



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112143770 B

(45) 授权公告日 2023.09.22

(21) 申请号 202010921133.8
 (22) 申请日 2020.09.04
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112143770 A
 (43) 申请公布日 2020.12.29
 (83) 生物保藏信息
 CGMCC No.20092 2020.06.16
 (73) 专利权人 清华苏州环境创新研究院
 地址 215000 江苏省苏州市高新区科技城
 锦峰路158号16号楼
 专利权人 苏州聚维元创生物科技有限公司
 (72) 发明人 张天元 李振
 (74) 专利代理机构 天津市君砚知识产权代理有
 限公司 12239
 专利代理师 张东浩

(51) Int.Cl.
 C12P 23/00 (2006.01)
 C12N 1/16 (2006.01)
 C12R 1/645 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 105779551 A, 2016.07.20
 CN 108977493 A, 2018.12.11
 CN 101705193 A, 2010.05.12
 CN 108531409 A, 2018.09.14
 WO 2017047651 A1, 2017.03.23
 CN 103820378 A, 2014.05.28
 仓一华.“高产 β -胡萝卜素红酵母
 (*Rhodotorula glutinis*)的研究”.《中国优秀博
 硕士学位论文全文数据库 (硕士)基础科学辑》
 .2002, (第2期), A006-144.

审查员 傅瑶

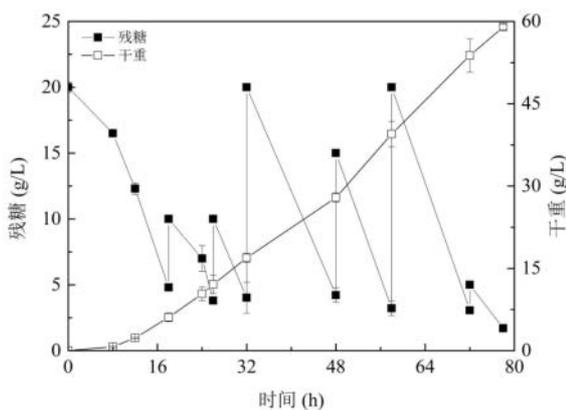
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种海洋红酵母及其在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种海洋红酵母及其在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素(β -carotene, BC)的方法。农业秸秆是一类分布广泛、数量庞大、处理困难的可再生有机资源,本发明以酶水解经蒸汽爆破与碱法预处理后得到的秸秆纤维,得到水解液,水解液脱色后投加额外营养,用于培养海洋红酵母,所得菌体直接提取 β -胡萝卜素,摆脱传统 β -胡萝卜素规模生产的局限性,同时提升秸秆的回用价值。本发明中海洋红酵母的生物量可达59 g/L,葡萄糖菌体得率为0.5~0.6, β -胡萝卜素的产量为550~650 μ g/g干菌体。



1. 一种海洋红酵母,其特征是:所述海洋红酵母为海洋红酵母(Rhodospiridium paludigenum THUZTY2026),保藏日期:2020年06月16日,保藏单位名称及简称:中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),保藏地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏号CGMCC No.20092。

2. 根据权利要求1所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是:

(1) 秸秆的预处理:以常见农业秸秆为原料,采用饱和蒸汽进行爆破后,使用无机碱处理,制得秸秆纤维;

(2) 纤维水解液的制备:采用酶水解法将秸秆纤维水解为单糖溶液,制得纤维水解液;

(3) 纤维水解脱色液的制备:将所述纤维水解液脱色处理,然后用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,制得纤维水解脱色液;步骤(3)中,所述纤维水解脱色液的具体制备条件为:采用活性炭进行纤维水解液的脱色处理,每百毫升水解液的活性炭投加量0.5-1.0g,脱色温度45-55 $^{\circ}$ C,脱色时间20-40min,充分去除水解液中的有色物质;采用离心或过滤的方式去除水解液中的活性炭;然后采用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,灭菌条件为115 $^{\circ}$ C,保温15min;

(4) 种子液的制备:将所述海洋红酵母的菌种斜面制成菌悬液接入种子培养基中培养,制得种子液;所述种子培养基中含有纤维水解脱色液;其中种子培养基配方:每升基础培养基中加入10g纤维水解脱色液,以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计,2g酵母粉,25g海水晶,所述基础培养基为,各原料的单位以mg/L计:771.5 尿素、264 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、75 $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 、36 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H_3BO_3 、1.86 $MnCl_4 \cdot 4H_2O$ 、0.22 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.08 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.39 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.05 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$;

