



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110195084 B

(45) 授权公告日 2022.10.28

(21) 申请号 201910398145.4  
(22) 申请日 2019.05.14  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 110195084 A  
(43) 申请公布日 2019.09.03  
(83) 生物保藏信息  
    CCTCC NO: M2018731 2018.10.31  
(73) 专利权人 福建师范大学  
    地址 350117 福建省福州市大学城科技路1  
        号福建师范大学旗山校区  
(72) 发明人 朱虎 常爱平 王颖璐 陈雯丹  
        何侨妹 李丽 鱼晓丹 戴晓芸  
(74) 专利代理机构 北京悦成知识产权代理事务  
        所(普通合伙) 11527  
    专利代理师 樊耀峰 高艳丽

(51) Int.Cl.  
    C12N 1/14 (2006.01)  
    C12R 1/82 (2006.01)  
(56) 对比文件  
    CN 104862233 A, 2015.08.26  
    CN 1807581 A, 2006.07.26  
    Aiping Chang等. Tyrosol from marine  
    Fungi, a novel Quorum sensing inhibitor  
    against Chromobacterium violaceum and  
    Pseudomonas aeruginosa.《Bioorganic  
    Chemistry》. 2019, 第91卷1-7.

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称  
    对羟基苯乙醇的生产方法及产黄青霉的用途

(57) 摘要  
    本发明公开了一种产黄青霉 DXY-1 (Penicillium chrysogenum DXY-1) 在生产对羟基苯乙醇中的用途。本发明还公开了一种对羟基苯乙醇的生产方法, 包括使用产黄青霉 DXY-1 (Penicillium chrysogenum DXY-1) 的步骤。本发明首次采用产黄青霉生产对羟基苯乙醇, 其工艺简单, 对于拓展对羟基苯乙醇的工业化生产具有重要意义。

1. 一种产黄青霉DXY-1 (*Penicillium chrysogenum* DXY-1) 在生产对羟基苯乙醇中的用途, 所述产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO:M2018731。

2. 一种对羟基苯乙醇的生产方法, 其特征在于, 包括使用产黄青霉DXY-1 (*Penicillium chrysogenum* DXY-1) 的步骤, 所述产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO:M2018731。

3. 根据权利要求2所述的生产方法, 其特征在于, 包括如下具体步骤:

(1) 将产黄青霉DXY-1发酵培养获得发酵液的步骤;

(2) 将发酵液提取得到提取物的步骤; 和

(3) 将提取物分离纯化得到对羟基苯乙醇的步骤。

4. 根据权利要求3所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(1)中, 将活化的产黄青霉DXY-1接种于培养液中, 在25~30℃和100~300rpm下震荡培养50~100h, 得到种子培养液; 然后将种子培养液转接到培养基上, 在25~30℃和100~300rpm下震荡培养5~9天, 得到发酵液。

5. 根据权利要求4所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(1)中, 种子培养液的接种量为培养基重量的2~9wt%。

6. 根据权利要求5所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(1)中, 基于100ml海水, 所述培养液包括如下组分: 3~7wt%葡萄糖, 0.5~3.5wt%蛋白胨, 0.3~0.6wt%的NaCl, 和100ml海水; 基于100ml海水, 所述培养基包括如下组分: 3~7wt%葡萄糖, 0.5~3.5wt%蛋白胨, 0.3~0.6wt%的NaCl, 和100ml海水。

7. 根据权利要求3~6任一项所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(2)中, 将发酵液中的菌丝球破碎, 然后加入乙酸乙酯萃取1~5次, 将上清液浓缩得到提取物; 其中, 每次萃取所用的乙酸乙酯的量为发酵液的体积的0.8~1.5倍。

8. 根据权利要求3~6任一项所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(3)中, 将提取物溶于甲醇以形成甲醇溶液; 采用紫外检测器与凝胶柱层析串联, 以甲醇作为洗脱剂进行分离得到洗脱液; 将洗脱液分离为多个洗脱组分, 用紫色杆菌CV026筛选模型进行活性检测, 将具有活性的洗脱组分经过液相色谱分离, 得到对羟基苯乙醇。

9. 根据权利要求8所述的生产方法, 其特征在于, 在步骤(3)中, 将洗脱液采用薄层层析板展开, 并根据薄层扫描法的香草醛显色结果将相似组分合并和浓缩, 得到多个洗脱组分。

10. 根据权利要求9所述的生产方法, 其特征在于, 凝胶柱层析采用葡聚糖凝胶柱; 液相色谱的条件如下: 以20~35vol%的甲醇水溶液为流动相, 流速为0.5~1.0mL/min。

