



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114107105 B

(45) 授权公告日 2022.09.30

(21) 申请号 202111408647.4

C12P 7/24 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.24

C12R 1/01 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114107105 A

审查员 印丽娟

(43) 申请公布日 2022.03.01

(73) 专利权人 陕西海斯夫生物工程有限公司  
地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区自  
贸大街火炬园C1

(72) 发明人 孟永宏 强珊 郭建琦 牛永洁  
杨璐

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11305  
专利代理师 吕世静

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种含有水果渣酶解液的发酵培养基及其  
应用

(57) 摘要

本发明提供一种含有水果渣酶解液的发酵培养基,所述发酵培养基中水果渣酶解液的总糖含量为以发酵培养基总量计40-80g/L,所述水果渣酶解液包括质量比计0.8~1.2:0.8~1.2的苹果渣酶解液和梨渣酶解液。本发明还提供一种香兰素产量更高的拟无枝酸菌(Amycolatopsis sp.)发酵方法。本发明利用苹果和梨混合的水果渣酶解产物作为发酵培养基的碳源,一方面可以解决苹果渣-梨渣大量产生所造成的环境污染问题,从而为苹果渣-梨渣附加值的提升、综合利用提供新途径;同时也为香兰素的大规模生产找到一种廉价的发酵原料,从而降低其生产成本。

1. 一种含有水果渣酶解液的发酵培养基,其特征在于所述发酵培养基中水果渣酶解液的总糖含量为以发酵培养基总量计40g/L,所述水果渣酶解液包括质量比计1:1的苹果渣酶解液和梨渣酶解液,所述发酵培养基还含有酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;

所述苹果渣酶解液的制备方法为:

(1) 苹果渣的预处理:称取苹果渣20g,加入180g 质量浓度为4.5%、pH为11.5的过氧化氢溶液,混合均匀后静置,然后煮沸,过滤产物并收集苹果渣,用水冲洗至pH呈中性,烘干后得到预处理的苹果渣;

(2) 苹果渣的酶解:称取10g预处理的苹果渣于500mL锥形瓶中,加入190g 0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,酶终质量浓度为以苹果渣质量计30 $\mu$ L/g,充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50 $^{\circ}$ C孵育30h,反应结束后煮沸5min,过滤收集滤液,所得滤液浓缩至总糖质量浓度为55-65%即为苹果渣酶解液;

梨渣酶解产物的制备方法为:

(1) 梨渣的预处理:称取梨渣20g,加入113.3g质量浓度为4.5%、pH为11.5的过氧化氢溶液,混合均匀后静置,然后煮沸,过滤收集梨渣,用水冲洗至pH呈中性,烘干后得到预处理的梨渣;

(2) 梨渣的酶解:称取10g预处理后的梨渣于500mL锥形瓶中,加入240g 0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,酶终质量浓度为以梨渣质量计50 $\mu$ L/g,充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50 $^{\circ}$ C孵育72h,反应结束后煮沸5min,过滤收集滤液,所得滤液浓缩至总糖质量浓度为55-65%即为梨渣酶解液。

2. 权利要求1所述的含有水果渣酶解液的发酵培养基在拟无枝酸菌(*Amycolatopsis sp.*)发酵制备香兰素中的应用。

3. 一种拟无枝酸菌(*Amycolatopsis sp.*)发酵制备香兰素的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 菌株活化:取一管-80 $^{\circ}$ C保藏的拟无枝酸菌(*Amycolatopsis sp.*),在GYM固体平板上稀释涂布,然后将平板倒置于30 $^{\circ}$ C培养箱中培养3-4d至长出白色菌落;

其中,GYM固体培养基配方为:葡萄糖4g/L、酵母提取物4g/L、麦芽提取物10g/L、碳酸钙2g/L、琼脂粉20 g/L;

(2) 种子培养:从步骤(1)的平板上接一环菌于50mL种子培养基M1中,在30 $^{\circ}$ C、200rpm培养72h,直到OD<sub>600</sub>为10-12;

所述M1种子培养基配方为:葡萄糖25g/L,酵母浸粉10g/L,氯化钠0.8g/L,磷酸二氢钾5g/L,七水硫酸镁0.2g/L,氯化钙0.05g/L,其余为水,调节pH为7.2;

