



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109971663 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910348888.0

C12R 1/645(2006.01)

(22)申请日 2019.04.28

(83)生物保藏信息

CCTCC NO: M2019163 2019.03.18

(71)申请人 江南大学

地址 214000 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72)发明人 张娟 邱学良 李江华 堵国成  
陈坚 朱政明

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 林娟

(51)Int.Cl.

C12N 1/16(2006.01)

C12P 7/18(2006.01)

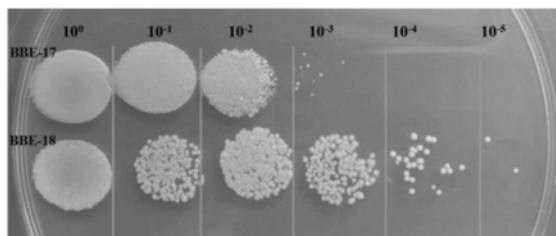
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一株耐热亚罗解脂酵母及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株耐热亚罗解脂酵母及其应用,属于工业生物技术领域。所述耐热亚罗解脂酵母已于2019年3月18日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2019163,保藏地址为中国武汉武汉大学。本发明的亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-18,可以在35℃下发酵生产赤藓糖醇,且在发酵时间为80h,耐热亚罗解脂酵母BBE-18的赤藓糖醇的产量达到68.1g/L,葡萄糖对赤藓糖醇转化率为67%。具有一定的产业化潜力,为发酵冷却成本降低,避免夏季停产提供了可能性。



1. 一株耐热亚罗解脂酵母 (*Yarrowia Lipolytica*), 其特征在于, 所述耐热亚罗解脂酵母已于2019年3月18日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC NO:M2019163, 保藏地址为中国武汉武汉大学。

2. 一种生产赤藓糖醇的方法, 其特征在于, 所述方法是应用权利要求1所述的耐热亚罗解脂酵母进行发酵生产。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述发酵温度为28~35℃。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述发酵具体是: 将所述耐热亚罗解脂酵母种子液接种于含有葡萄糖的培养基中, 进行生产。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述耐热亚罗解脂酵母种子液的制备方法为: 挑取耐热亚罗解脂酵母单菌落接种于YPD液体培养基中, 于30℃下振荡培养20h。

6. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述接种是以1%~10%的接种量将耐热亚罗解脂酵母接种至发酵培养基中。

7. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述培养基的组成为: 葡萄糖80~150g/L, 酵母粉2~20g/L, 柠檬酸铵1~10g/L, 硫酸镁0.1~2g/L, 磷酸二氢钾0.05~1g/L。

8. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述生产过程具体为: 将所述耐热亚罗解脂酵母种子液按照1%~10%的接种量接种到发酵培养基中, 于28~35℃, 通风发酵。

9. 一种微生物菌剂, 其特征在于, 所述微生物菌剂含有权利要求1所述的耐热亚罗解脂酵母。

10. 权利要求1所述的耐热亚罗解脂酵母或权利要求9所述的微生物菌剂在食品或化工领域的应用。

## 一株耐热亚罗解脂酵母及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株耐热亚罗解脂酵母及其应用,属于工业生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)被广泛认为是安全的,它通过了美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)的GRAS(generally regarded as safe)认定,可广泛应用于食品工业。其特性在专利CN201710540443.3(公开日:2017.09.15)中有比较细致的介绍。亚罗解脂酵母的发酵温度一般为28℃~30℃,它属于好氧发酵微生物,发酵过程中会产生大量的生物热,鲜有耐高温亚罗解脂酵母的报道。工业生产过程中要将发酵温度控制到28-30℃,需要消耗大量的冷却水,而大型发酵罐的冷却盘管都比较长,因此,冷却水供水泵的功率很大,降温过程要消耗大量的电能。特别是在夏季,要么用大量的地下水进行降温,或用冷冻机组,这两种措施一个是消耗大量的水资源,一种是消耗大量的电能,都会造成生产成本飙升。因此,大多发酵企业不得不在夏季选择停产检修。

[0003] 赤藓糖醇,作为低热量天然多元醇甜味剂,近年来受到市场的青睐,一度出现供不应求的局面。CN201510153710.2(公开日:2015.06.10)公开了一种用解脂假丝酵母发酵生产赤藓糖醇的方法,其种子培养温度为28℃,发酵温度为30℃。CN201510782365.9(公开日:2016.01.20)公开了一种用解脂假丝酵母生产赤藓糖醇的发酵方法,发酵温度为28-32℃。CN201210360876.8(公开日:2014.03.26)公开了一种发酵法制取赤藓糖醇的方法,采用的菌种为埃西托丛梗孢酵母,发酵温度为32℃。因此,现有的发酵生产赤藓糖醇的温度一般在32℃以下。