## 对羟基苯乙醇的生产方法及产黄青霉的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种产黄青霉DXY-1的用途,还涉及一种对羟基苯乙醇的生产方法。

### 背景技术

[0002] 对羟基苯乙醇又名4-羟基苯乙醇,俗名酪醇(Tyrosol),主要用于合成心血管药物美多心安。对羟基苯乙醇可以采用化学方法合成。以对羟基苯乙酮为原料先合成对羟基苯乙二醛,经过还原得到对羟基苯乙醇。以 $\beta$ -氨基苯乙醇为原料经过氧化得到对羟基苯乙醇。

[0003] 此外,对羟基苯乙醇还可以采用微生物发酵的方法获得。例如,CN109370967A公开了一种工程菌在酪醇生产中的应用,将氨基酸转氨酶、谷氨酸脱氢酶、酮酸脱羧酶和醇脱氢酶导入基因工程菌,用于合成酪醇。又如,CN108753636A公开了一种生产酪醇及羟基酪醇的酵母的构建方法,在酵母BY4741中构建酪醇或羟基酪醇生物合成途径以提高酪醇或羟基酪醇的产量。将PcAAS和ADH序列导入酵母BY4741,得到生产酪醇的PcAAS-ADH重组酵母;在所述PcAAS-ADH重组酵母中导入pdc1基因敲除盒、tyrA表达盒得到生产酪醇的PcAAS-ADH- $\Delta$ pdc1-tyrA重组酵母;将HpaBC的DNA序列导入PcAAS-ADH- $\Delta$ pdc1-tyrA重组酵母,得到生产羟基酪醇的PcAAS-ADH-HpaBC- $\Delta$ pdc1-tyrA重组酵母。再如,CN106754607A公开了一种产酪醇的重组菌株的构建方法,利用基因工程技术构建重组载体pRSFDuet-AR010-AR08,将其转化经过基因工程改造的敲除基因pheA和基因feaB的大肠杆菌BL21(DE3),获得菌株BE0,通过全细胞催化反应,以10mM酪氨酸为底物,发酵20h可产酪醇达6.73mM,酪氨酸转化率可达67.3%,在此重组菌的基础上,经过化学诱变,从而得到了一株性能优化高产酪醇的重组菌株BE2,通过全细胞催化反应,以10mM酪氨酸为底物,发酵20h可产酪醇达8.71mM,酪氨酸转化率可达87.1%。上述方法均通过基因过程来获得对羟基苯乙醇。因此,仍然需要扩展对羟基苯乙醇的生产方法。

[0004] 产黄青霉是一种属于半知菌亚门丝孢纲丝孢目(从梗孢目)从梗孢科青霉属的真菌,分布于土壤、空气及腐败的有机材料等基物。目前,还没有采用产黄青霉生产对羟基苯乙醇的报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的在于提供产黄青霉在生产对羟基苯乙醇中的用途。本发明的另一个目的在于提供一种对羟基苯乙醇的生产方法,其工艺简单。

[0006] 一方面,本发明提供一种产黄青霉DXY-1(*Penicillium chrysogenum* DXY-1)在生产对羟基苯乙醇中的用途,所述产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO:M2018731。本发明的生物材料的分类名称为产黄青霉DXY-1,拉丁文学名为*Penicillium chrysogenum* DXY-1,保藏单位的全称及简称为中国典型培养物保藏中心,保藏单位的地址为中国湖北省武汉市武汉大学,保藏日期为2018年11月15日,保藏编号为CCTCC NO:M2018731。

[0007] 另一方面,本发明提供一种对羟基苯乙醇的生产方法,包括使用产黄青霉DXY-1

(*Penicillium chrysogenum* DXY-1) 的步骤,所述产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO: M2018731。

[0008] 根据本发明的生产方法,优选地,包括如下具体步骤:

[0009] (1) 将产黄青霉DXY-1发酵培养获得发酵液的步骤;

[0010] (2) 将发酵液提取得到提取物的步骤;和

[0011] (3) 将提取物分离纯化得到对羟基苯乙醇的步骤。

[0012] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(1)中,将活化的产黄青霉DXY-1接种于培养液中,在25~30℃和100~300rpm下震荡培养50~100h,得到种子培养液;然后将种子培养液转接到培养基上,在25~30℃和100~300rpm下震荡培养5~9天,得到发酵液。

[0013] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(1)中,种子培养液的接种量为培养基重量的2~9wt%。