(5) 发酵生产 β -胡萝卜素:将上述所得种子液接入发酵培养基中,接种量为10%,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;

发酵生产 β -胡萝卜素,单批次发酵时,发酵培养基配方:每升基础培养基中加入30g纤维水解脱色液,以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计,2g酵母粉,25g海水晶,所述基础培养基为,各原料的单位以mg/L计:771.5 尿素、264 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、75 $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 、36 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H_3BO_3 、1.86 $MnCl_4 \cdot 4H_2O$ 、0.22 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.08 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.39 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.05 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$;或者,

发酵生产 β -胡萝卜素,分批补料发酵时,所得种子液接入初始发酵培养基中培养,当残糖浓度低于5g/L时,补加经浓缩的纤维水解脱色液,按葡萄糖消耗速率控制水解液流加速度,同时补加其他培养基成分,待葡萄糖已充分利用后,可离心收获,一个发酵周期总葡萄糖消耗量不大于100g/L;其中初始发酵培养基配方:每升基础培养基中加入10-20g纤维水解脱色液,以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计,2g酵母粉,25g海水晶,所述基础培养基为,各原料的单位以mg/L计:771.5 尿素、264 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、75 $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 、36 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H_3BO_3 、1.86 $MnCl_4 \cdot 4H_2O$ 、0.22 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.08 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.39 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.05 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$;纤维水解脱色液的浓缩采用旋转蒸发仪进行,55 $^{\circ}$ C, -0.1Mpa,浓缩至糖浓度为300~400g/L之间即可;

(6) β -胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入二甲基亚砷提取,取上清液,重复直至菌体无色,提取液合并后干燥即得 β -胡萝卜素。

3. 根据权利要求2所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是:步骤(1)-(3)的具体步骤为:

1) 将秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对秸秆进行预处理,脱去部分木质素;蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为210-250 $^{\circ}$ C,压力为0.2-1.2Mpa,保温时间为2-8min;

2) 经蒸汽爆破的秸秆随后采用无机碱进行处理,充分脱除木质素后,提取秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;所述无机碱为氢氧化钠与亚硫酸钠;所述氢氧化钠重量:

秸秆原料绝干重为1:(4-6),亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:(3-5);处理条件为:反应温度为150-160 $^{\circ}$ C,时间为1-3h;

3) 将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 4-6,固液比1:5-1:30,单位质量纤维的酶投加量5-50FPU,

反应温度50-55 $^{\circ}$ C,反应时间24-48h,振荡速率200转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为15-60g/L;采用离心或压滤的形式,将水解液与剩余残渣分开,制得纤维水解液。

4. 根据权利要求2所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是:种子液的具体制备条件为:将海洋红酵母菌种斜面制成菌悬液接入种子培养基中,置于30 $^{\circ}$ C培养箱恒温培养,振荡速率为200转/分钟,培养24h。

5. 根据权利要求2所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是:发酵生产 β -胡萝卜素的具体条件为:将上述所得种子液接入发酵培养基中,接种量为10%,在25~30 $^{\circ}$ C条件下培养,振荡或搅拌速率为150~250转/分钟,充分曝气,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;发酵生产 β -胡萝卜素时,可单批次发酵或分批补料发酵。

6. 根据权利要求2所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是: β -胡萝卜素提取的具体条件为:将所得菌体加入适量DMSO,室温震荡提取10min,取提取液,反复直至菌体无色,合并提取液即得 β -胡萝卜素。

7. 根据权利要求2所述的海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用,其特征是:所述常见农业秸秆对应的常见农业物为小麦、水稻、玉米、薯类、油菜、棉花、甘蔗或芦苇。

一种海洋红酵母及其在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物菌剂产品领域,具体涉及一种海洋红酵母及其在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用。

