 e)的湿菌丝体在温度 10℃到溶剂沸点温度下混合、萃取，温度不超过 40℃下真空浓缩至干，以得到浓缩液；和

g) 在温度 10℃~80℃下向该浓缩液中加入 C1~C6 饱和一元醇，析出结晶、过滤结晶得到纯 β-胡萝卜素。

按照本发明，具体地说，就是在包含碳源、氮源、磷源和微量元

素的培养基中加入一定量的植物油后，添加或不添加乳化剂，经过胶体磨高速剪切乳化，使油滴能均匀分散于水基培养基中，这样在后续培养过程中，不仅扩大了霉菌与植物油滴的接触机会，细小的植物油滴能被微生物充分地利用，从而增加 β -胡萝卜素产量。而且，在高速剪切过程中，大量的氧气能被卷入到培养基中，从而增大了培养基中氧的浓度，这对后续的培养过程也是很有利的。

培养基中的植物油可以一次性加入，也可分批加入。因为一方面在发酵前期植物油浓度过高不必要，此时植物油得不到充分地利用；另一方面植物油量过多的话会使培养基粘度变大，也不利于氧气的溶解。而通过分批加入植物油，在前期加入一定量的植物油，在微生物发酵过程中这些植物油消耗掉后，再补加余下的植物油，不仅能使培养基粘度保持相对均一，而且能使植物油得到充分地利用，提高原料的利用率。

培养基中的碳源可以是一种或多种的碳水化合物或脂肪类物质，如葡萄糖、蔗糖、淀粉、植物油或动物油；氮源可以是一种或多种有机或无机氮源，如大豆蛋白、玉米蛋白、酵母提取物、多肽、酪蛋白等；培养基中可加入一定量的微量元素如磷酸盐、硫酸盐、钙盐、镁盐等。具体到碳源、氮源、磷源及微量元素的比例和浓度，要使其有利于微生物的生长及发酵单位的提高。

步骤 c)中，培养基中所述植物油分批或一次性加入，所述植物油的加入量为培养基质量总量的 1-10%，优选 3-6%。步骤 c)中，剪切乳化混合前，植物油加入量占其总加入质量的 10-90%，优选 40-70%。

用到的乳化剂可以为常规乳化剂如吐温系列产品、司班系列产品及卵磷脂，单双甘油酯等。步骤 b)和 c)中，所述乳化剂的加入质量为培养基体积量的 0.01-10.0%，优选 0.1-5.0%，更优选 0.5-2.0%。

优选地，所述植物油选自大豆油、葵花籽油、菜籽油、棉籽油中的一种或几种。所述乳化剂为吐温系列产品、司班系列产品、卵磷脂、或单双甘油酯。

优选地，步骤 b)中的种子培养基组成包括(每升)：玉米淀粉 20g~24g、葡萄糖 11g~17g、植物油 10g ~100g、盐酸硫胺素 0.02g、硫酸镁 0.3g、乳化剂 0.1g~100.0g。

优选地，步骤 c)中的发酵罐培养基组成包括(每升)：玉米淀粉 19g~25g、玉米浆 17g~31g、粕饼粉 12g~19g、植物油 10g~50g、磷酸氢二钾 2g、硫酸镁 0.3g~0.4g 和盐酸硫胺素 0.02g、和/或乳化剂 1.0g~50.0g。

优选地，步骤 d) 中，所述无机碱为氢氧化钠或氢氧化钾，所述有机碱为甲醇钠或乙醇钠。发酵完成后，添加有机或无机碱类物质将发酵液调整为碱性，一般是添加氢氧化钠或氢氧化钾或甲醇钠或乙醇钠等使发酵液 pH 达到 8.0 左右，保持 0.1-2.0 小时后使细胞壁破碎。

运用常规方法如过滤、压滤、离心等方式将湿菌丝体分离出来。

用冷的非极性有机溶剂处理湿菌丝体将除去菌丝体中的脂溶性杂。由于在发酵过程中用到大量的植物油，一方面这些植物油中少量部分可能没有被微生物利用完全，另一方面微生物在代谢过程中会产

生较多的脂溶性物质，这些脂溶性物质的存在对后续产品的提取收率和纯度会产生不好的影响，所以应在前期尽可能去除。并且发酵产生的 β -胡萝卜素在非极性有机溶剂中的溶解度很小，特别是在温度低的时候溶解度更低，通过温度较低的非极性有机溶剂就能在不损耗 β -胡萝卜素的情况下将脂溶性有机杂质去除，为后续的 β -胡萝卜素提取和纯化创造条件。