[0014] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(1)中,基于100ml海水,所述培养液包括如下组分:3~7wt%葡萄糖,0.5~3.5wt%蛋白胨,0.3~0.6wt%的NaCl,和100ml海水;基于100ml海水,所述培养基包括如下组分:3~7wt%葡萄糖,0.5~3.5wt%蛋白胨,0.3~0.6wt%的NaCl,和100ml海水。

[0015] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(2)中,将发酵液中的菌丝球破碎,然后加入乙酸乙酯萃取1~5次,将上清液浓缩得到提取物;其中,每次萃取所用的乙酸乙酯的量为发酵液的体积的0.8~1.5倍。

[0016] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(3)中,将提取物溶于甲醇以形成甲醇溶液;采用紫外检测器与凝胶柱层析串联,以甲醇作为洗脱剂进行分离得到洗脱液;将洗脱液分离为多个洗脱组分,用紫色杆菌CV026筛选模型进行活性检测,将具有活性的洗脱组分经过液相色谱分离,得到对羟基苯乙醇。

[0017] 根据本发明的生产方法,优选地,在步骤(3)中,将洗脱液采用薄层层析板展开,并根据薄层扫描法的香草醛显色结果将相似组分合并和浓缩,得到多个洗脱组分。

[0018] 根据本发明的生产方法,优选地,凝胶柱层析采用葡聚糖凝胶柱;液相色谱的条件如下:以20~35vol%的甲醇水溶液为流动相,流速为0.5~1.0mL/min。

[0019] 本发明首次采用产黄青霉生产对羟基苯乙醇,其工艺简单,对于拓展对羟基苯乙醇的工业化生产具有重要意义。

[0020] 保藏说明

[0021] 本发明的生物材料的分类名称为产黄青霉DXY-1,拉丁文学名为*Penicillium chrysogenum* DXY-1,保藏单位的全称及简称为中国典型培养物保藏中心,保藏单位的地址为中国湖北省武汉市武汉大学,保藏日期为2018年10月31日,保藏编号为CCTCC NO: M2018731。

## 具体实施方式

[0022] 本发明提供一种产黄青霉DXY-1(*Penicillium chrysogenum* DXY-1)在生产对羟基苯乙醇中的用途。产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO: M2018731。本发明首次采用产黄青霉DXY-1获得对羟基苯乙醇。

[0023] 海洋中蕴含着丰富的微生物资源,同时海洋相对独特的高压、高盐、低温、缺氧、

寡营养等生态环境赋予了海洋微生物独特的代谢机制,这大大增加了发现新颖先导化合物的机率。从海洋微生物次级代谢产物中,已经开发了许多具有很好治疗作用的化学药物,这说明海洋微生物是天然药物的重要宝库。本发明的产黄青霉DXY-1优选为海洋来源的产黄青霉,更优选为台湾海峡泥沙来源的产黄青霉。本发明首次采用海洋来源的产黄青霉DXY-1获得对羟基苯乙醇。

[0024] 本发明还提供一种对羟基苯乙醇的生产方法,包括使用产黄青霉 DXY-1 (*Penicillium chrysogenum* DXY-1) 的步骤。产黄青霉DXY-1的保藏编号为CCTCC NO: M2018731。

[0025] 本发明的用途和生产方法可以具有相同的步骤,下面进行统一描述。本发明包括如下具体步骤:(1)将产黄青霉DXY-1发酵培养获得发酵液的步骤;(2)将发酵液提取得到提取物的步骤;和(3)将提取物分离纯化得到对羟基苯乙醇的步骤。

[0026] 在步骤(1)中,将活化的产黄青霉DXY-1在培养液中培养得到种子培养液;然后将种子培养液在培养基上培养得到发酵液。本发明的活化方法并没有特别限制,例如采用平板活化。采用平板活化后,刮取适量菌丝接种于培养液中。二者的用量配比并没有特别限制。

[0027] 本发明的培养液可以为如下配方:基于100ml海水,所述培养液包括如下组分:3~7wt%葡萄糖,0.5~3.5wt%蛋白胨,0.3~0.6wt%的NaCl,和100ml海水。优选地,本发明的培养液可以为如下配方:3~6wt%葡萄糖,1~3wt%蛋白胨,0.3~0.6wt%的NaCl,和100ml海水。根据本发明的一个实施方式,本发明的培养液的配方为:3wt%葡萄糖,1wt%蛋白胨,0.3wt%的NaCl,和100ml海水。

[0028] 本发明的培养基包括如下组分:基于100ml海水,所述培养基包括如下组分:3~7wt%葡萄糖,0.5~3.5wt%蛋白胨,0.3~0.6wt%的NaCl,和100ml海水。;优选地,本发明的培养基可以为如下配方:4~6wt%葡萄糖,1~3wt%蛋白胨,0.4~0.6wt%的NaCl,和100ml海水。根据本发明的一个实施方式,本发明的培养基的配方为:5wt%葡萄糖,2wt%蛋白胨,0.5wt%的NaCl,和100ml海水。