背景技术

[0002] β -胡萝卜素(β -carotene, BC)是一种普遍存在于植物中的天然色素,颜色为黄色至橙红色,是类胡萝卜素中的一种。 β -胡萝卜素属于脂溶性维生素,是人体和动物合成维生素A的主要来源,具有较强的抗氧化性、良好的抗癌作用、对免疫系统的调节作用和着色功能,广泛应用于食品、饲料、医药及化妆品工业。 β -胡萝卜素的来源主要分为植物提取、化学合成和微生物发酵。植物提取受到原料、气候、产地等一系列条件限制,难以大量生产;化学合成存在一定食品安全风险,这两种方法都不能满足当今市场的需求。微生物发酵生产 β -胡萝卜素具有时间短、产率高、成本低且不受时间气候影响的优势,同时得到的产品纯天然、无食品安全风险,是当今的主流方向。一些藻类(如盐藻)、细菌和真菌(如三孢布拉霉、红酵母)都可以生产 β -胡萝卜素。盐藻和三孢布拉霉是目前市场上生产 β -胡萝卜素采用的两种主要菌株,就具有增殖快、含量高的优势;但盐藻的生长对光照及营养条件要求较高、藻种容易退化,而三孢布拉霉的发酵液粘度大、溶解氧难以利用,在规模生产上具有一定的局限性。红酵母生产 β -胡萝卜素含量虽不及前述两种菌株,但具有生长速度快、发酵周期短、发酵容易控制、菌种稳定等优点,可以弥补上述两种菌株发酵生产的缺点;同时,红酵母还含有丰富的蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、糖类等各种生理活性物质,可以直接用作饲料添加剂或水产养殖饵料,具有很好地应用价值和开发前景。

[0003] 农业秸秆是一类分布广泛、数量庞大、处理困难的可再生有机资源,解决农业废弃物回用问题对于减少环境污染、促进社会可持续发展具有重要意义。若能将农业秸秆开发利用生产 β -胡萝卜素将具有重要的价值。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种海洋红酵母及其制备方法和应用。本发明发现了一种海洋红酵母且可以高效应用在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素的方法中,该方法可以在低成本条件下,以农业秸秆为原料,快速高浓度生产海洋红酵母,从而摆脱传统 β -胡萝卜素生产菌株发酵生产的条件束缚,大幅降低 β -胡萝卜素的生产成本。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种海洋红酵母,其特征是:所述海洋红酵母为海洋红酵母(*Rhodospiridium paludigenum* THUZTY2026),保藏日期:2020年06月16日,保藏单位名称及简称:中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),保藏地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏号CGMCC No.20092。

[0007] 所述海洋红酵母经优选所得:海南红树林收集落叶后采用松花粉垂钓法分离得到

二十多株红酵母,使用高浓度秸秆水解液进行培养,经过反复筛选驯化,选出对秸秆水解液耐受性、适应性最强、 β -胡萝卜素生产能力最强的一株,再经过秸秆水解液连续传代驯化培养,最终获得秸秆水解液驯化菌株;使用分子生物学手段对其18S rDNA序列进行比对,发现该菌株与海洋红酵母的18S rDNA序列的同源性为100%,判定本菌株属于海洋红酵母。

[0008] 本发明还提供了海洋红酵母在以秸秆为原料生产 β -胡萝卜素中的应用:

[0009] (1) 秸秆的预处理:以常见农业秸秆为原料,采用饱和蒸汽进行爆破后,使用无机碱处理,制得秸秆纤维;

[0010] (2) 纤维水解液的制备:采用酶水解法将秸秆纤维水解为单糖溶液,制得纤维水解液;

[0011] (3) 纤维水解脱色液的制备:将所述纤维水解液脱色处理,然后用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,制得纤维水解脱色液;

[0012] (4) 种子液的制备:将所述海洋红酵母的菌种斜面制成菌悬液接入种子培养基中培养,制得种子液;所述种子培养基中含有纤维水解脱色液;

[0013] (5) 发酵生产 β -胡萝卜素:将上述所得种子液接入发酵培养基中,接种量为10%,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;

[0014] (6) β -胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入DMSO(二甲基亚砷)提取,取上清液,重复直至菌体无色,提取液合并后干燥即得 β -胡萝卜素。作为进一步优选的技术方案:

[0015] 优选的,步骤(1)中,纤维水解液的制备的具体步骤为:

[0016] 1) 将秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对秸秆进行预处理,脱去部分木质素;蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为210-250 $^{\circ}$ C,压力为0.2-1.2 Mpa,保温时间为2-8 min。

