



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110551639 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201910865057.0

(22) 申请日 2019.09.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110551639 A

(43) 申请公布日 2019.12.10

(83) 生物保藏信息
CCTCC No. M 2019476 2019.06.20

(73) 专利权人 南京工业大学
地址 211800 江苏省南京市浦口区浦珠南
路30号

(72) 发明人 张志刚 黄和 慎立群 苍然
杨光

(74) 专利代理机构 南京业腾知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32321

代理人 李静

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104371955 A, 2015.02.25

审查员 邢云龙

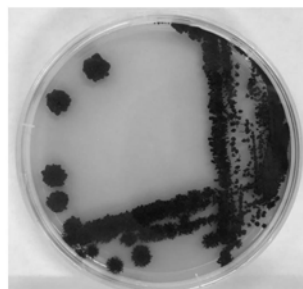
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种短梗霉菌株及其在2,5-二羟甲基呋喃合成中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种短梗霉菌株及其在合成2,5-二羟甲基呋喃中的应用,属于生物化学技术领域,该菌株为短梗霉F134,已保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏编号为CCTCC No.M 2019476,保藏日期为2019年6月20日。本发明利用短梗霉F134作为催化剂,能高效、高选择性地催化HMF转化为目标产物BHMF,并且克服了化学催化剂环境不友好的缺点,与已报道的生物催化工艺相比,本发明不仅底物浓度更高、反应效率更优异,而且选择性也更好。本发明反应过程简单,无需添加培养基,易控、条件温和,有利于简化后续目标产物的分离纯化工艺。



1. 一种短梗霉菌株在2,5-二羟甲基呋喃合成中的应用,该菌株为短梗霉 *Aureobasidium subglaciale* F134,已保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏编号为CCTCC No.M 2019476,保藏日期为2019年6月20日,保藏地址为中国武汉武汉大学。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,应用方法包含如下步骤:

(1) 将短梗霉菌株F134在PDA培养基中活化后,按1%的接种量接入新鲜PDA液体培养基中进行培养,收集菌体细胞;

(2) 将5-羟甲基糠醛加入到缓冲液中,制备成浓度为100~200mM的5-羟甲基糠醛溶液,然后往5-羟甲基糠醛溶液中加入步骤(1)的菌体细胞,在温度15~45℃、pH 5.0~10.0下进行反应,得到2,5-二羟甲基呋喃。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(1)中,活化条件:28℃,200r/min,活化36h。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(1)中,培养条件为:30℃,200r/min,培养72h。

5. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(2)中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液或甘氨酸-NaOH缓冲液中的任意一种,所述缓冲液pH为5.0~10.0。

6. 如权利要求2至5所述的应用,其特征在于,步骤(2)中,所述菌体细胞用量为20~400mg/mL。

一种短梗霉菌株及其在2,5-二羟甲基呋喃合成中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域,具体涉及一株短梗霉菌株及其在催化5-羟甲基糠醛选择性还原合成2,5-二羟甲基呋喃中的应用。

背景技术

[0002] 随着21世纪倡导以绿色能源替代石油资源以及在化学工业中寻求环保替代品的可持续发展理念的深入,生物质能源和生物技术在资源与环境问题日益严峻的当代占据着愈来愈关键的地位。5-羟甲基糠醛(HMF)被认为是最具价值和潜力替代石化工业中基础化学品的生物基平台化学品。是木质素预处理过程中的副产品,由己糖(主要是葡萄糖)脱水产生。人们对5-羟甲基糠醛的研究主要基于两个重要原因:一方面,生物预处理水解液中的HMF会抑制许多微生物的生长,并具有一定的毒性作用,从而影响后续发酵合成化学品和燃料过程的产量和效率。另一方面,由于HMF分子上带有醛基、羟甲基和碳碳双键多个高活性官能团,可以催化氧化还原生成一系列呋喃类芳香化合物。当环上醛基被还原为羟基,得到HMF的还原产物2,5-呋喃二甲醇(2,5-bis-hydroxymethylfuran, BHMF)。BHMF作为一种高附加值的二醇,是有机合成中关键的桥梁化合物,在精细化学品合成、新型功能化聚醚、聚氨酯及药物的多杂环化合物的制备研究中都有着广泛应用。BHMF也是近年来兴起的一种新型燃油,能量密度高,与汽油相当;沸点高,挥发性较低,存储和使用中因损耗小;空气中较稳定且不易吸水;生产原料可以是纤维素等生物质,能够减少对化石能源和粮食的依赖,降低生产成本,利于保护环境(Tetrahedron, 2008, 64 (27) :6358-6363; Tetrahedron, 1996, 52 (2) :617-628; Progress in Polymer Science, 2011, 36 (2) :191-217; Journal of the American Chemical Society, 1974, 96 (22) :7159-7160; Synth. Commun., 2003, 33 (24) :4285-4295)。