[0029] 在某些实施方案中,将活化的产黄青霉DXY-1接种于培养液中,在25~30℃和100~300rpm下震荡培养50~100h,得到种子培养液。培养温度可以为25~30℃,优选为26~29℃,更优选为27~28℃。震荡速率可以为100~300rpm,优选为120~200rpm,更优选为150~180rpm。培养时间可以为50~100h,优选为60~90h,更优选为72~85h。

[0030] 在某些实施方案中,将种子培养液转接到培养基上,在25~30℃和100~300rpm下震荡培养5~9天,得到发酵液。培养温度可以为25~30℃,优选为26~29℃,更优选为27~28℃。震荡速率可以为100~300rpm,优选为120~200rpm,更优选为150~180rpm。培养时间可以为5~9天,优选为6~8天,更优选为6~7天。这样可以保证发酵充分,且提高发酵效率。种子培养液的接种量可以为培养基重量的2~9wt%,优选为3~8wt%,更优选为5~6wt%。

[0031] 在步骤(2)中,将发酵液中的菌丝球破碎得到处理液。例如采用匀浆机破碎发酵液中的菌丝球。将乙酸乙酯加入处理液中萃取,将上清液合并和浓缩得到提取物。萃取的次数可以为1~5次,优选为2~3次。浓缩可以采用旋转蒸发器进行。每次萃取所用的乙酸乙酯的量可以为发酵液的体积的0.8~1.5倍,优选为0.9~1.3倍,更优选为1~1.2倍。这

样有利于充分回收对羟基苯乙醇。

[0032] 在步骤(3)中,将提取物溶于甲醇以形成甲醇溶液。二者的用量配比并没有特别限制。任选地,将甲醇溶液经过高分子滤膜过滤以除去杂质。滤膜的孔径可以为0.1~1 $\mu\text{m}$ ,优选为0.1~0.5 $\mu\text{m}$ ,更优选为0.1~0.22 $\mu\text{m}$ 。采用紫外检测器与凝胶柱层析串联,以甲醇作为洗脱剂进行分离得到洗脱液。例如,用滴管将甲醇溶液沿着凝胶柱内壁一滴一滴地均匀加入凝胶柱内,用少量甲醇洗涤样品瓶形成的洗涤液也加入凝胶柱,然后打开凝胶柱下面的阀门。待样品液面下降到接近凝胶柱的表层,沿着凝胶柱内壁加入甲醇,重复加入几次甲醇,使得含提取物的甲醇溶液全部进入凝胶柱内,再加入大量甲醇进行洗脱。本发明的凝胶柱可以采用葡聚糖凝胶柱,例如Sephadex LH-20。

[0033] 在步骤(3)中,将洗脱液分离为多个洗脱组分。根据本发明的一个实施方式,将洗脱液采用薄层层析板展开,并根据薄层扫描法(TLC)的香草醛显色结果将相似组分合并和浓缩,得到多个洗脱组分。

[0034] 在步骤(3)中,将洗脱组分用紫色杆菌CV026筛选模型进行活性检测,将具有活性的洗脱组分经过液相色谱(例如HPLC)分离,得到对羟基苯乙醇。液相色谱的条件如下:以20~35vol%的甲醇水溶液为流动相,流速为0.5~1.0mL/min。优选的液相色谱的条件如下:以22~30vol%的甲醇水溶液为流动相,流速为0.7~0.9mL/min。更优选的液相色谱的条件如下:以25~28vol%的甲醇水溶液为流动相,流速为0.8~0.85mL/min。采用这样的条件有利于获得高纯度的对羟基苯乙醇。在液相色谱中,可以采用波长为210nm的紫外光进行检测。液相色谱可以采用C18色谱柱,例如ZORBAX SB-Aq。

[0035] 根据本发明的一个实施方式,将提取物溶于甲醇以形成甲醇溶液,将甲醇溶液经过孔径为0.1~0.22 $\mu\text{m}$ 的高分子滤膜过滤以除去杂质;采用UV-900紫外检测器与Sephadex LH20凝胶柱层析串联,以甲醇作为洗脱剂进行分离得到洗脱液;将洗脱液分离为多个洗脱组分,用紫色杆菌CV026筛选模型进行活性检测,将具有活性的洗脱组分经过液相色谱分离,以25vol%的甲醇水溶液为流动相,流速为0.8mL/min,采用波长为210nm的紫外光进行检测,分离纯化得到对羟基苯乙醇。