[0017] 2) 经蒸汽爆破的秸秆随后采用无机碱进行处理,充分脱除木质素后,提取秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;所述无机碱为氢氧化钠与亚硫酸钠(碱处理可以有效去除大部分木质素,保留纤维素和绝大部分半纤维素。在高温碱性条件下,木质素可以和亚硫酸根离子发生磺化反应从而使得木质素脱落,同时去除有机酸,利于纤维素和半纤维的水解。碱处理过程中包含大量的腐殖酸,可用于后续有机肥的制作,而植物对钠离子较敏感,氢氧化钠为常用碱处理试剂,故优选为氢氧化钠和亚硫酸钾的混合溶液。);所述氢氧化钠重量:秸秆原料绝干重为1:(4-6),亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:(3-5);处理条件为:反应温度为150-160 $^{\circ}$ C,时间为1-3 h;

[0018] 3) 将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠(或同类具备缓冲效应的缓冲对)缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 4 - 6,固液比1:5-1:30,单位质量纤维的酶投加量5 - 50 FPU(滤纸酶活单位),反应温度50-55 $^{\circ}$ C,反应时间24-48 h(随酶投加量而变),振荡速率200 转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为15~60 g/L,本发明使用酶水解纤维是因为酶水解过程几乎不生成糠醛类物质。

[0019] 4) 采用离心或压滤的形式,将水解液与剩余残渣分开,制得纤维水解液。

[0020] 优选的,所述纤维水解脱色液的具体制备条件为:采用活性炭进行纤维水解液水解脱色处理,每百毫升水解液的活性炭投加量0.5-1.0 g,脱色温度45-55 $^{\circ}$ C,脱色时间20-40 min,充分去除水解液中的有色物质;采用离心或过滤的方式去除水解液中的活性炭;然后采用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,灭菌条件为115 $^{\circ}$ C,保温15 min。活性炭可以去除纤维水解液中残留的糠醛、木质素等抑制物及一些色素,出去除率可达80%以

上,利于后续酵母的培养,且所制得的产物不受纤维水解液颜色的影响。

[0021] 优选的,种子液的具体制备条件为:将海洋红酵母菌种斜面制成菌悬液接入种子培养基中,置于30℃培养箱恒温培养,振荡速率为200 转/分钟,培养24 h;其中种子培养基配方:每升基础培养基中加入10 g纤维水解脱色液葡萄糖(即以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计),2 g酵母粉,25 g海水晶,所述基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0022] 优选的,发酵生产β-胡萝卜素的具体条件为:将上述所得种子液接入发酵培养基中,接种量为10%,在25~30℃条件下培养,振荡(或搅拌)速率为150~250 转/分钟,充分曝气,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体。

[0023] 优选的,β-胡萝卜素提取的具体条件为:将所得菌体加入适量DMSO,室温震荡提取10 min,取提取液,反复直至菌体无色,合并提取液即得β-胡萝卜素。本发明也可以采用其他溶剂如丙酮、正己烷等用于提取,但需要前期酸碱或酶法破壁后提取;DMSO无需前处理可直接对菌体进行提取,使工艺更加简单快捷。

[0024] 优选的,发酵生产β-胡萝卜素,单批次发酵时,发酵培养基配方:每升基础培养基加入30 g秸秆纤维水解脱色液,2 g 酵母粉,25 g海水晶;所述基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0025] 优选的,发酵生产β-胡萝卜素,分批补料发酵时,所得种子液接入初始发酵培养基中培养,当残糖浓度低于5 g/L时,补加纤维水解脱色液,按葡萄糖消耗速率控制水解液流加速度,同时补加其他培养基成分,待葡萄糖已充分利用后,可离心收获,一个发酵周期总葡萄糖消耗量不大于100 g/L;其中初始发酵培养基配方:每升基础培养基加入10~20 g纤维水解脱色液葡萄糖(初始)(即以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计),2 g 酵母粉,25 g海水晶,L/L;其中基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0026] 优选的,所述常见农业秸秆为成熟农作物的茎叶(穗)部分,或其他纤维素组成物;常见农业物小麦、水稻、玉米、薯类、油菜、棉花、甘蔗、芦苇或木本植物的枝干均可用于制备水解液。

[0027] 发明原理:

[0028] 现有技术生产β-胡萝卜素主要集中于利用盐藻或三孢布拉霉生产或以葡萄糖为原料利用红酵母生产,还未见以农业秸秆为原料利用海洋红酵母生产β-胡萝卜素的报道。纤维(包括纤维素和半纤维素)是秸秆的主要成分,占秸秆总重的60%~80%。纤维经水解后可制得可发酵性糖溶液,理论上可用于微生物的培养发酵。但是现有工艺制备秸秆糖(如酸法制糖等)对秸秆中抑制物的去除效果不理想,还易产生大量发酵抑制物(如糠醛、羟甲基糠醛、呋喃和有机酸等),浓度远远高于微生物的耐受上限。因此,现有的秸秆纤维水解液无法满足微生物的生产需求。

[0029] 而本发明中秸秆水解液时采用蒸汽爆破-碱处理-酶水解-活性炭脱色这一工艺流程获得,其中:

[0030] 1) 蒸汽爆破秸秆可去除部分木质素,并将大纤维撕裂为细小纤维,利于后续的处理;

[0031] 2) 碱处理时,在高温条件下,木质素可以和亚硫酸根离子发生磺化反应从而使得木质素脱落,同时可以有效去除秸秆中的有机酸类物质;

[0032] 3) 酶水解过程几乎不生成糠醛类物质;

[0033] 4) 活性炭脱色去除残留糠醛、木质素等,去除率可达80%及以上。

[0034] 经过上述方法制得的纤维水解液,大部分发酵抑制物已有效的去除,适用于大部分微生物的培养。

[0035] 以小球藻举例来说:糠醛与木质素的耐受浓度分别为130 $\mu\text{g/L}$ 与110 mg/L 。以浓酸法水解秸秆纤维可产生大量糠醛和羟甲基糠醛,生成量在0.8-2.2 mL/L ,该浓度远高于微藻的耐受限(130 $\mu\text{g/L}$)。由于在浓酸水解过程中,副产物的生成与纤维的水解几乎同步,进一步优化反应条件、降低副产物生成的效果有限,因此,浓酸水解液很难适用于培养小球藻。而通过本发明提出的方法制得的水解液,酶水解获得的水解液中糠醛含量低于7.3 $\mu\text{g/L}$,可溶性木质素含量低于183 mg/L ,再经过脱色可去除80%的糠醛与木质素,整套工艺流程获得的纤维脱色水解液中发酵抑制物的含量处于极低水平,完全适用于小球藻的发酵培养。

[0036] 有益效果

[0037] 本发明提供了一种生产 β -胡萝卜素的海藻红酵母,该海藻红酵母在农业秸秆水解溶液中有很强的适应性,可用于培养海藻红酵母,从而生产 β -胡萝卜素。

[0038] 本发明经蒸汽爆破-碱处理-酶水解-活性炭脱色制得的纤维水解液中,发酵抑制物(糠醛、羟甲基糠醛、呋喃、有机酸等)已大部分去除,含量远低于微生物生长的耐受浓度。以其为基质培养海藻红酵母可以高效快速获得高浓度海藻红酵母;同时可以弥补传统 β -胡萝卜素菌株生产发酵的缺点,具有生长速度快、发酵周期短、发酵容易控制、菌种稳定等优点。开发基于水解液的海藻红酵母培养与 β -胡萝卜素生产技术,对于实现 β -胡萝卜素的高效优质生产及秸秆的资源化利用具有重要意义。

[0039] 本发明中海藻红酵母的生物量可达50 g/L 以上,葡萄糖菌体得率为0.50~0.60, β -胡萝卜素的产量为550~650 $\mu\text{g/g}$ 干菌体。

附图说明

[0040] 图1为实施例1海藻红酵母(*Rhodospiridium paludigenum* THUZTY2026)在小麦秸秆纤维水解液培养基中糖浓度变化和生物量积累图。

[0041] 图2为实施例2海藻红酵母(*Rhodospiridium paludigenum* THUZTY2026)在水稻秸秆纤维水解液培养基中葡萄糖浓度变化和生物量积累图。

具体实施方式

[0042] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。

[0043] 实施例1

[0044] (1)纤维水解液的制备:

[0045] 1)将小麦秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对小麦秸秆进行预处理,蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为230℃,压力为0.2 Mpa,保温时间为2 min;

[0046] 2)经蒸汽爆破的小麦秸秆随后采用氢氧化钠和亚硫酸钠进行处理,氢氧化钠重量:小麦秸秆原料绝干重为1:4,亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:5,处理条件为:反应温度为150℃,时间为1 h。充分脱除木质素后,提取小麦秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;