优选地，步骤 e) 中，将湿菌丝体与所述疏水性非极性有机溶剂进行充分混和，所述疏水性非极性有机溶剂与湿菌丝体的体积比例为 0.5/1-10/1(V/V)，优选 1/1-5/1(V/V)。步骤 e) 中，在温度 0-60℃ 之间，优选 10-40℃ 之间用所述疏水性非极性有机溶剂处理湿菌丝体。步骤 e) 中，所述疏水性非极性有机溶剂处理菌丝体时间为 0.1-3.0hr，优选 0.5-2.0hr。步骤 e) 中，所述疏水性非极性有机溶剂为正己烷、环己烷、或正庚烷。湿菌丝体处理完成后过滤得到脱除了脂溶性杂质的湿菌丝体。

步骤 f) 中，脱除脂溶性有机杂质后，将此湿菌丝体用有机溶剂浸提其中的 β -胡萝卜素。使用到的有机溶剂主要是酯类有机溶剂，所述酯类有机溶剂为乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、或乙酸丁酯。在温度为 10℃ 到溶剂的沸点温度下混合、萃取，优选为 30℃~60℃ 之间，以减少 β -胡萝卜素在提取过程中的损耗。浸提用溶剂的比例根据菌丝体中的单位确定，一般，步骤 f) 中，所述酯类有机溶剂体积用量为湿菌丝体质量的 5-30 倍，优选 10-20 倍。

步骤 g) 中，浓缩浸提后的有机溶剂。溶剂浓缩完成后加入醇类有

机溶剂结晶，也可以在浓缩过程中将析出的部分晶体直接过滤得到纯品，余下部分的晶体在溶剂浓缩至干后加入醇类有机溶剂结晶析出。C1~C6 饱和一元醇为乙醇、异丙醇、丙二醇、或正丙醇。C1~C6 饱和一元醇体积为浓缩液体积的 5-50 倍，优选 10-30 倍。在温度 10-80℃，优选 30-60℃下向该浓缩液中加入 C1~C6 饱和一元醇。将得到的晶体烘干，即得 β-胡萝卜素纯品，其含量可达 96%以上，提取收率可达 85%左右。

本专利通过改变培养基组成及添加方式，并将培养液经过特殊的乳化处理，最终发酵液中 β-胡萝卜素单位最高可达 11g/l。发酵完成后调节发酵液 pH 使细胞破壁，用冷的非极性有机溶剂去除一般的脂溶性成分，再用食用级有机溶剂提取胞内 β-胡萝卜素，浓缩后结晶就可得高纯度的 β-胡萝卜素晶体，其中 β-胡萝卜素的含量可达 96%以上，提取收率在 85%左右。在整个生产过程中操作简便，β-胡萝卜素的损失少，产率高，易于工业化生产。本发明涉及到以较高的收率通过微生物发酵并经提取纯化生产天然 β-胡萝卜素的方法，最终得到的天然 β-胡萝卜素含量可达 96%以上。

本发明还提供了一种采用如上所述的方法制备的 β-胡萝卜素在制备食品添加剂、膳食补充剂、药物或化妆品中的应用。得到的 β-胡萝卜素晶体可通过应用微胶囊技术制备稳定性好，可直接应用的微胶囊制剂产品，也可制备成可在油中分散的油悬浮液产品。

具体实施方式

为了进一步阐明本发明，下面给出一系列实施例。需要指出的是，这些实施例完全是例证性的。给出这些实施例的目的是为了充分明示本发明的意义和内容，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之内。

实施例 1

将保藏的能代谢 β -胡萝卜素的菌种三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株，其中：三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株购自 ATCC，编号分别为 ATCC14271 (+)，ATCC14272 (-)。分别接种到 PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，在 25℃ 条件下培养 48 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液，该孢子悬浮液中含孢子的量约为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。该 PDA 培养基由葡萄糖、马铃薯和琼脂培养基组成。

上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中萌发繁殖成大量菌丝体作为发酵用种子，其中的种子培养基组成为(每升)：玉米淀粉 21g、葡萄糖 13g、花生油 100g、盐酸硫胺素 0.02g、硫酸镁 0.3g、吐温-20 0.1g；pH=6.3，培养温度 25℃，培养时间 24 小时。