[0036] <测试方法>

[0037] 紫外光谱:将产物溶于甲醇中,然后利用紫外分光光度计(日本岛津,UV2450/2550)在波长200~800nm范围内,对样品进行扫描。

[0038] 核磁共振:将产物溶于氘代二甲基亚砷中,进行核磁分析,分析类型有氢谱( $^1\text{H-NMR}$ ),碳谱( $^{13}\text{C-NMR}$ )。核磁共振仪为布鲁克Bruker MSL 500。

[0039] 以下说明实施例采用的原料:

[0040] 培养液:葡萄糖3wt%,蛋白胨1wt%,NaCl 0.3wt%,海水 100ml。

[0041] 培养基:葡萄糖5wt%,蛋白胨2wt%,NaCl 0.5wt%,海水 100ml。

[0042] 实施例1

[0043] 对羟基苯乙醇的生产方法包括如下步骤:

[0044] (1) 将产黄青霉DXY-1发酵培养获得发酵液的步骤

[0045] 将平板活化后的产黄青霉DXY-1(来源于台湾海峡泥沙)接种于培养液中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 和150rpm下震荡培养72h,得到种子培养液;然后将种子培养液转接到培养基上,在28 $^{\circ}\text{C}$ 和150rpm下震荡培养7天,得到发酵液。种子培养液的接种量为培养基重量的5wt%。

[0046] (2) 将发酵液提取得到提取物的步骤

[0047] 将发酵液中的菌丝球破碎, 然后加入乙酸乙酯萃取3次, 将上清液合并, 并采用旋转蒸发器浓缩得到提取物; 每次萃取所用的乙酸乙酯的量为发酵液的体积的1倍。

[0048] (3) 将提取物分离纯化得到对羟基苯乙醇的步骤

[0049] 将提取物溶于甲醇以形成甲醇溶液, 采用孔径为0.22 $\mu$ m的滤膜过滤。采用紫外检测器(UV-900)与凝胶柱层析(Sephadex LH20)串联, 以甲醇作为洗脱剂对过滤后的甲醇溶液进行分离得到洗脱液。将洗脱液采用薄层层析板展开, 并根据薄层扫描法的香草醛显色结果将相似组分合并和浓缩, 得到13个洗脱组分。将洗脱组分用紫色杆菌CV026筛选模型进行活性检测, 将具有活性的洗脱组分经过液相色谱(以25vol%的甲醇水溶液为流动相, 流速为0.8mL/min, 采用波长为210nm的紫外光, 采用C18色谱柱ZORBAX SB-Aq)分离, 得到对羟基苯乙醇产物。

[0050] 实验例

[0051] 将实施例1得到的对羟基苯乙醇产物进行结构鉴定。

[0052] 紫外光谱显示, 在波长为275nm左右出现苯的特征吸收峰, 推测该化合物可能含有苯环。在波长为220nm处出现共轭双键体系形成的K吸收带, 说明该化合物中含有较多双键。

[0053] 核磁共振的氢谱( $^1\text{H}$  NMR)给出10个氢信号。低场区出现一个活泼氢信号( $\delta_{\text{H}}$  9.11, s, 4-OH), 芳香区出现4个苯环氢信号( $\delta_{\text{H}}$  6.99, d, H-4;  $\delta_{\text{H}}$  6.99, d, H-8;  $\delta_{\text{H}}$  6.63, d, H-5;  $\delta_{\text{H}}$  6.63, d, H-7;), 两两重叠且分裂为d峰, 表明可能含有1,4-二取代的苯环结构, 高场区出现一个亚甲基信号( $\delta_{\text{H}}$  2.60, t, H-2), 一个连氧的亚甲基信号( $\delta_{\text{H}}$  3.50, q, H-1)和一个连脂肪链上的活泼氢信号( $\delta_{\text{H}}$  4.55, t, 1-OH)。由此推测该化合物为苯的衍生物。

[0054] 核磁共振的碳谱( $^{13}\text{C}$  NMR)给出8个碳信号, 分别为6个苯环上的碳信号( $\delta_{\text{C}}$  129.8; 115.3; 130.0; 155.8; 130.0; 115.3)和2个高场区 $\text{SP}^3$ 杂化的碳信号( $\delta_{\text{C}}$  62.9, 38.6), 其中62.9处为连氧的碳信号, 38.6处为连苯环的碳信号。由此推测该化合物为对羟基苯乙醇。经过与文献中的对羟基苯乙醇的核磁数据进行对比, 确定该化合物为对羟基苯乙醇。该化合物的化学结构式如下所示:

[0055]