[0003] 目前,由HMF制备BHMF化学转化法仍是主流。化学转化法已经取得较多进展,主要是以金属催化剂催化HMF选择性还原,在高压的氢气下选择性催化转移氢化(CTH)进行制备。例如,Mingwei Ma等人提出了一步法制备催化剂进行催化转移氢化反应,通过原位还原 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3/\text{AlOOH}$ 制得催化剂nano-Cu/AlOOH,160℃反应9h,HMF转化率大于99%,BHMF的得率也达到89.09%。由于催化剂中零价铜的稳定性以及催化剂纳米颗粒的稳定性使该非均相催化剂催化活性和稳定性较高(Molecular Catalysis, 2019, 467, 52-60)。Yanfu Ma等人采用表面活性剂辅助共沉淀法/水热结晶法制备掺杂 ZrO_2 的稀土金属掺杂 ZrO_2 ,以此负载Co并作为催化剂,在水中HMF选择性加氢制备BHMF,转化率和醇的选择性都达到100%。载体制备过程中,表面活性剂的加入改善了强金属-载体相互作用,共分散和稳定性得到促进。循环试验中,催化剂保持稳定,失活量小(ACS Catalysis, 2018, 8 (2) ,1268-1277)。然而,化学法反应需要较高温度和压力,同时存在产物选择性和底物耐受性差的问题;对反应装置的气密性、材质等要求较高;并且催化过程中使用的贵金属催化剂价格昂贵;由于氢气具有高分散性和易燃性,以氢气为氢供体对5-羟甲基糠醛进行加氢制备2,5-二羟甲基呋喃安全隐患较大,且目前氢气主要来源于化石资源,制氢成本也较高。

[0004] 利用生物催化剂可在温和的反应条件下以HMF为底物,转化生成BHMF,具有高产率和高选择性,同时保持高化学纯度,低副产物。但由于5-羟甲基糠醛对微生物细胞有毒害作用,因此,大部分微生物对HMF的底物耐受性浓度较低、且催化HMF转化速度慢。因此,筛选获得能耐受高浓度HMF、转化速度快,且选择性好的微生物对于以HMF为原料合成BHMF生物催化路径的建立尤为重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对上述现有技术的不足,提供一种短梗霉菌株,其对底物HMF具有高耐受性,并且能高效催化HMF选择性还原合成BHMF。

[0006] 本发明的技术方案为:

[0007] 一种短梗霉菌株,该菌株为短梗霉 (*Aureobasidium subglaciale*) F134,已保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏编号为CCTCC No.M 2019476,保藏日期为2019年6月20日,保藏地址为中国武汉武汉大学。

[0008] 所述短梗霉菌株F134是从新疆核爆试验区辐射污染土样中分离筛选出的。经微生物分类鉴定,确定该菌株属于短梗霉属 (*Aureobasidium*) 的新种,该菌株对辐射和重金属具有极强的耐受性。

[0009] 所述短梗霉菌株F134在2,5-二羟甲基呋喃合成中的应用。应用方法包含如下步骤:

[0010] (1) 将短梗霉菌株F134在PDA培养基中活化后,按1%的接种量接入新鲜PDA液体培养基中进行培养,收集菌体细胞;

[0011] (2) 将5-羟甲基糠醛加入到缓冲液中,制备成浓度为100~200mM的5-羟甲基糠醛溶液,然后往5-羟甲基糠醛溶液中加入步骤(1)的菌体细胞,在温度15~45℃、pH 5.0~10.0下进行反应,得到2,5-二羟甲基呋喃。

[0012] 步骤(1)中,PDA液体培养基配方为:马铃薯200g,葡萄糖20g,蒸馏水1000ml。

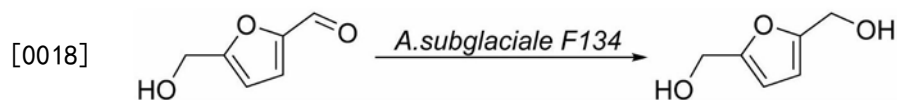
[0013] 进一步,步骤(1)中,活化条件:28℃,200r/min,活化36h。