(3) 发酵培养:取步骤(2)的培养基作为种子液按照质量比5%的接种量接种到5L发酵罐中,所述发酵罐中装有4L根据权利要求1所述的发酵培养基,在30 $^{\circ}$ C、搅拌转速800rpm、通气比1vvm条件下发酵培养;培养24 $\pm$ 4h后,加入第一批底物阿魏酸0.9L,调节pH为8.2并继续发酵;当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.5L,继续发酵直到阿魏酸不在转化,发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度;

所述底物阿魏酸底物是将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使阿魏酸终浓度为125g/L得

到的。

## 一种含有水果渣酶解液的发酵培养基及其应用

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及发酵技术领域,特别涉及一种含有水果渣酶解液的发酵培养基,还涉及使用该发酵培养基发酵拟无枝酸菌产香兰素的方法。

### 【背景技术】

[0002] 香兰素又称香草醛(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛),是世界上使用最广泛的调味料之一,在食品、药品、化妆品、农业等领域被广泛应用。香兰素具有“食品香料之王”的美称,有香荚兰豆香气及浓郁的奶香,可在食品中起到助香、增味的作用;在医药方面,香兰素是合成多种药物的重要原料;香兰素在化妆品、香水等领域可作为调香剂;在农业生产中也可作为农作物的催熟剂和增产剂。由于其广泛的使用领域,国内外所生产出的香兰素远远不能满足目前的市场需求。

[0003] 目前,市场上香兰素的生产方式主要包括植物提取、化学合成、微生物转化。随着消费者对天然香料需求的不断增长,利用微生物转化天然底物生产香兰素受到重视。目前,所用的天然底物主要是可再生资源阿魏酸或丁香酚等。其中阿魏酸,因其在自然界中分布广泛,且对微生物毒性作用小,而被认为是微生物生产香兰素首选的前体物质。在以阿魏酸为底物生产香兰素中,大部分采用的转化培养基中碳源是葡萄糖,此外还有玉米浆、可溶性淀粉等。在工业生产中,寻求更为廉价的碳源等原料也是香兰素制备的一个研究方向。

[0004] 中国发明专利申请CN 2021109397312公开了一株拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)HM-141,其保藏编号为CGMCC No.22871。这株拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)HM-141是从西安、咸阳、渭南等地果树周围采集的土壤样品后,经常规技术进行分离,然后诱变后鉴定获得的。其中,所述诱变是以分离所得的原始菌株为出发菌株,进行紫外-亚硝酸钠复合诱变筛出高产香兰素的菌株。

[0005] 取一管-80℃保藏的甘油菌种*Amycolatopsis* sp.HM-141,在固体平板上稀释涂布,平板倒置于30℃培养箱中培养3-4d至长出菌落。然后从活化平板上接一环菌到种子培养基中,在30℃培养48-72h,转速为200rpm。

[0006] 将种子液按照5%的接种量接种到5L发酵罐中(含有4L发酵培养基),在30℃发酵培养,搅拌转速为800rpm,通气比为1vvm。培养24h后,加入底物阿魏酸22.5g/L(共90g,按照4L发酵液体积计算的阿魏酸浓度,将阿魏酸溶于0.5M NaOH溶液中使其浓度为100g/L),然后调节pH为8.2,继续发酵48h。

[0007] 用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度为15.13g/L,残留的阿魏酸浓度为0.4g/L,如果不计入未参与转化的残留阿魏酸,则摩尔转化率为87%。副产物香兰酸的含量为0.25g/L,发酵液中未检测到香兰醇,确认该菌株为一株高产香兰素的菌株。

[0008] 然而,进一步提高香兰素的产量依然是本领域的技术追求。我国是世界第一苹果汁生产大国,生产的苹果汁占全世界苹果汁产量的70%,年产量超过百万吨,伴随着的是苹果汁生产的副产品苹果渣的数量巨大。苹果渣富含可溶性糖类、有机酸、维生素、矿物质、纤维素等营养成分,如果得不到合理利用,不但会造成极大的资源浪费,也会污染环境。而利

