

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99812536.9

C12P 17/04
C12P 7/62 C12P 7/42
C12N 1/16
//(C12P17/04, C12
R1: 645)
(C12P17/04, C12R1:
73)

[43]公开日 2001 年 11 月 28 日

[11]公开号 CN 1324409A

[22]申请日 1999.10.20 [21]申请号 99812536.9

[30]优先权

[32]1998.10.24 [33]EP [31]98120206.2

[86]国际申请 PCT/EP99/07950 1999.10.20

[87]国际公布 WO00/24920 德 2000.5.4

[85]进入国家阶段日期 2001.4.24

[71]申请人 哈尔曼及赖默股份有限公司

地址 德国霍尔兹明登

[72]发明人 J·拉本霍尔斯特 I·加特菲尔德

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 郅 红

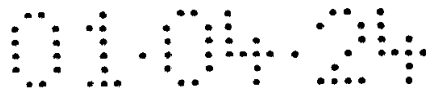
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用于生产 γ -癸内酯的方法

[57]摘要

本发明涉及采用含 *Yarrowia lipolytica* 的培养物制备 γ 癸内酯的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 在生物反应器内制备 γ -癸内酯的方法，其特征在于使用含有 *Yarrowia lipolytica* 的培养物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于使用由 *Yarrowia lipolytica* 组成的纯培养物。

3. 根据权利要求 1 或 2 之一所述的方法，其特征在于使用 *Yarrowia lipolytica* HR 145 (DSM 12397)。

4. 根据权利要求 1-3 中之一所述的方法，其特征在于使用合成、半合成或复合的底物。

5. 根据权利要求 1-4 中之一所述的方法，其特征在于使用含有碳化合物或氮化合物、无机盐、微量元素和/或维生素的底物。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于所述底物中含有的碳化合物是糖类、糖醇类、醇、有机酸类、复合混合物、油类或这些物质中的两种或多种的混合物。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于所用底物中含有葡萄糖、甘油、甘露糖醇、柠檬酸、麦芽汁、酵母提取物、酪蛋白、酪蛋白水解物和蓖麻油或这些物质中的两种或多种的混合物。

8. 根据权利要求 1-7 中之一所述的方法，其特征在于使用含有无机化合物和/或含有有机化合物的底物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于使用硝酸盐、铵盐、酵母提取物、大豆粉、棉子粉、酪蛋白、酪蛋白水解物、面筋和玉米浆。

10. 根据权利要求 1-9 中之一所述的方法，其特征在于使用金属钠、钾、镁、锰、钙、锌或铁的硫酸盐、硝酸盐、氯化物、碳酸盐或磷酸盐或含有这些化合物的两种或多种底物的混合物。

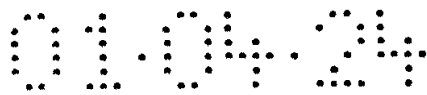
11. 根据权利要求 1-10 中之一所述的方法，其特征在于温度在 10-40℃ 的范围，优选 20-35℃。

12. 根据权利要求 1-11 中之一所述的方法，其特征在于 pH 在 4-11 的范围，优选 5-8。

13. *Yarrowia lipolytica* HR 145 (DSM 12397)。

14. 权利要求 13 的 *Yarrowia lipolytica* 用于制备 γ -癸内酯的用途。

15. γ -癸内酯的制备方法，其特征在于在发酵溶液中羟基- γ -癸内酯与 γ -癸内酯之比小于或等于 0.25。



说明书

用于生产 γ -癸内酯的方法

本发明涉及一种用于制备 γ -癸内酯的新型方法。

5 γ -癸内酯因其器官感觉特性而是一种重要的芳香化合物，它带有水果味、桃样香味和芳香性。一般来说，可以由水果生产 γ -癸内酯。然而，它在水果中的含量极少，使得不能通过提取或蒸馏的方法经济地分离它。

10 因此，近年来已经进行了大量尝试以生物技术方法来制备 γ -癸内酯。大部分方法使用各种酵母进行。在这种情况下，通过酵母转化从其中分离的蓖麻油或蓖麻油酸的甲基酯。在该方法中在 75 小时内获得的产量在几毫克/升到 9.4g/l 之间改变 (FR 2 734 843)。

此外，这种方法具有使用尿嘧啶-营养缺陷型物质的缺点且由此两个分离步骤是生物量形成和产生所必不可少的。

15 本发明的目的由此是提供一种尽可能提高产量的方法。

通过使用含有 *Yarrowia lipolytica* 的培养物可以达到这一目的。

按照本发明，能够在含有其它微生物的混合物中使用 *Yarrowia lipolytica*。然而，优选将 *Yarrowia lipolytica* 用作纯培养物。
20 本发明特别优选培养菌株 *Yarrowia lipolytica* HR145 (DSM 12397)。

作为本发明所用的培养物底物，可以使用合成、半合成或复合的培养基。它们包括碳化合物和氮化合物、无机盐、微量元素或不含微量元素和维生素。

作为碳化合物，优选可以使用碳水化合物、烃类或有机碱化学物
25 质。可以优选使用的化合物的实例是糖类、醇类和/或糖醇类、有机酸类或复合的混合物。根据本发明，优选油类。

作为糖，优选使用葡萄糖。可用的醇类优选包括甘油或甘露糖醇。可以使用的有机酸类优选是柠檬酸。复合的混合物包括例如麦芽汁、酵母提取物、酪蛋白或酪蛋白水解物。作为油，特别可以使用蓖
30 麻油。在这些情况中，根据本发明，可以使用两种或多种所述化合物的混合物。