[0014] 进一步,步骤(1)中,培养条件为:30℃,200r/min,培养72h。

[0015] 进一步,步骤(2)中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液或甘氨酸-NaOH缓冲液中的任意一种,所述缓冲液pH为5.0~10.0。

[0016] 进一步,步骤(2)中,所述菌体细胞用量为20~400mg/mL。

[0017] 反应式为:



[0019] 本发明的有益效果:与现有的技术相比,具有如下的优点:

[0020] 1) 本发明利用短梗霉F134作为催化剂,能高效、高选择性地催化HMF转化为目标产物BHMF,并且克服了化学催化剂环境不友好的缺点。

[0021] 2) 本发明利用的生物催化剂短梗霉F134对HMF具有高耐受性,能够催化高浓度底物(180mM)选择性还原合成目标产物,产率达70.4%。与已报道的生物催化工艺相比,本发明不仅底物浓度更高、反应效率更优异,而且选择性也更好。

[0022] 3) 本发明反应过程简单,无需添加培养基(添加培养基会使反应体系更加复杂),

易控、条件温和,有利于简化后续目标产物的分离纯化工艺。

[0023] 4)短梗霉F134对 γ 射线、UV射线、盐及重金属等极端环境有明显的耐受性,因此可不受工业生产条件的限制。

附图说明

[0024] 图1为短梗霉菌株F134在PDA固体培养基上培养72h后菌落形态图;

[0025] 图2为实施例1中反应5h后得到的合成产物的液相色谱图。

具体实施方式

[0026] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。所列的实施例仅作阐释之用,并表明本发明的精神和范围并非限于此中的细节及其修改案。

[0027] 本实施例使用的生物材料短梗霉(*Aureobasidium subglaciale*)F134,来源于新疆农业科学院微生物应用研究所,已保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏编号为CCTCC No.M 2019476,保藏日期为2019年6月20日,保藏地址为中国武汉武汉大学。

[0028] 实施例1

[0029] 短梗霉菌株F134的活化与培养:取短梗霉菌株F134接种于PDA液体培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,蒸馏水1000ml。)中,在28℃及200r/min下,活化36h;随后,按1%的接种量接入新鲜PDA培养基中,于30℃及200r/min下,培养72h,收集菌体细胞。短梗霉菌株F134在PDA固体培养基上培养72h后的菌落形态图见图1。

[0030] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.4)中加入0.25mmolL⁻¹羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于15℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为40.93%,BHMF产物选择性为90.56%,液相色谱图见图2,可以看出,BHMF及HMF的保留时间分别为5.326min和6.293min。

[0031] 其中,液相色谱检测的方法与条件分别为:仪器为Thermo Fisher ultimate 3000,检测器为UV检测器;检测波长为230nm;色谱柱为Sepax GP-C18 column(4.6mm×250mm,5 μ m);流动相为A:20mM KH₂PO₄;B:100%乙腈;梯度洗脱(0min:10%B;7min:24%B;10min:10%B);流速为1.0mL·min⁻¹;柱温为25℃;进样量为5 μ L。

[0032] 实施例2

[0033] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0034] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.4)中加入0.25mmolL⁻¹羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于25℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为83.15%,BHMF产物选择性为97.29%。

[0035] 实施例3

[0036] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0037] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 6.0)中加入0.25mmolL⁻¹羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为55.88%,BHMF产物选择性

为94.65%。

[0038] 实施例4

[0039] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0040] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.4)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于45℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为14.82%,BHMF产物选择性为72.76%。

[0041] 实施例5

[0042] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0043] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.0)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为69.39%,BHMF产物选择性为97.56%。

[0044] 实施例6

[0045] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0046] 在2.5mL Tris-HCl缓冲液(50mM,pH 8.0)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为40.89%,BHMF产物选择性为91.69%。

[0047] 实施例7

[0048] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0049] 在2.5mL Gly-NaOH缓冲液(50mM,pH 9.0)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,5h后,HMF转化率为64.30%,BHMF产物选择性为97.77%。

[0050] 实施例8

[0051] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0052] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.4)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按40mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,12h后,HMF转化率为29.55%,BHMF产物选择性为90.75%。

[0053] 实施例9

[0054] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0055] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM,pH 7.4)中加入0.25mmolL⁻¹ 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按80mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,12h后,HMF转化率为83.88%,BHMF产物选择性为96.32%。

[0056] 实施例10

[0057] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0058] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM, pH 7.4)中加入0.25mmol 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为100mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,12h后,HMF转化率为99.63%,BHMF产物选择性为93.21%。