[0004] 为了降低夏季利用亚罗解脂酵母生产赤藓糖醇的成本,获得耐高温的亚罗解脂酵母是一种途径。但是,目前,还没有耐高温的亚罗解脂酵母可供选择。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述存在的技术问题,本发明由*Yarrowia Lipolytica* BBE-17经过适应性进化获得的一株耐热亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-18。所述亚罗解脂酵母BBE-18,可以在35℃下发酵生产赤藓糖醇,葡萄糖对赤藓糖醇转化率高达68.4%。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一株耐热亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*),所述耐热亚罗解脂酵母已于2019年3月18日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2019163,保藏地址为中国武汉武汉大学。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种生产赤藓糖醇的方法,所述方法是应用所述的耐热亚罗解脂酵母进行发酵生产。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵温度为28~35℃。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵温度优选为32~35℃。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵温度更优选为35℃。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵具体是:将所述耐热亚罗解脂酵母种子液接种于含有葡萄糖的培养基中,进行培养。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述耐热亚罗解脂酵母种子液的制备方法为:挑取耐热亚罗解脂酵母单菌落接种于YPD液体培养基中,于30℃下振荡培养20h。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述接种是以1%~10%的接种量将耐热亚罗解脂酵母接种至培养基中。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述培养基的组成为:葡萄糖80~150g/L,酵母粉2~20g/L,柠檬酸铵1~10g/L,硫酸镁0.1~2g/L,磷酸二氢钾0.05~1g/L。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵过程具体为:将亚罗解脂酵母种子液按照1%~10%的接种量接种到发酵培养基中,于28~35℃,通风发酵。

[0016] 本发明的第三个目的是提供一种微生物菌剂,所述微生物菌剂含有所述的耐热亚罗解脂酵母。

[0017] 本发明还提供所述的耐热亚罗解脂酵母或所述的微生物菌剂在食品或化工领域的应用。

[0018] 本发明的有益效果:

[0019] 本发明所提供的耐热亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-18,可以在35℃下发酵生产赤藓糖醇,且赤藓糖醇的产量达到68.1g/L,转化率为67%。大大减少了发酵过程中降温循环水的用量,减少发酵冷却装置投资以及在制冷、供水方面的能耗。

[0020] 生物材料保藏

[0021] 本发明的亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-17已经在专利CN201710540443.3(公开日:2017.09.15)中公开,该菌已于2017年1月11日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2017027,保藏地址为中国武汉武汉大学。

[0022] 本发明所提供的亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-18,分类学命名为*Yarrowia Lipolytica*BBE-18,已于2019年3月18日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2019163,保藏地址为中国武汉武汉大学。

## 附图说明

[0023] 图1:不同稀释梯度的BBE-17和BBE-18在33℃平板上的生长情况。

## 具体实施方式

[0024] 葡萄糖对赤藓糖醇转化率计算公式:

$$[0025] \quad \text{转化率} = \left( \frac{\text{发酵液中赤藓糖醇浓度(g/L)}}{\text{赤藓糖醇摩尔质量}} \right) \div \left( \frac{\text{培养基葡萄糖浓度(g/L)}}{\text{葡萄糖摩尔质量}} \right)$$

[0026] 赤藓糖醇的检测方法:采用高效液相色谱(HPLC)对赤藓糖醇进行检测,使用有机酸柱,流动相为5mmol/L的稀硫酸,流速0.5ml/min,示差检测器。

[0027] 实施例1:平板生长情况

[0028] 亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-18是在原始菌株亚罗解脂酵母(*Yarrowia Lipolytica*)BBE-17的基础上进行诱变后得到。

[0029] YPD培养基:葡萄糖20g/L,蛋白胨20g/L,酵母粉10g/L。

[0030] 分别挑取亚罗解脂酵母BBE-18和亚罗解脂酵母BBE-17单菌落接种于YPD液体培养基中,分别在35℃、30℃下培养20h。然后分别取稀释倍数为 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 的菌液10 $\mu$ L在YPD平板上点涂。由于酵母在平板上的耐温性逊色于液体培养基,因此将平板置于33℃的培养箱中进行培养,3天后观察菌落情况。

[0031] 结果表明(见图1),33℃下,BBE-17在菌浓较高的情况下,借助菌群优势可以迅速成长;但是随着稀释,菌浓降低,在33℃下存活率明显降低。BBE-18在33℃下的生长情况明显优于BBE-17,这一点从单菌落的大小就可以明显的看出来。当菌浓稀释倍数大于 $10^{-4}$ 时,在33℃下YPD平板上,BBE-17几乎完全不生长,而BBE-18仍可以长出菌落。