作为含氮底物，可以使用无机化合物。它们的实例是硝酸盐和铵

盐。同样，可以使用有机氮源。它们包括酵母提取物、大豆粉、棉子粉、酪蛋白、酪蛋白水解物、面筋和玉米浆。还能够使用两种或多种所述的化合物作为混合物。

可以使用的无机盐包括：例如硼酸盐、碳酸盐、氯化物、钼酸盐、硝酸盐、磷酸盐和硫酸盐。作为金属，所述的盐优选含有钙、铁、钾、钴、铜、镁、锰、钠或锌。根据本发明，还可以使用两种或多种所述盐的混合物。

培养温度优选在 10 - 40℃ 的范围。特别优选的范围在 20 - 35℃，极为优选的范围在 25 - 30℃。

10 培养基的 pH 优选为 4 - 9。特别优选的范围在 5 - 8。

在生产过程中，充分通气是必要的。可以由此设计本发明可以使用的反应器。一般来说，根据本发明，由此可以使用适合于需氧方法且本领域技术人员公知的所有生物反应器。优选可以使用任何适合于需氧浸没方法的所有装置。即根据本发明，可以使用不带有或带有机
15 械混合装置的容器。例如，前者包括振荡器、泡罩塔(Blasensäulen)反应器或环路(Schlaufen)反应器。后者优选包括所有公知带有以任意方式设计的搅拌器的装置。

本发明的方法可以连续进行或间歇式进行。直至达到最大量产物的发酵时间在 36 - 72 小时的范围，优选 48 - 66 小时的范围，根据接
20 种的培养物来计算。

根据本发明，在接种的开始阶段、生长过程中或生长完全后加入底物。这可以通过一次添加底物或通过在该过程中连续依次添加底物来实现。

然而，优选在接种培养物后许多小时的期限内进行连续添加。

25 使用本发明所述的方法令人意外地能够在低于 70 小时内生产 11g/l 以上的 γ -癸内酯。通过下列实施例来更具体地描述本发明和相关的令人意外的发现。

实施例

30 1. 初级培养物的制备

在带有侧颈的 500ml 锥形瓶中将 1.7g 的麦芽汁溶于 100ml 水并在 121℃ 下的高压灭菌器内将该溶液灭菌 15 分钟。在冷却至室温后，

使用接种环给装有麦芽肉汤的烧瓶中接种 *Yarrowia lipolytica* HR145 斜面培养物。在 27℃ 和 100rpm 下在回旋机上将该烧瓶培养 24 小时。

5 给带有侧颈的两个 500ml 锥形瓶中装入培养基(1.461g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.352g 的 KH_2PO_4 、0.53g 的脲、0.07g 的 Tween 80、5g 的酵母粉、1g 的蓖麻油和 100ml 的水) 并将其在 121℃ 下的高压灭菌器内灭菌 15 分钟。在冷却至室温后, 给各烧瓶中接种 500 μl 的 *Yarrowia lipolytica* HR145 麦芽汁肉汤培养物。

在 27℃ 和 100rpm 下在回旋机上将烧瓶培养 24 小时。

10 2. 在 101 发酵罐内生产 γ -癸内酯

将 9.8l 水装入发酵罐并向其中加入 14.61g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、53g 的脲、50g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04g 的核黄素、500g 的酵母粉、7.0g 的 Tween 80、100g 的蓖麻油和 5g 的消泡剂。在 121℃ 下将该培养基在原位灭菌 30 分钟。此外, 在高压灭菌器内将稀氢氧化钠溶液和硫酸以及蓖麻油各 500g 灭菌。冷却后, 使消泡剂探头与 NaOH 的放液接头连接。在灭菌后 pH 约为 pH 7.9。用稀硫酸将 pH 调节至 7.0。搅拌速度为 400rpm; 通气量为 3l/分钟的压缩空气; 温度为 27℃。

25 通过无菌放液接头给所述发酵罐中接种初级培养物。在发酵过程中, 进一步加入氢氧化钠溶液以便将 pH 保持在 pH 7.0。根据需要自动添加消泡剂。接种 14 小时后, 开始添加底物。在 4 小时过程中添加 500g 的蓖麻油。

在约 52 小时的发酵时间后, 终止发酵。当不再添加更多的氢氧化钠溶液 1 小时时, 达到终止发酵的时间。为了终止发酵, 使用浓硫酸将发酵罐内含物的 pH 调至 pH 2.0 并加热至 80℃ 30 分钟。冷却后, 压榨出内含物用于随后的检测。根据 HPLC, γ -癸内酯的终浓度为 11,500 - 12,500ppm。3-羟基- γ -癸内酯与 γ -癸内酯之比小于 0.2。

在离心后如果合适, 通过公知的物理方法(蒸馏法、提取法等)从所得的培养物肉汤中分离 γ -癸内酯。

3. 300l 规模的生产

30 如实施例 1 中所述精确制备 200ml 的初级培养物并用于接种 300l 发酵罐。将 140l 水预先加入所述发酵罐并向其中加入 742g 的脲、49g 的 KH_2PO_4 、12g 的 H_2O 、7g 的酵母提取物和 98g 的 Tween 80。在 121

℃下将该培养基在原位灭菌 30 分钟。

冷却后，使消泡剂探头与 NaOH 的放液接头连接。在灭菌后 pH 约为 7.0。将搅拌速度设定为 180rpm；通气量达 35l/分钟且温度为 27℃。在无菌条件下给所述发酵罐中接种 200ml 的初级培养物。在发酵过程中，使用氢氧化钠溶液将 pH 保持在 7.0 的恒定值。接种约 16 小时后，开始添加蓖麻油（7.4kg）且再过 4 小时后完成添加。

在 69 小时的发酵时间后，终止发酵。γ-癸内酯的终浓度为 12.3g/l。由于仅形成了 1.53g/l 的 3-羟基-γ-癸内酯，所以 3-羟基-γ-癸内酯与 γ-癸内酯之比为 0.125。