



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109456899 B

(45) 授权公告日 2021.10.22

(21) 申请号 201811275868.7

(22) 申请日 2018.10.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109456899 A

(43) 申请公布日 2019.03.12

(83) 生物保藏信息
CGMCC No. 11854 2015.12.09

(73) 专利权人 云南大学
地址 650091 云南省昆明市五华区翠湖北
路2号

(72) 发明人 丁中涛 周皓 杨亚滨 段荣婷

(74) 专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限
公司 53115

代理人 赛晓刚

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107099464 A, 2017.08.29

KR 20170054899 A, 2017.05.18

CN 107841466 A, 2018.03.27

F.J.OLIVIGNI et al.. "Production of Penicillic Acid and Patulin by an Atypical *Penicillium roqueforti* Isolate". 《APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY》. 1978, 第35卷 (第2期), 第435-438页.

审查员 樊艳爽

权利要求书1页 说明书3页 附图4页

(54) 发明名称

一种青霉菌及其发酵生产青霉酸的方法

(57) 摘要

本发明公开一种青霉菌属微生物及其发酵生产青霉酸的方法,该青霉菌属微生物为云南昭通野生天麻中分离得到的内生真菌,利用该菌株发酵制备青霉酸的方法。主要步骤包括:在合适的培养条件下发酵菌株,经过溶剂超声提取、浓缩后,结合柱层析法,可制备大量的青霉酸,发酵液中浓度可达1.57~1.77g/L,提取分离后纯度可达到95~98%。该方法成本较低,过程简单,环境友好,可用于大量生产,不仅满足了低碳经济的需求,而且为青霉酸的进一步研究和相关产品开发奠定了基础。

1.青霉菌(*Penicillium* sp.)T2-8,其特征在于,保藏编号为CGMCC No.11854。

2.一种微生物代谢制备青霉素的方法,其特征在于,液体有氧发酵青霉菌T2-8制得青霉素,所述青霉菌T2-8保藏编号为CGMCC No.11854;

菌体活化:将青霉菌T2-8接种到经过121℃高温灭菌30min的PDA斜面培养基,置于28℃恒温培养箱中培养2~7d后,置于4℃冰箱中备用;

菌种制备:将活化的菌体接入PDB培养基中,27℃~30℃,150~200rpm下进行发酵2~4d;

发酵过程:将制备好的菌种按照体积分数5~10%加入发酵培养基中,27~30℃,150~200rpm下进行发酵12~14d;

发酵结束后,发酵液连同菌体超声破壁15~30min,再用等体积的乙酸乙酯萃取两次,真空浓缩得到粗提物,分离粗提物得到青霉素;

经薄层层析和高效液相色谱检测粗提物,青霉素为主要代谢产物,含量达粗提物的11.14~13.54%;然后经过凝胶柱层析分离,甲醇洗脱,通过NMR以及HR-ESI-MS确定其为青霉素。

3.青霉菌(*Penicillium* sp.)T2-8在制备青霉素中的应用,其中青霉菌的保藏编号为CGMCC No.11854。

一种青霉菌及其发酵生产青霉酸的方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及青霉酸的制备，具体来说涉及一株青霉菌及通过其代谢制备青霉酸的方法。

背景技术：

[0002] 近年来，因为微生物具有代谢周期短、转化反应条件温和、副产物少、立体选择性强等特点，通过微生物（真菌、细菌以及藻类）发酵来制备特定化合物的方法越来越受到人们的重视。在实际生产中，已经有大量的应用实例通过微生物发酵来生产一些具有研究价值及经济价值的化合物。

[0003] 青霉酸是一个由霉菌代谢产生的丁烯内酯类化合物，它对各种动物具有毒性，主要引起心脏、肝脏和肾脏等器官的损伤，并广泛存在于动物饲料中。同时青霉酸具有较好的反应活性，可作为前体化合物或中间体参与许多有机合成反应。因此青霉酸在生化研究、化学合成及医药领域具有一定的研究价值。

发明内容：

[0004] 本发明旨在提供了一种可大量生产青霉酸的生物方法，利用青霉菌发酵代谢制备青霉酸，发酵液中的浓度可达1.57~1.77g/L，提取分离后纯度可达到95~98%，具有过程简单，环境友好，易于大量生产等特点。

[0005] 为了达到上述目的，本发明提供了一种微生物有氧液体发酵生产青霉酸。首先本发明提供了一株青霉(*Penicillium* sp.)，保藏编号为CGMCC No. 11854。

[0006] 本发明还提供了利用青霉菌T2-8制备青霉酸的应用。

[0007] 具体说本发明提供了一种微生物代谢制备青霉酸的方法，通过有氧液体发酵青霉菌T2-8制得青霉酸。所述青霉菌T2-8保藏编号为CGMCC No.11854。

[0008] 优选方式下，以体积质量百分比计所述发酵培养基成分：1~3%葡萄糖，0.2~0.4%磷酸氢二钾，0.1~0.2%七水合硫酸镁，15~25%马铃薯汁1L，2~5毫克每升硫胺素。

[0009] 菌体活化：将青霉菌T2-8接种到经过121℃高温灭菌30min的PDA斜面培养基，置于28℃恒温培养箱中培养2~7d后，置于4℃冰箱中备用。

[0010] 菌种制备：将活化的菌体接入PDB培养基中，27~30℃，150~200rpm下进行发酵2~4d。

[0011] 发酵过程：将制备好的菌种按照体积分数5~10%加入发酵培养基中，27~30℃，150~200rpm下进行发酵12~14d。

[0012] 发酵结束后，发酵液连同菌体超声破壁15~30min，经高效液相色谱分析，发酵液中青霉酸浓度为1.57~1.77g/L。

[0013] 用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液两次，真空浓缩得到粗提物，经薄层层析和高效液相色谱检测粗提物，其主要代谢产物含量可达粗提物的11.14~13.54%。经过凝胶柱层