将种子罐中孢子接种到发酵罐中发酵培养生产 β -胡萝卜素。发酵罐培养基组成为(每升)：玉米淀粉 23g、玉米浆 31g、粕饼粉 12g、大豆油 30g、磷酸氢二钾 2g、硫酸镁 0.3g、盐酸硫胺素 0.02g、卵磷脂 1.0g；pH=6.8。培养基经过胶体磨高速剪切乳化，使植物油在其中充分分散，并带入大量的氧气。培养温度 27℃，培养 24hr 后补加大豆

油，数量为每升培养基加 3.3g。96hr 后发酵完成。发酵完成后发酵液中 β -胡萝卜素单位可达 9.65g/l。

向发酵液中添加 NaOH 调节溶液 pH=8.0，搅拌 2.0hr 后过滤得湿菌丝体。

将湿菌丝体与 0℃ 的正己烷混和搅拌，正己烷体积为湿菌丝体质量的一倍，菌丝体浸提时间为 3.0hr，过滤后得去除脂溶性杂质的湿菌丝体。

湿菌丝体与 10 倍量的乙酸丁酯在 60℃ 温度下充分混合，过滤得到浸提液，真空状况下浓缩至干，浓缩时温度不超过 40℃。

加入正丙醇于 60℃ 温度下结晶，正丙醇的加入量为浓缩液体积的 10 倍。过滤结晶得 β -胡萝卜素纯品，其含量达 98.2%，浸提收率达 82.0%。

得到的 β -胡萝卜素晶体可添加其它辅料如明胶、淀粉、蔗糖、植物油等作为食品添加剂或药物应用。

比较实施例 1-1

三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)孢子悬浮液的培养及种子培养，发酵罐培养条件完全同实施例 1，培养基组成也一样，与实施例不同之处在于：发酵培养基未经胶体磨高速混合处理，在发酵后期也未补充植物油。发酵完成后发酵液中 β -胡萝卜素单位只有 5.71g/l。

实施例 2

将保藏的能代谢 β -胡萝卜素的菌种三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株，其中：三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株购自 ATCC，编号分别为 ATCC14271 (+)，ATCC14272 (-)。分别接种到 PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，在 30℃ 条件下培养 60 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液，该孢子悬浮液中含孢子的量约为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。该 PDA 培养基由葡萄糖、马铃薯和琼脂培养基组成。

上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中萌发繁殖成大量菌丝体作为发酵用种子，其中的种子培养基组成为(每升)：玉米淀粉 24g、葡萄糖 15g、棉籽油 60g、盐酸硫胺素 0.02g、硫酸镁 0.3g、司班-40 5.0g；pH=6.5，培养温度 30℃，培养时间 30 小时。

将种子罐中孢子接种到发酵罐中发酵培养生产 β -胡萝卜素。发酵罐培养基组成为(每升)：玉米淀粉 25g、玉米浆 24g、粕饼粉 15g、大豆油 10g、磷酸氢二钾 2g、硫酸镁 0.4g、盐酸硫胺素 0.02g、吐温-40 20.0g；pH=6.5。培养基经过胶体磨高速剪切乳化，使植物油在其中充分分散，并带入大量的氧气。培养温度 30℃，培养 24hr 后补加大豆油，数量为每升培养基加 90.0g。100hr 后发酵完成。发酵完成后发酵液中 β -胡萝卜素单位可达 10.78g/l。

向发酵液中添加 KOH 调节溶液 pH=8.0，搅拌 0.1hr 后过滤得湿菌丝体。

将湿菌丝体与 60℃ 的正庚烷混和搅拌，正庚烷体积为湿菌丝体质量的 0.5 倍，菌丝体浸提时间为 2.0hr，过滤后得去除脂溶性杂质的湿

菌丝体。

湿菌丝体与 30 倍量的乙酸异丙酯在 10℃ 温度下充分混合，过滤得到浸提液，真空状况下浓缩至干，浓缩时温度不超过 40℃。

加入丙二醇于 80℃ 温度下结晶，丙二醇的加入量为浓缩液体积的 30 倍。过滤结晶得 β-胡萝卜素纯品，其含量达 96.4%，浸提收率达 81.2%。

得到的 β-胡萝卜素晶体可添加其它辅料如明胶、淀粉、蔗糖、植物油等作为食品添加剂或药物应用。

实施例 3

将保藏的能代谢 β-胡萝卜素的菌种三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株，其中：三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株购自 ATCC，编号分别为 ATCC14271 (+)，ATCC14272 (-)。分别接种到 PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，在 27℃ 条件下培养 50 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液，该孢子悬浮液中含孢子的量约为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。该 PDA 培养基由葡萄糖、马铃薯和琼脂培养基组成。