用苹果渣酶解产物进行香兰素的生产,能够降低其生产成本,为工业化生产提供技术支撑。  
[0009] 另外,我国梨果产业发达,2017年我国梨总产量达到1641万吨。梨的深加工主要以浓缩果汁、饮料和罐头为主,梨渣是梨汁提取过程中的废弃副产物,总量约占原鲜果重量的40%-50%。以年产1万吨天然梨汁工厂为例,其每年扔掉的梨渣约达2-3千吨。由于梨渣中含有大量石细胞,粗加工适口性较差,回收利用率低,不宜当饲料处置,只能作为废料丢弃,造成大量浪费,并且容易污染环境。目前对梨渣的研究较少,主要集中在梨渣膳食纤维的研究。

### 【发明内容】

[0010] 本发明的目的是利用现有技术的空白,提供一种新的发酵培养基,通过选择培养基中适当的碳源以进一步提高拟无枝酸菌的香兰素产量。

[0011] 本发明的思路是将苹果渣和梨渣酶解产物作为转化原料生产香兰素,为苹果渣和果渣的资源化利用提供新途径。

[0012] 基于此,本发明提供一种含有水果渣酶解液的发酵培养基,所述发酵培养基中水果渣酶解液的总糖含量为以发酵培养基总量计35-45g/L,所述水果渣酶解液包括质量比计0.8~1.2:0.8~1.2的苹果渣酶解液和梨渣酶解液。

[0013] 根据一种优选的实施方式,所述水果渣酶解液包括质量比计1:1的苹果渣酶解液和梨渣酶解液。

[0014] 在本发明中,总糖含量是由以下方法测定的:

[0015] 测定采用HPLC进行分析,色谱柱为Aminex HPX-87H型离子排斥色谱柱,5 $\mu$ m,300mm $\times$ 7.8mm;柱温55 $^{\circ}$ C;流速:0.5mL/min;进样体积20 $\mu$ L;流动相为0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;检测器为示差折光检测器。

[0016] 在本发明中,苹果渣和梨渣购自陕西咸阳阿果安娜果汁有限公司,是果汁饮料技术领域中苹果汁或梨汁制作工艺中产生的废料。

[0017] 在本发明中,所述的发酵培养基中的苹果渣酶解液的制备方法为:

[0018] (1) 苹果渣的预处理:称取苹果渣20g,加入180g质量浓度为4.5%、pH为11.5的过氧化氢溶液,混合均匀后静置,然后煮沸,过滤产物并收集苹果渣,用水冲洗至pH呈中性,烘干后得到预处理的苹果渣;

[0019] (2) 苹果渣的酶解:称取10g预处理的苹果渣于500mL锥形瓶中,加入190g 0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50 $^{\circ}$ C孵育30h,反应结束后煮沸5min,过滤收集滤液,所得滤液浓缩至总糖质量浓度为55-65%即为苹果渣酶解液;

[0020] 梨渣酶解产物的制备方法为:

[0021] (1) 梨渣的预处理:称取梨渣20g,加入113.3g质量浓度为4.5%、pH为11.5的过氧化氢溶液,混合均匀后静置,然后煮沸,过滤收集梨渣,用水冲洗至pH呈中性,烘干后得到预处理的梨渣;

[0022] (2) 梨渣的酶解:称取10g预处理后的梨渣于500mL锥形瓶中,加入240g 0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和

HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50℃孵育72h,反应结束后煮沸5min,过滤收集滤液,所得滤液浓缩至总糖质量浓度为55-65%即为梨渣酶解液。

[0023] 其中,苹果渣酶解液的制备方法中,步骤(1)的使用2M的氢氧化钠溶液将过氧化氢溶液调节pH为11.5;步骤(2)中,向苹果渣加入柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2后,固形物含量为50g/L,酶终质量浓度为30μL/g(以苹果渣质量计)。

[0024] 类似地,梨渣酶解液的制备方法中,步骤(1)的使用2M的氢氧化钠溶液将过氧化氢溶液调节pH为11.5;步骤(2)中,向梨渣加入柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2后,固形物含量为40g/L,酶终质量浓度为50μL/g(以梨渣质量计)。

[0025] 在本发明中,纤维素酶CTec2和HTec2是诺维信公司以名称纤维素酶CTec2、纤维素酶HTec2销售的产品。

[0026] 根据一种特别优选的实施方式,所述水果渣酶解液的总糖含量为以发酵培养基总量计40g/L,所述水果渣酶解液包括质量比计1:1的苹果渣酶解液和梨渣酶解液。