[0047] 3)将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠(或同类具备缓冲效应的缓冲对)缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 5,固液比1:8,单位质量纤维的酶投加量10 FPU(滤纸酶活单位),反应温度50摄氏度,反应时间48 h,振荡速率200转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为50 g/L;

[0048] 4)采用离心或压滤的形式,将水解液与剩余残渣分开,制得纤维水解液。

[0049] (2)纤维水解脱色液的制备:采用活性炭进行纤维水解液水解液的脱色处理,按每百毫升体积加入0.8 g活性炭,50℃、40 转/分钟脱色处理20 min,采用离心或过滤的方式去除水解液中的活性炭;然后采用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,灭菌条件为115℃,保温15 min。

[0050] (3)种子液的制备:将海洋红酵母菌种斜面制成菌悬液接入种子培养基中,置于30℃培养箱恒温培养,振荡速率为200 转/分钟,培养24 h;其中种子培养基配方:每升基础培养基加入10 g纤维水解脱色液葡萄糖(即以纤维水解脱色液中的葡萄糖浓度计),2 g酵母粉,25 g海水晶;其中基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0051] (4)发酵生产β-胡萝卜素:将上述所得种子液接入装有50 mL培养基的250 mL锥形瓶中,接种量为10%,培养温度25℃,震荡速度为250 转/分钟,充分曝气,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;其中发酵培养基配方:每升基础培养基加入30 g小麦秸秆水解液葡萄糖,2 g 酵母粉,25 g海水晶;其中基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。最终测得菌体干重为15.57 g/L,葡萄糖的菌体得率为0.52。海洋红酵母(*Rhodospiridium paludigenum*THUZTY2026)在小麦秸秆纤维水解液培养基中糖浓度变化和生物量积累如图1所示。

[0052] (5)β-胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入适量DMSO,室温震荡10 min,取提取液,反复操作至菌体无色,合并提取液即得β-胡萝卜素。

[0053] 最终测得β-胡萝卜素的浓度为550 μg/g 干菌体。

[0054] 实施例2

[0055] (1)纤维水解液的制备:

[0056] 1)将水稻秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对水稻秸秆进行预处理,蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为210℃,压力为1.2 Mpa,保温时间为8 min;

[0057] 2)经蒸汽爆破的小麦秸秆随后采用氢氧化钠和亚硫酸钠进行处理,氢氧化钠重量:水稻秸秆原料绝干重为1:6,亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:3,处理条件为:反应温度为

160℃,时间为1 h。充分脱除木质素后,提取小麦秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;

[0058] 3) 将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠(或同类具备缓冲效应的缓冲对)缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 5,固液比1:8,单位质量纤维的酶投加量10 FPU(滤纸酶活单位),反应温度50摄氏度,反应时间48 h,振荡速率200转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为60 g/L;

[0059] (2) 水解液的脱色处理:

[0060] 同实施例1步骤(2)。

[0061] (3) 种子液制备:

[0062] 同实施例步骤(3)。其中种子培养基配方:每升基础培养基加入10 g 水稻秸秆水解液葡萄糖,2 g酵母粉,25 g海水晶;其中基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0063] (4) 分批补料发酵生产β-胡萝卜素:将上述所得种子液接入初始培养基中,接种量为10%,培养温度30℃,搅拌速度为200转/分钟。当残糖浓度低于5 g/L时,补加水解液,葡萄糖浓度按菌体葡萄糖消耗速率计算控制,发酵48 h后补加50%的其他培养基成分,当总葡萄糖消耗达100 g/L时,发酵结束收获菌体。其中初始发酵培养基配方:每升基础培养基加入10-20 g水稻秸秆水解液葡萄糖(初始),2 g 酵母粉,25 g海水晶;其中基础培养基(mg/L):771.5尿素、264 磷酸氢二钾·3H₂O、75 MgSO₄·2H₂O、36 CaCl₂·2H₂O、6 柠檬酸、6 柠檬酸铁铵、2.86 H₃BO₃、1.86 MnCl₄·4H₂O、0.22 ZnSO₄·7H₂O、0.08 CuSO₄·5H₂O、0.39 Na₂MoO₄·2H₂O、0.05 CO(NO₃)₂·6H₂O。