[0032] 实施例2:亚罗解脂酵母低温发酵

[0033] (1) 种子培养:分别挑取亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18单菌落接种于4mL YPD液体培养基中,于30℃、转速为220rpm的摇床中振荡培养20h,分别得到亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18种子液。

[0034] (2) 摇瓶发酵培养:分别取步骤(1)中的亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18种子液,按5%的接种量接种至发酵培养基中,于30℃、转速为220rpm的摇床中振荡培养。

[0035] 发酵培养基:葡萄糖120g/L,酵母粉10g/L,柠檬酸铵5g/L,硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾0.25g/L。

[0036] 结果表明:在发酵时间为64h时,耐热亚罗解脂酵母BBE-18的赤藓糖醇的产量达到44.7g/L,葡萄糖对赤藓糖醇转化率为66%;在发酵时间为64h时,BBE-17的赤藓糖醇的产量达到45.4g/L,葡萄糖对赤藓糖醇转化率为67%;说明在正常发酵温度下,BBE-18发酵生产赤藓糖醇的能力与BBE-17相当。

[0037] 实施例3:亚罗解脂酵母高温发酵

[0038] 与实施例2中发酵条件相同,所不同的是发酵温度调节为35℃,且发酵培养基中葡萄糖浓度提高到150g/L。具体发酵过程如下:

[0039] (1) 种子培养:分别挑取亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18单菌落接种于4mL YPD液体培养基中,于30℃、转速为220rpm的摇床中振荡培养20h,分别得到亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18种子液。

[0040] (2) 摇瓶发酵培养:分别取步骤(1)中的亚罗解脂酵母BBE-17、BBE-18种子液,按5%的接种量接种至发酵培养基中,于35℃、转速为220rpm的摇床中振荡培养。

[0041] 发酵培养基:葡萄糖150g/L,酵母粉10g/L,柠檬酸铵5g/L,硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾0.25g/L。

[0042] 结果表明:在发酵时间为80h,耐热亚罗解脂酵母BBE-18的赤藓糖醇的产量达到68.1g/L,葡萄糖对赤藓糖醇转化率为67%;在发酵时间为80h,BBE-17的赤藓糖醇的产量达到26.4g/L,葡萄糖对赤藓糖醇转化率仅为26%。

[0043] 表1赤藓糖醇的产量

	菌株	发酵温度	葡萄糖浓度	发酵时间	赤藓糖醇的产量
[0044]	BBE-17	30°C	120 g/L	64	45.4 g/L
	BBE-18	30°C	120 g/L	64	44.7 g/L
	BBE-17	35°C	150 g/L	80	26.4 g/L
	BBE-18	35°C	150 g/L	80	68.1 g/L

[0045] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

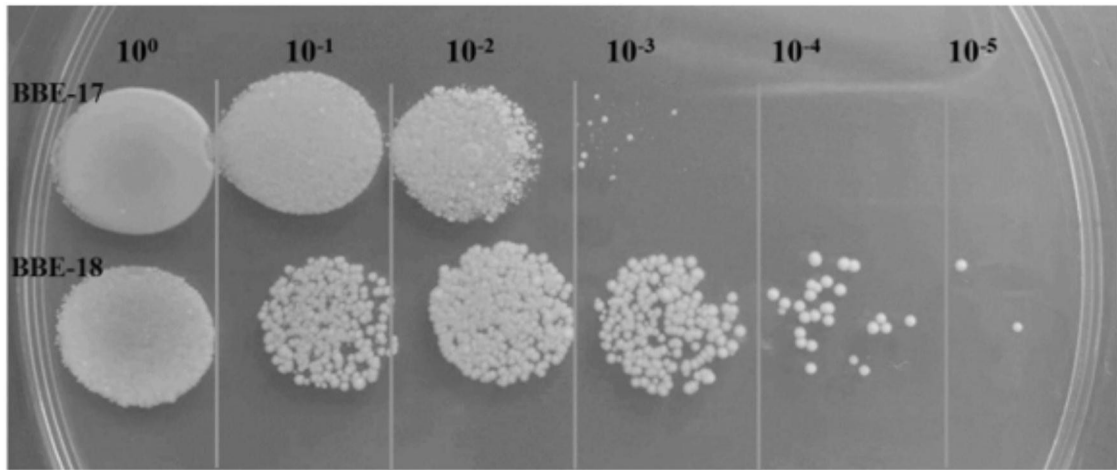


图1