[0027] 在本发明中,发酵培养基还含有酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L。

[0028] 本发明还提供上述的含有水果渣酶解液的发酵培养基在拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)发酵制备香兰素中的应用。

[0029] 基于此,本发明还提供一种拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)发酵制备香兰素的方法,所述方法包括以下步骤:

[0030] (1) 菌株活化:取一管-80℃保藏的拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.),在GYM固体平板上稀释涂布,然后将平板倒置于30℃培养箱中培养3-4d至长出白色菌落;

[0031] (2) 种子培养:从步骤(1)的平板上接一环菌于50mL种子培养基M1中,在30℃、200rpm培养72h,直到OD<sub>600</sub>为10-12;

[0032] (3) 发酵培养:取步骤(2)的培养基作为种子液按照质量比5%的接种量接种到5L发酵罐中,所述发酵罐中装有4L发酵培养基,发酵培养基含有水果渣酶解液的发酵培养基,水果渣酶解液的总糖含量为以发酵培养基总量计40-80g/L,在30℃、搅拌转速800rpm、通气比1vvm条件下发酵培养;培养24±4h后,加入第一批底物阿魏酸0.9L,调节pH为8.2并继续发酵;当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.5L,继续发酵直到阿魏酸不在转化,发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度;

[0033] 所述底物阿魏酸底物是将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使阿魏酸终浓度为125g/L得到的。

[0034] 优选地,所述水果渣酶解液含有以质量计1:1的苹果渣酶解液和梨渣酶解液。

[0035] 在本发明中,所述GYM固体培养基配方为:葡萄糖4g/L、酵母提取物4g/L、麦芽提取物10g/L、碳酸钙2g/L、琼脂粉20g/L,其余为水;

[0036] 所述M1种子培养基配方为:葡萄糖25g/L,酵母浸粉10g/L,氯化钠0.8g/L,磷酸二氢钾5g/L,七水硫酸镁0.2g/L,氯化钙0.05g/L,其余为水,调节pH为7.2;

[0037] 所述发酵培养基配方为:水果渣酶解液中总糖含量是以培养基总量计40-80g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L,其余为水。

[0038] 作为一种特别优选的实施方式,本发明所用的拟无枝酸菌是拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)HM-141,该菌株已于2021年7月9日保藏于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中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏编号为CGMCC No.22871。

[0039] 在本发明中,采用2,4-二硝基苯肼显色法测定香兰素的产量:发酵转化后期每4h从96孔板的培养液中取出10 $\mu$ L菌液于24深孔板内,加入100 $\mu$ L 2,4-二硝基苯肼溶液和5mL 0.8mol/L的NaOH溶液,混匀,以蒸馏水作为空白对照,同时以出发菌株作为对照组,然后检测吸光度。

[0040] 本发明通过实验验证,发酵培养基的碳源由葡萄糖改为水果渣酶解液时,可以提高香兰素的产量,并且当水果渣酶解液中总糖含量为40g/L时,本发明的拟无枝酸菌 *Amycolatopsis* sp.HM-141的香兰素浓度达到24.59g/L,摩尔转化率达到89.67%,进一步提高了拟无枝酸菌以阿魏酸为底物发酵产香兰素的产量。

[0041] 本发明利用苹果渣-梨渣混合果渣酶解产物发酵生产香兰素,一方面可以解决苹果渣-梨渣大量产生所引起的环境污染问题,从而为苹果渣-梨渣附加值的提升、综合利用提供新途径;同时也为香兰素的大规模生产找到一种廉价的发酵原料,从而降低其生产成本,具有重要的工业应用价值。

### 【具体实施方式】

[0042] 通过下述实施例将能够更好地理解本发明。

[0043] 在本发明中,如无特殊说明,用于解释浓度的“%”均为质量百分比,用于解释比例的“:”均为质量比。

[0044] 本发明涉及以下培养基:

[0045] GYM固体培养基配方为:葡萄糖4g/L、酵母提取物4g/L、麦芽提取物10g/L、碳酸钙2g/L、琼脂粉20g/L。

[0046] M1种子培养基配方为:葡萄糖25g/L,酵母浸粉10g/L,氯化钠0.8g/L,磷酸二氢钾5g/L,七水硫酸镁0.2g/L,氯化钙0.05g/L,其余为水,调节pH为7.2。