上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中萌发繁殖成大量菌丝体作为发酵用种子，其中的种子培养基组成为(每升)：玉米淀粉 22g、葡萄糖 11g、大豆油 10g、盐酸硫胺素 0.02g、硫酸镁 0.3g、单双甘油酯 100.0g；pH=6.5，培养温度 27℃，培养时间 26 小时。

将种子罐中孢子接种到发酵罐中发酵培养生产 β-胡萝卜素。发酵

罐培养基组成为(每升): 玉米淀粉 19g、玉米浆 27g、粕饼粉 18g、菜籽油 50g、磷酸氢二钾 2g、硫酸镁 0.4g、盐酸硫胺素 0.02g、吐温-60 50.0g; pH=6.5。培养基经过胶体磨高速剪切乳化, 使植物油在其中充分分散, 并带入大量的氧气。培养温度 28℃, 培养 24hr 后补加菜籽油, 数量为每升培养基加 21.5g。124hr 后发酵完成。发酵完成后发酵液中 β -胡萝卜素单位可达 10.24g/l。

向发酵液中添加甲醇钠调节溶液 pH=8.1, 搅拌 1.0hr 后过滤得湿菌丝体。

将湿菌丝体与 40℃ 的环己烷混和搅拌, 环己烷体积为湿菌丝体质量的 10.0 倍, 菌丝体浸提时间为 0.1hr, 连续压滤后得去除脂溶性杂质的湿菌丝体。

湿菌丝体与 20 倍量的乙酸异丁酯在 50℃ 温度下充分混合, 过滤得到浸提液, 真空状况下浓缩至干, 浓缩时温度不超过 40℃。

加入异丙醇于 10℃ 温度下结晶, 异丙醇的加入量为浓缩液体积的 50 倍。过滤结晶得 β -胡萝卜素纯品, 其含量达 97.1%, 浸提收率达 86.1%。

得到的 β -胡萝卜素晶体可添加其它辅料如明胶、淀粉、蔗糖、植物油等作为食品添加剂或药物应用。

实施例 4

将保藏的能代谢 β -胡萝卜素的菌种三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株, 其中: 三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株

购自 ATCC，编号分别为 ATCC14271 (+)，ATCC14272 (—)。分别接种到 PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，在 28℃ 条件下培养 55 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液，该孢子悬浮液中含孢子的量约为 $1-3 \times 10^6$ 个/ml。该 PDA 培养基由葡萄糖、马铃薯和琼脂培养基组成。

上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中萌发繁殖成大量菌丝体作为发酵用种子，其中的种子培养基组成为(每升)：玉米淀粉 20g、葡萄糖 17g、葵花籽油 10g、盐酸硫胺素 0.02g、硫酸镁 0.3g、司班-60 5.0g；pH=6.8，培养温度 29℃，培养时间 28 小时。

将种子罐中孢子接种到发酵罐中发酵培养生产 β -胡萝卜素。发酵罐培养基组成为(每升)：玉米淀粉 25g、玉米浆 17g、粕饼粉 19g、菜籽油 40g、磷酸氢二钾 2g、硫酸镁 0.4g、盐酸硫胺素 0.02g；pH=6.5。培养基经过胶体磨高速剪切乳化，使植物油在其中充分分散，并带入大量的氧气。培养温度 29℃，培养 24hr 后补加菜籽油，数量为每升培养基加 60g。124hr 后发酵完成。发酵完成后发酵液中 β -胡萝卜素单位可达 9.32g/l。