[0059] 实施例11

[0060] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0061] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM, pH 7.4)中加入0.375mmol 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为150mM的HMF溶液,然后按200mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,12h后,HMF转化率为62.60%,BHMF产物选择性为93.99%。

[0062] 实施例12

[0063] 短梗霉菌株F134的活化与培养同实施例1。

[0064] 在2.5mL磷酸盐缓冲液(100mM, pH 7.4)中加入0.5mmol 5-羟甲基糠醛(HMF),制备成浓度为200mM的HMF溶液,然后按400mg/mL(按细胞湿重计)的浓度加入菌体细胞,于30℃及850r/min下反应,利用液相色谱监控反应,12h后,HMF转化率为55.33%,BHMF产物选择性为97.59%,36h后,HMF转化率为61.66%,BHMF产物选择性为96.13%。

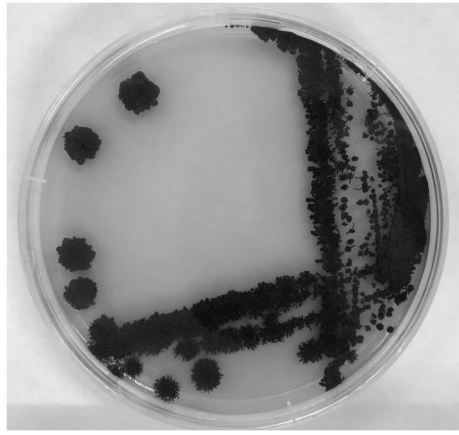


图1

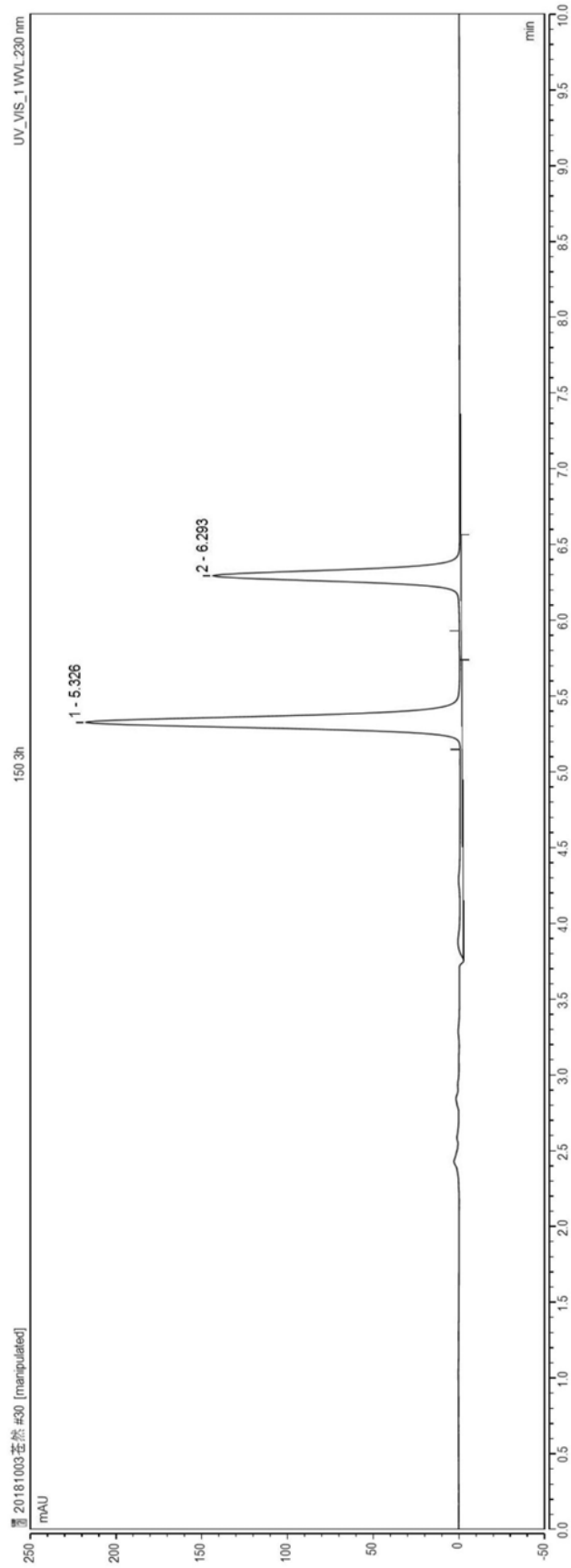


图2