[0047] 实施例1:苹果渣酶解产物的制备

[0048] 对苹果渣预处理:苹果干渣(购买自陕西咸阳阿果安娜果汁有限公司)粉碎过筛至20目备用。称取苹果渣20g,用4.5%、pH为11.5(使用2M的氢氧化钠调节pH)的过氧化氢溶液预处理苹果渣(苹果渣含量为以总重计10%),在50 $^{\circ}$ C条件下放置2h,结束后煮沸5min终止反应,过滤收集苹果渣,用水冲洗至pH呈中性,然后放置于45 $^{\circ}$ C烘箱中烘干,得到预处理后的苹果渣。

[0049] 然后对苹果渣酶解:称取10g预处理后的苹果渣于500mL锥形瓶中,加入0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,固形物含量为50g/L,酶终质量浓度为30 $\mu$ L/g(以苹果渣质量计),充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50 $^{\circ}$ C孵育30h。酶解结束后,煮沸5min终止反应,过滤收集滤液。用旋转蒸发器浓缩滤液,用DNS法测定总糖含量,苹果渣酶解液中总糖含量为57%。

[0050] 苹果渣酶解液中的各种糖含量的测定采用HPLC进行分析,色谱柱为Aminex HPX-87H型离子排斥色谱柱,5 $\mu$ m,300mm $\times$ 7.8mm;柱温55 $^{\circ}$ C;流速:0.5mL/min;进样体积20 $\mu$ L;流动相为0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;检测器为示差折光检测器。

[0051] 苹果渣酶解液中的糖种类及其含量如下表1所示:

组分	纤维二糖	葡萄糖	阿拉伯糖	木糖	半乳糖
[0052] 含量 (%)	48.15	32.50	8.51	5.58	5.26

[0053] 实施例2:梨渣酶解产物的制备

[0054] 对梨渣进行预处理:梨干渣(购买自陕西咸阳阿果安娜果汁有限公司)粉碎过筛至20目备用。称取梨渣20g,在梨渣含量为15%的条件下利用4.5%、pH为11.5(使用2M的氢氧化钠调节pH)的过氧化氢溶液预处理梨渣,在50℃条件下放置3h,结束后煮沸5min终止反应,过滤收集梨渣,用水冲洗至pH呈中性,然后放置于45℃烘箱中烘干,即得到预处理后的梨渣。

[0055] 然后对梨渣酶解:称取10g预处理后的梨渣于500mL锥形瓶中,加入0.05M、pH为4.8的柠檬酸缓冲液和纤维素酶Cellic CTec2和Cellic HTec2,其中纤维素酶CTec2和HTec2的酶活分别为195FPU/mL和94FPU/mL,固形物含量为40g/L,酶终质量浓度为50μL/g(以梨渣质量计),充分摇匀后放入恒温摇床中,150rpm、50℃孵育72h。酶解结束后,煮沸5min终止反应,过滤收集滤液。用旋转蒸发仪浓缩滤液,用DNS法测定总糖含量,梨渣酶解液中总糖含量为61%。

[0056] 梨渣酶解液中的各种糖含量的测定同实施例1。

[0057] 梨渣酶解液中的糖种类及其含量如下表2所示:

组分	葡萄糖	阿拉伯糖	木糖	半乳糖
[0058] 含量 (%)	55.32	18.17	16.76	9.75

[0059] 实施例3:以苹果-梨混合果渣酶解液为转化培养基的原料生产香兰素

[0060] 菌株活化:取一管-80℃保藏的甘油菌种Amycolatopsis sp.HM-141,在GYM固体平板上稀释涂布,平板倒置于30℃培养箱中培养3-4d至长出白色菌落。

[0061] 种子培养:从活化平板上接一环菌于50mL种子培养基M1中,在30℃、200rpm培养72h左右,直到OD600长到10-12之间。

[0062] 发酵培养:将种子液按照5%的接种量接种到5L发酵罐中(含有4L发酵培养基,发酵培养基分别为配方1、配方2、配方3),在30℃发酵培养,搅拌转速为800rpm,通气比为1vvm。培养24±4h后(OD600长至40±3),先加入第一批底物阿魏酸0.9L(将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使其浓度为125g/L),然后调节pH为8.2,继续发酵,当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.5L(共175g),继续发酵直到剩余阿魏酸浓度不再变化,表明阿魏酸不再转化(约72h),发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度。重复三次取平均值。