向发酵液中添加乙醇钠调节溶液 pH=8.5，搅拌 1.0hr 后过滤得湿菌丝体。

将湿菌丝体与 10℃ 的正己烷混和搅拌，正己烷体积为湿菌丝体质量的 5.0 倍，菌丝体浸提时间为 0.5hr，连续压滤后得去除脂溶性杂质的湿菌丝体。

湿菌丝体与 5 倍量的乙酸乙酯在其沸点温度下充分混合，过滤得

到浸提液，真空状况下浓缩，浓缩时温度不超过 40℃，在浓缩过程中取出析出的部分 β -胡萝卜素晶体，继续浓缩至干。

加入乙醇于 30℃ 温度下结晶，乙醇的加入量为浓缩液体积的 5 倍。离心过滤结晶得 β -胡萝卜素纯品，其含量达 96.1%，浸提收率达 84.2%。

将得到的 β -胡萝卜素晶体经超微粉碎后，与红花油混合均匀，制成 β -胡萝卜素含量为 30% 的油悬浮液，此油悬浮液可制备成软胶囊后用于膳食补充。

需要说明的是，上述发明内容及具体实施方式意在证明本发明所提供技术方案的实际应用，不应解释为对本发明保护范围的限定。本领域技术人员在本发明的精神和原理内，当可作各种修改、等同替换、或改进。本发明的保护范围以所附权利要求书为准。

权利要求书

1、一种通过三孢布拉霉发酵生产并提纯 β -胡萝卜素的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 将三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)“+”“-”菌株分别接种到 PDA 培养基上，在 25-30℃ 条件下培养 48-60 小时，待大量长出孢子后用无菌生理盐水洗脱孢子成孢子悬浮液；

b) 上述新鲜孢子悬浮液中的孢子在种子罐中在 pH=6.3~6.8 和培养温度 25-30℃ 下培养繁殖成发酵用种子；其中的种子培养基组成包括：玉米淀粉、葡萄糖、植物油、盐酸硫胺素、硫酸镁、乳化剂；

c) 将步骤 b) 的种子罐中所述发酵用种子接种到发酵罐中在 pH=6.5~6.8 和培养温度 27-30℃ 下发酵培养生成发酵液；其中，接种前培养基经过胶体磨高速剪切乳化，发酵罐的培养基组成包括：玉米淀粉、玉米浆、粕饼粉、植物油、磷酸氢二钾、硫酸镁、盐酸硫胺素、和/或乳化剂；

d) 向步骤 c) 的所述发酵液中加入有机碱或无机碱调节发酵液为碱性 pH=8.0~8.5，过滤得到湿菌丝体；

e) 在温度 0℃~60℃ 下用疏水性非极性有机溶剂处理步骤 d) 的湿菌丝体，浸提、连续压滤后得到去除脂溶性杂质的湿菌丝体；

f) 用酯类有机溶剂与步骤 e) 的湿菌丝体在温度 10℃ 到溶剂沸点温度下混合、萃取，温度不超过 40℃ 下真空浓缩至干，以得到浓缩液；和

g) 在温度 10°C~80°C 下向该浓缩液中加入 C1~C6 饱和一元醇，析出结晶、过滤结晶得到纯 β -胡萝卜素。

2、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 c) 中，所述植物油分批或一次性加入，所述植物油的加入量为培养基质量总量的 1-10%，优选 3-6%。

3、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 c) 中，剪切乳化混合前，植物油加入量占其总加入质量的 10-90%，优选 40-70%。

4、如权利要求 1~3 任一所述的方法，其中，所述植物油选自大豆油、葵花籽油、菜籽油、棉籽油中的一种或几种。

5、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 b) 和 c) 中，所述乳化剂的加入质量为培养基体积量的 0.01-10.0%，优选 0.1-5.0%，更优选 0.5-2.0%。

6、如权利要求 1、4 所述的方法，其中，所述乳化剂为吐温系列产品、司班系列产品、卵磷脂、或单双甘油酯。

7、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 d) 中，所述无机碱为氢氧化钠或氢氧化钾，所述有机碱为甲醇钠或乙醇钠。

8、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 e) 中，所述疏水性非极性有机溶剂体积与湿菌丝体的体积比例为 0.5/1-10/1，优选 1/1-5/1。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中，步骤 e) 中，在温度 10°C-40°C 下所述疏水性非极性有机溶剂处理湿菌丝体。

10、如权利要求 10 所述的方法，其中，步骤 e) 中，所述疏水性非极性有机溶剂处理菌丝体时间为 0.1-3.0hr，优选 0.5-2.0hr。

11、如权利要求 1、8、9 或 10 所述的方法，其中，步骤 e) 中，所述疏水性非极性有机溶剂为正己烷、环己烷、或正庚烷。

12、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 f) 中，所述酯类有机溶剂体积用量为湿菌丝体质量的 5-30 倍，优选 10-20 倍。