[0064] 最终测得菌体干重为60.00 g/L,葡萄糖的菌体得率为0.6。

[0065] 海洋红酵母(*Rhodospiridium paludigenum*THUZTY2026)在水稻秸秆纤维水解液培养基中葡萄糖浓度变化和生物量积累如图2所示。

[0066] (5) β-胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入适量DMSO,室温震荡10 min,取提取液,反复操作至菌体无色,合并提取液即得β-胡萝卜素。

[0067] 最终测得β-胡萝卜素的浓度为650 μg/g干菌体。

[0068] 实施例3

[0069] (1) 纤维水解液的制备:

[0070] 1) 将玉米秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对玉米秸秆进行预处理,蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为250℃,压力为0.6 Mpa,保温时间为5 min;

[0071] 2) 经蒸汽爆破的玉米秸秆随后采用氢氧化钠和亚硫酸钠进行处理,氢氧化钠重量:玉米秸秆原料绝干重为1:5,亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:5,处理条件为:反应温度为150℃,时间为2 h。充分脱除木质素后,提取玉米秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;

[0072] 3) 将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠(或同类具备缓冲效应的缓冲对)缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 4,固液比1:5,单位质量纤维的酶投加量50 FPU(滤纸酶活单位),反应温度55摄氏度,反应时间48 h,振荡速率200转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为45 g/L;

[0073] (2) 纤维水解脱色液的制备:采用活性炭进行纤维水解液水解液的脱色处理,每百

毫升水解液的活性炭投加量1.0 g,脱色温度55℃,脱色时间40 min;(采用离心或过滤的方式去除水解液中的活性炭;然后采用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,灭菌条件为115℃,保温15 min。

[0074] (3)种子液的制备:同实施例1。

[0075] (4)发酵生产 β -胡萝卜素:将上述所得种子液接入发酵培养基中,接种量为10%,在28℃条件下培养,振荡(或搅拌)速率为150 转/分钟,充分曝气,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;其中发酵培养基配方:每升基础培养基加入30 g玉米秸秆水解液葡萄糖,2 g酵母粉,25 g海水晶。基础培养基的配比如实施例2。

[0076] 最终测得菌体干重为15.05 g/L,葡萄糖的菌体得率为0.5。

[0077] (5) β -胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入适量DMSO,室温震荡10 min,取提取液,反复操作至菌体无色,合并提取液即得 β -胡萝卜素。

[0078] 最终测得 β -胡萝卜素浓度为589 $\mu\text{g/g}$ 干菌体。

[0079] 实施例4

[0080] (1)纤维水解液的制备:

[0081] 1)将棉花秸秆原料洗净切碎,采用蒸汽爆破对棉花秸秆进行预处理,蒸汽爆破条件如下:饱和蒸汽温度为250℃,压力为1.0 Mpa,保温时间为6 min;

[0082] 2)经蒸汽爆破的棉花秸秆随后采用氢氧化钠和亚硫酸钠进行处理,氢氧化钠重量:棉花秸秆原料绝干重为1:6,亚硫酸钠:氢氧化钠重量比为1:5,处理条件为:反应温度为150℃,时间为3 h。充分脱除木质素后,提取小麦秸秆纤维,脱水并充分洗去残留碱液;

[0083] 3)将秸秆纤维浸泡在乙酸-乙酸钠(或同类具备缓冲效应的缓冲对)缓冲液中,投加纤维素酶,将纤维浆水解为高浓度糖溶液;水解条件如下:pH 6,固液比1:30,单位质量纤维的酶投加量5 FPU(滤纸酶活单位),反应温度51摄氏度,反应时间24 h(随酶投加量而变),振荡速率200 转/分钟;水解后,水解液中的葡萄糖浓度约为15 g/L。

[0084] (2)纤维水解脱色液的制备:采用活性炭进行纤维水解液水解液的脱色处理,每百毫升水解液的活性炭投加量0.5 g,脱色温度45℃,脱色时间30 min;(脱色条件同理)采用离心或过滤的方式去除水解液中的活性炭;然后采用高温高压法杀灭水解液中的细菌和孢子,灭菌条件为115℃,保温15 min。