[0063] 发酵培养基:将葡萄糖发酵培养基中的40、60、80g/L葡萄糖替换为水果渣酶解液中总糖含量,其中苹果渣和梨渣酶解液的比例为1:1;发酵培养基配方1:水果渣酶解液中总

糖含量40g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方2:水果渣酶解液中总糖含量60g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方3:水果渣酶解液中总糖含量80g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L。

[0064] HPLC测定发酵液中香兰素方法是:发酵液离心,取上清液进行HPLC分析。采用安捷伦HPLC1260分析转化产物,色谱柱为依利特Hypersil ODS2,5 $\mu$ m,4.6mm $\times$ 250mm;检测波长295nm;柱温30 $^{\circ}$ C;流速:1mL/min;进样量:10 $\mu$ L;流动相为乙腈和0.5%磷酸水溶液,0-20min,10-20%乙腈,20-30min,20-10%乙腈。

[0065] 发酵结果如下表3所示。

[0066] 表3拟无枝酸菌及其工程菌株的发酵实验结果

发酵培养基	实际下罐体积 (L)	香兰素终浓度 (g/L)	剩余阿魏酸浓度 (g/L)	摩尔转化率 (%)
[0067] 配方 1	5.0	24.59	0.31	89.67
配方 2	5.0	22.13	2.50	80.70
配方 3	5.1	20.24	3.07	75.28

[0068] 从以上发酵结果可以看出,当发酵培养基的碳源采用水果渣酶解液时,本发明的拟无枝酸菌Amycolatopsis sp.HM-141可以利用阿魏酸生产香兰素,且当混合果渣酶解液中总糖含量为40g/L时,产生的香兰素浓度达到最高,为24.59g/L,并且发酵液中的底物阿魏酸余量很低,表明底物基本被全部转化为产物。因此,混合果渣酶解产物能够被Amycolatopsis sp.HM-141利用,并将阿魏酸转化为香兰素。

[0069] 实施例4:以葡萄糖为转化培养基的原料生产香兰素

[0070] 菌株活化和种子培养方法同实施例3。

[0071] 发酵培养:将种子液按照5%的接种量接种到5L发酵罐中(含有4L发酵培养基,发酵培养基分别为配方4、配方5、配方6),在30 $^{\circ}$ C发酵培养,搅拌转速为800rpm,通气比为1vvm。培养24 $\pm$ 4h后(OD600长至40 $\pm$ 3),先加入第一批底物阿魏酸0.8L(将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使其浓度为125g/L),然后调节pH为8.2,继续发酵,当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.4L(共150g),继续发酵直到剩余阿魏酸浓度不再变化,表明阿魏酸不再转化(72h左右),发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度。

[0072] 发酵培养基配方4:葡萄糖40g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方5:葡萄糖60g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方6:葡萄糖80g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L。

[0073] 发酵结果如下表4所示。

[0074] 表4拟无枝酸菌及其工程菌株的发酵实验结果

发酵培养基	实际下罐体积 (L)	香兰素浓度 (g/L)	剩余阿魏酸浓度 (g/L)	摩尔转化率 (%)
[0075] 配方 4	5.1	19.53	0.20	84.75
配方 5	5.0	17.06	1.56	72.58
配方 6	5.1	15.24	2.87	66.13

[0076] 从以上发酵结果可以看出,当葡萄糖浓度为40g/L时,本发明的拟无枝酸菌Amycolatopsis sp.HM-141的香兰素浓度达到最高,为19.73g/L,并且发酵液中的底物阿魏

酸余量很低,表明底物基本被全部转化为产物。但是当以葡萄糖作为碳源时,终止发酵时发酵液中的香兰素浓度均低于以水果渣酶解液作为碳源时的香兰素浓度。

[0077] 对比例1:以苹果渣酶解产物为转化培养基的原料生产香兰素

[0078] 菌株活化和种子培养方法同实施例3。

[0079] 发酵培养:将种子液按照5%的接种量接种到5L发酵罐中(含有4L发酵培养基,发酵培养基分别为配方7、配方8、配方9),在30℃发酵培养,搅拌转速为800rpm,通气比为1vvm。培养24±4h后(OD600长至40±3),先加入第一批底物阿魏酸0.9L(将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使其浓度为125g/L),然后调节pH为8.2,继续发酵,当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.5L(共175g),继续发酵直到阿魏酸不再转化(72h左右),发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度。