13、如权利要求 12 所述的方法，其中，步骤 f) 中，所述酯类有机溶剂为乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、或乙酸丁酯。

14、如权利要求 13 所述的方法，其中，步骤 f) 中，在温度 30-60°C 下混合、萃取。

15、如权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 g) 中，C1~C6 饱和一元醇体积为浓缩液体积的 5-50 倍，优选 10-30 倍。

16、如权利要求 15 所述的方法，其中，步骤 g) 中，C1~C6 饱和一元醇为乙醇、异丙醇、丙二醇、或正丙醇。

17、如权利要求 16 所述的方法，其中，步骤 g) 中，在温度 30°C -60°C 下向该浓缩液中加入 C1~C6 饱和一元醇。

18、一种采用如权利要求 1~17 任一所述的方法制备的 β -胡萝卜素在制备食品添加剂、膳食补充剂、药物或化妆品中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/000655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12P; C07C; C12N; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS; CNKI and key words: carotene, carotenoid, β -Carotene, Beta-Carotene, fermentation, fungus, Blakeslea trispora etc.

WPI; EPODOC; MEDLINE and key words: carotene, carotenoid, β -carotene, beta-carotene, fermentation, fungi, Blakeslea trispora etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1193048 A (JIANGSU INSTITUTE OF MICROBIOLOGY), 16 September 1998 (16.09.1998), the whole document, particularly claims 1, 2, 4, 5, 7 and 8, and description, page 4, paragraph 3, 1 st -3 rd lines to the bottom	1-18
Y	CN 101070555 A (SHANGHAI RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL INDUSTRY), 14 November 2007 (14.11.2007), the whole document, particularly description, page 6, the last paragraph, lines 1-3, and page 7, paragraph 4, 2 nd -3 rd lines to the bottom	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
21 June 2012 (21.06.2012)

Date of mailing of the international search report
05 July 2012 (05.07.2012)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
WANG, Ying
Telephone No.: (86-10) **62411093**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/000655**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROUKAS, T. et al., An Improved Method for Extraction of B-Carotene from <i>Blakeslea trispora</i> , APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 01 January 2001 (01.01.2001), vol. 90, no. 1, pages 37-45 the whole document, particularly page 38, paragraph 4	1-18
A	MANTZOURIDOU, F. et al., Optimization of B-Carotene Production from Synthetic Medium by <i>Blakeslea trispora</i> , APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 01 May 2002 (01.05.2002), vol. 101, no. 2, pages 153-175 the whole document	1-18
A	EP 1306444 A1 (VITATENE, S.A.), 02 May 2003 (02.05.2003), the whole document	1-18
A	CN 101870668 A (ZHEJIANG MEDICINE CO., LTD. XINCHANG PHARMACEUTICAL FACTORY), 27 October 2010 (27.10.2010), the whole document	1-18
A	CN 1079218 A (NANJING NORMAL UNIVERSITY), 08 December 1993 (08.12.1993), the whole document	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/000655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1193048 A	16.09.1998	None	
CN 101070555 A	14.11.2007	CN 100513578 C	15.07.2009
EP 1306444 A1	02.05.2003	AU 7256201 A	13.02.2002
		ES 2168971 A1	16.06.2002
		EP 1306444 B1	08.09.2004
		ES 2168971 B1	01.11.2003
		JP 2004504853 A	19.02.2004
		US 2004067550 A1	08.04.2004
		WO 0210429 A1	07.02.2002
		DE 60105435 E	14.10.2004
		ES 2223894 T3	01.03.2005
		DE 60105435 T2	22.09.2005
		JP 4287142 B2	01.07.2009
CN 101870668 A	27.10.2010	None	
CN 1079218 A	08.12.1993	CN 1038220 C	06.05.1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/000655