[0085] (3)种子液的制备:同实施例1。

[0086] (4)发酵生产 β -胡萝卜素:将上述所得种子液接入装有50 mL培养基的250 mL锥形瓶中,接种量为10%,培养温度30℃,震荡速度为200 转/分钟,充分曝气,待海洋红酵母充分利用纤维水解脱色液中的糖分后,脱水干化,收获菌体;其中发酵培养基配方:每升基础培养基加入30 g棉花秸秆水解液葡萄糖,2 g酵母粉,25 g海水晶;基础培养基的配比实施如例2。纤维水解浓缩采用旋转蒸发仪进行,55℃,-0.1 Mpa,浓缩至糖浓度为300~400 g/L之间。

[0087] 最终测得菌体干重为17.56 g/L,葡萄糖的菌体得率为0.59。

[0088] (5) β -胡萝卜素的提取:将所得菌体直接加入适量DMSO,室温震荡10 min,取提取液,反复操作至菌体无色,合并提取液即得 β -胡萝卜素。

[0089] 最终测得 β -胡萝卜素浓度为625 $\mu\text{g/g}$ 干菌体。

[0090] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,对于本技术领域的普通技术人

员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的发明内容。

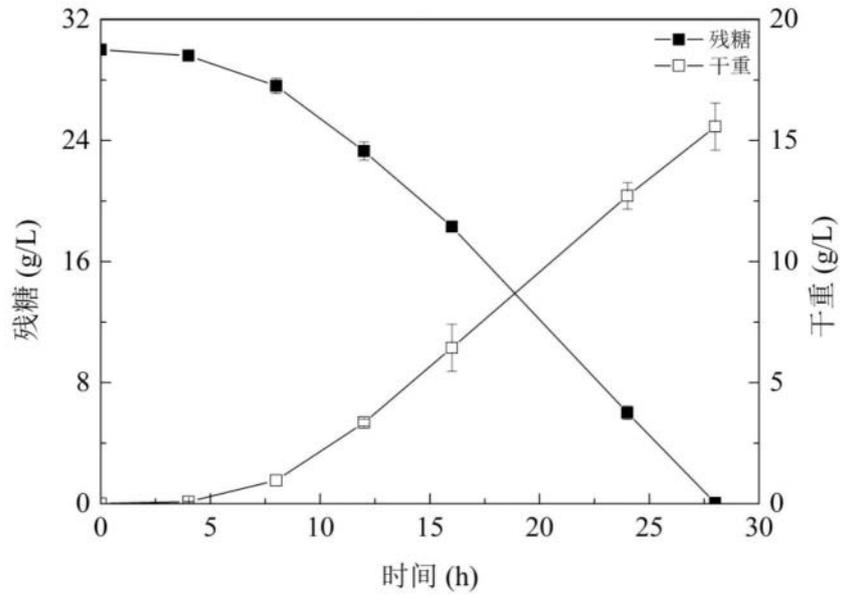


图1

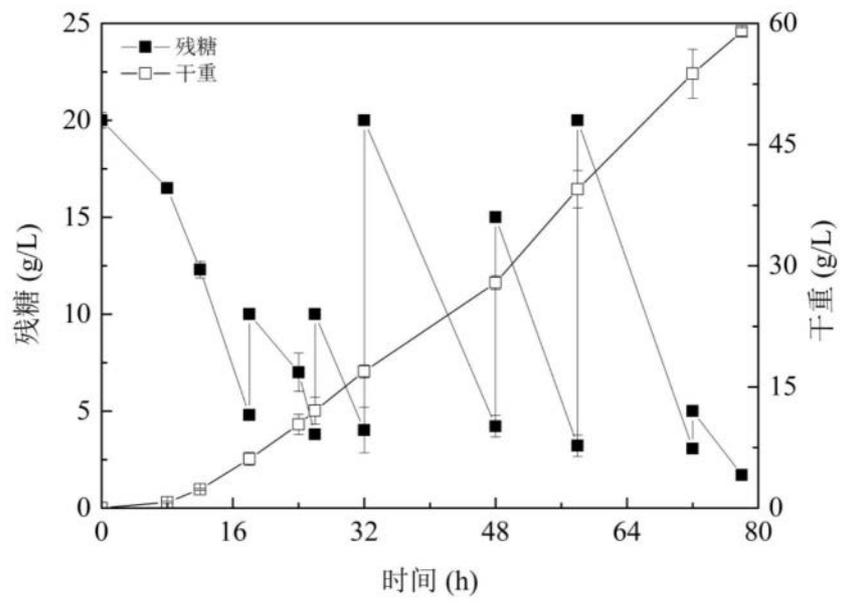


图2