[0080] 发酵培养基:将葡萄糖发酵培养基中的40、60、80g/L葡萄糖转化为苹果渣酶解液中总糖含量;发酵培养基配方7:苹果渣酶解液中总糖含量40g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方8:苹果渣酶解液中总糖含量60g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方9:苹果渣酶解液中总糖含量80g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L。

[0081] 发酵结果如下表5所示。

[0082] 表5拟无枝酸菌及其工程菌株的发酵实验结果

发酵培养基	实际下罐体积(L)	香兰素浓度(g/L)	剩余阿魏酸浓度(g/L)	摩尔转化率(%)
[0083] 配方7	5.0	20.16	1.58	73.52
配方8	5.1	19.53	3.23	72.64
配方9	5.1	17.49	4.46	65.05

[0084] 可见,当碳源浓度相同时,以苹果渣酶解液作为碳源比葡萄糖更有利于提高发酵液中香兰素终浓度,但浓度提高幅度较小,小于以本发明的水果渣酶解液作为碳源时,终止发酵时发酵液中的香兰素浓度。

[0085] 对比例2:以梨渣酶解产物为转化培养基的原料生产香兰素

[0086] 菌株活化和种子培养方法同实施例3。

[0087] 发酵培养:将种子液按照5%的接种量接种到5L发酵罐中(含有4L发酵培养基,发酵培养基分别为配方10、配方11、配方12),在30℃发酵培养,搅拌转速为800rpm,通气比为1vvm。培养24±4h后(OD600长至40±3),先加入第一批底物阿魏酸0.9L(将阿魏酸溶于0.65M NaOH溶液中使其浓度为125g/L),然后调节pH为8.2,继续发酵,当阿魏酸浓度降至3-4g/L时,再加入第二批底物阿魏酸0.5L(共175g),继续发酵直到阿魏酸不再转化(72h左右),发酵结束用HPLC测定发酵液中香兰素的浓度。

[0088] 发酵培养基:将葡萄糖发酵培养基中的40、60、80g/L葡萄糖转化为梨渣酶解液中总糖含量;发酵培养基配方10:梨渣酶解液中总糖含量40g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方11:梨渣酶解液中总糖含量60g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L;发酵培养基配方12:梨渣酶解液中总糖含量80g/L,酵母浸粉15g/L,七水硫酸镁1g/L。

[0089] 发酵结果如下表6所示。

[0090] 表6拟无枝酸菌及其工程菌株的发酵实验结果

	发酵培养基	实际下罐体积 (L)	香兰素浓度 (g/L)	剩余阿魏酸浓度 (g/L)	摩尔转化率 (%)
[0091]	配方 10	5.1	21.09	1.09	78.45
	配方 11	5.0	19.73	2.98	71.95
	配方 12	5.1	18.52	3.51	68.89

[0092] 同样可见,当碳源浓度相同时,以梨渣酶解液作为碳源比葡萄糖更有利于提高发酵液中香兰素终浓度,但浓度提高幅度较小,小于以本发明的水果渣酶解液作为碳源时,终止发酵时发酵液中的香兰素浓度。

[0093] 对比以上发酵结果可以看出,当转化培养基的碳源为苹果渣-梨渣混合的水果渣酶解液时,香兰素的产量最高,显著高于碳源为葡萄糖时的香兰素产量。

[0094] 然而,培养基中的碳源应当处于适当的浓度而非越高越好,当本发明的水果渣酶解液中总糖含量为40g/L时,本发明的拟无枝酸菌*Amycolatopsis* sp.HM-141的香兰素产物浓度达到最高24.59g/L。以上结果说明本发明的水果渣酶解液是一种优异的发醇碳源,可以进一步提高发醇生产香兰素的产量。

[0095] 综上所述,本发明利用苹果渣-梨渣混合果渣酶解产物发醇生产香兰素,一方面可以解决苹果渣-梨渣大量产生所引起的环境污染问题,从而为苹果渣-梨渣附加值的提升、综合利用提供新途径;同时也为香兰素的大规模生产找到一种廉价的发醇原料,从而降低其生产成本。