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 23/00 (2006.01) i

A23L 1/303 (2006.01) i

A61K 31/07 (2006.01) i

A61K 8/67 (2006.01) i

A61P 3/02 (2006.01) i

C07C 403/24 (2006.01) n

C12N 1/14 (2006.01) n

C12R 1/645 (2006.01) n

<p>A. 主题的分类</p> <p style="text-align: center;">参见附加页</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>																					
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p style="text-align: center;">IPC: C12P; C07C; C12N; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p style="text-align: center;">CPRS; CNKI 和关键词: 胡萝卜素,类胡萝卜素,β-胡萝卜素,beta-胡萝卜素,发酵,真菌,三孢布拉霉, Blakeslea trispora 等;</p> <p style="text-align: center;">WPI; EPODOC; MEDLINE 和关键词: carotene, carotenoid, β-carotene, beta-carotene, fermentation, fungi, Blakeslea trispora 等;</p>																					
<p>C. 相关文件</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">类 型*</th> <th style="width: 60%;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width: 30%;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>CN 1193048 A(江苏省微生物研究所) 16.9 月 1998(16.09.1998) 全文, 尤其是权利要求 1, 2, 4, 5, 7, 8, 说明书第 4 页第 3 段倒数第 1-3 行</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>CN 101070555 A(上海化工研究院) 14.11 月 2007(14.11.2007) 全文, 尤其是说明书第 6 页倒数第 1 段第 1-3 行; 第 7 页第 4 段倒数第 2-3 行</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td style="width: 50%;">“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 1193048 A(江苏省微生物研究所) 16.9 月 1998(16.09.1998) 全文, 尤其是权利要求 1, 2, 4, 5, 7, 8, 说明书第 4 页第 3 段倒数第 1-3 行	1-18	Y	CN 101070555 A(上海化工研究院) 14.11 月 2007(14.11.2007) 全文, 尤其是说明书第 6 页倒数第 1 段第 1-3 行; 第 7 页第 4 段倒数第 2-3 行	1-18	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																			
Y	CN 1193048 A(江苏省微生物研究所) 16.9 月 1998(16.09.1998) 全文, 尤其是权利要求 1, 2, 4, 5, 7, 8, 说明书第 4 页第 3 段倒数第 1-3 行	1-18																			
Y	CN 101070555 A(上海化工研究院) 14.11 月 2007(14.11.2007) 全文, 尤其是说明书第 6 页倒数第 1 段第 1-3 行; 第 7 页第 4 段倒数第 2-3 行	1-18																			
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																				
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																				
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																				
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																				
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																					
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p style="text-align: center;">21.6 月 2012 (21.06.2012)</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p style="text-align: center;">05.7 月 2012 (05.07.2012)</p>																				
<p>ISA/CN 的名称和邮寄地址:</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p style="text-align: center;">王颖</p> <p>电话号码: (86-10) 62411093</p>																				

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	ROUKAS, T. 等, An Improved Method for Extraction of β -Carotene from <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> , 01.1 月 2001(01.01.2001), 第 90 卷, 第 1 期, 第 37-45 页 全文, 尤其是第 38 页第 4 段	1-18
A	MANTZOURIDOU, F. 等, Optimization of β -Carotene Production from Synthetic Medium by <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> , 01.5 月 2002(01.05.2002), 第 101 卷, 第 2 期, 第 153-175 页 全文	1-18
A	EP 1306444 A1(VITATENE, S. A.) 02.5 月 2003(02.05.2003) 全文	1-18
A	CN 101870668 A(浙江医药股份有限公司新昌制药厂) 27.10 月 2010 (27.10.2010) 全文	1-18
A	CN 1079218 A(南京师范大学) 08.12 月 1993(08.12.1993) 全文	1-18

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/000655

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1193048 A	16.09.1998	无	
CN 101070555 A	14.11.2007	CN100513578 C	15. 07.2009
EP1306444 A1	02. 05.2003	AU7256201 A	13. 02.2002
		ES2168971 A1	16. 06.2002
		EP1306444 B1	08. 09.2004
		ES2168971 B1	01. 11.2003
		JP2004504853 A	19. 02.2004
		US2004067550 A1	08. 04.2004
		WO 0210429 A1	07.02.2002
		DE60105435 E	14. 10.2004
		ES2223894 T3	01. 03.2005
		DE60105435 T2	22. 09.2005
		JP4287142 B2	01. 07.2009
CN 101870668 A	27.10.2010	无	
CN 1079218 A	08.12.1993	CN1038220 C	06. 05.1998

主题的分类

C12P 23/00 (2006.01) i

A23L 1/303 (2006.01) i

A61K 31/07 (2006.01) i

A61K 8/67 (2006.01) i

A61P 3/02 (2006.01) i

C07C 403/24 (2006.01) n

C12N 1/14 (2006.01) n

C12R 1/645 (2006.01) n