析分离(甲醇洗脱),通过NMR以及HR-ESI-MS鉴定确定化合物结构。经高效液相色谱分析其纯度可达95~98%。

[0014] 本发明是利用从云南昭通野生天麻内生真菌中筛选出的一株青霉菌制备青霉素的方法。通过青霉菌T2-8的生物合成能力,从其发酵液中提取分离代谢产物制备青霉素。

[0015] 本发明方法采用的原料便宜易得,反应条件温和、过程简单,设备要求简单,环境污染,适宜扩大化生产。

[0016] 保藏说明

[0017] 本发明涉及的生物材料样品的保藏信息:参据的微生物(株)为T2-8,分类命名为青霉(*Penicillium* sp.),已于2015年12月9日向中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC)提交保藏,保藏编号为CGMCC No. 11854。CGMCC地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

附图说明:

[0018] 图1为本发明中目标化合物的¹H-NMR;

[0019] 图2为本发明中目标化合物的¹³C-NMR;

[0020] 图3为本发明中目标化合物的HR-ESI-MS;

[0021] 图4为本发明中目标化合物的代谢动力学曲线。

具体实施方式:

[0022] 下面结合实施对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换及改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0023] 将采自云南昭通小草坝的野生天麻通过次氯酸钠溶液(有效氯浓度5.0%)、75%乙醇浸泡和无菌水洗涤工艺进行表面灭菌,然后把处理成小块的植物组织植入121℃灭菌的PDA双抗培养基中,25℃培养7天后使用121℃灭菌的PDA培养基连续纯化得到菌株T2-8,并将菌株接种于PDA斜面培养基中,在4℃冰箱中保存。结合形态学鉴定及16S rRNA分析,鉴定菌株T2-8为青霉属真菌(*Penicillium* sp.),保藏编号为CGMCC No.11854。

[0024] 实施例1:

[0025] 菌体活化:将青霉菌T2-8接种到经过121℃高温灭菌30min的PDA斜面培养基,置于28℃恒温培养箱中培养5d后,置于4℃冰箱中备用。

[0026] 菌种制备:将活化的菌体接入121℃高温灭菌30min的PDB培养基中,28℃,150rpm下进行发酵4d。

[0027] 发酵过程:将制备好的菌种按照体积分数10%加入121℃高温灭菌30min的发酵培养基中(以体积质量百分比计所述发酵培养基成分:2%葡萄糖,0.2%磷酸氢二钾,0.1%七水合硫酸镁,20%马铃薯汁1L,2毫克每升硫胺素),28℃,150rpm下进行发酵12d。

[0028] 发酵结束后,发酵液连同菌体超声破壁30min,经高效液相色谱分析,发酵液中青霉素浓度为1.77g/L。

[0029] 用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液两次,真空浓缩得到粗提物,经高效液相色谱检测粗提物,其主要代谢产物含量达粗提物的13.54%。经过凝胶柱层析分离(甲醇洗脱),得

到代谢产物青霉酸的纯度为97%。

[0030] 实施例2:

[0031] 菌体活化:将青霉菌T2-8接种到经过121℃高温灭菌30min的PDA斜面培养基,置于28℃恒温培养箱中培养5d后,置于4℃冰箱中备用。

[0032] 菌种制备:将活化的菌体接入121℃高温灭菌30min的PDB培养基中,28℃,150rpm下进行发酵3d。

[0033] 发酵过程:将制备好的菌种按照体积分数5%加入121℃高温灭菌30min的发酵培养基中(以体积质量百分比计所述发酵培养基成分:2%葡萄糖,20%马铃薯汁1L),28℃,180rpm下进行发酵13d。

[0034] 发酵结束后,发酵液连同菌体超声破壁30min,经高效液相色谱分析,发酵液中青霉酸浓度为1.57g/L。

[0035] 用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液两次,真空浓缩得到粗提物,经高效液相色谱检测粗提物,其主要代谢产物含量达粗提物的11.14%。经过凝胶柱层析分离(甲醇洗脱),得到代谢产物青霉酸的纯度为98%。

[0036] 实施例3:

[0037] 菌体活化:将青霉菌T2-8接种到经过121℃高温灭菌30min的PDA斜面培养基,置于28℃恒温培养箱中培养5d后,置于4℃冰箱中备用。

[0038] 菌种制备:将活化的菌体接入121℃高温灭菌30min的PDB培养基中,28℃,150rpm下进行发酵2d。

[0039] 发酵过程:将制备好的菌种按照体积分数10%加入121℃高温灭菌30min的发酵培养基中(以体积质量百分比计所述发酵培养基成分:3%葡萄糖,0.4%磷酸氢二钾,0.2%七水合硫酸镁,25%马铃薯汁1L,5毫克每升硫胺素),30℃,150rpm下进行发酵14d。

[0040] 发酵结束后,发酵液连同菌体超声破壁15min,经高效液相色谱分析,发酵液中青霉酸浓度为1.58g/L。

[0041] 用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液两次,真空浓缩得到粗提物,经高效液相色谱检测粗提物,其主要代谢产物含量达粗提物的11.89%。经过凝胶柱层析分离(甲醇洗脱),得到代谢产物青霉酸的纯度为95%。

[0042] 本发明通过青霉菌T2-8发酵代谢制备青霉酸,发酵液中的浓度可达1.57~1.77g/L,提取分离后纯度可达到95~98%,生产成本低,过程简单,环境友好,适宜扩大化生产。

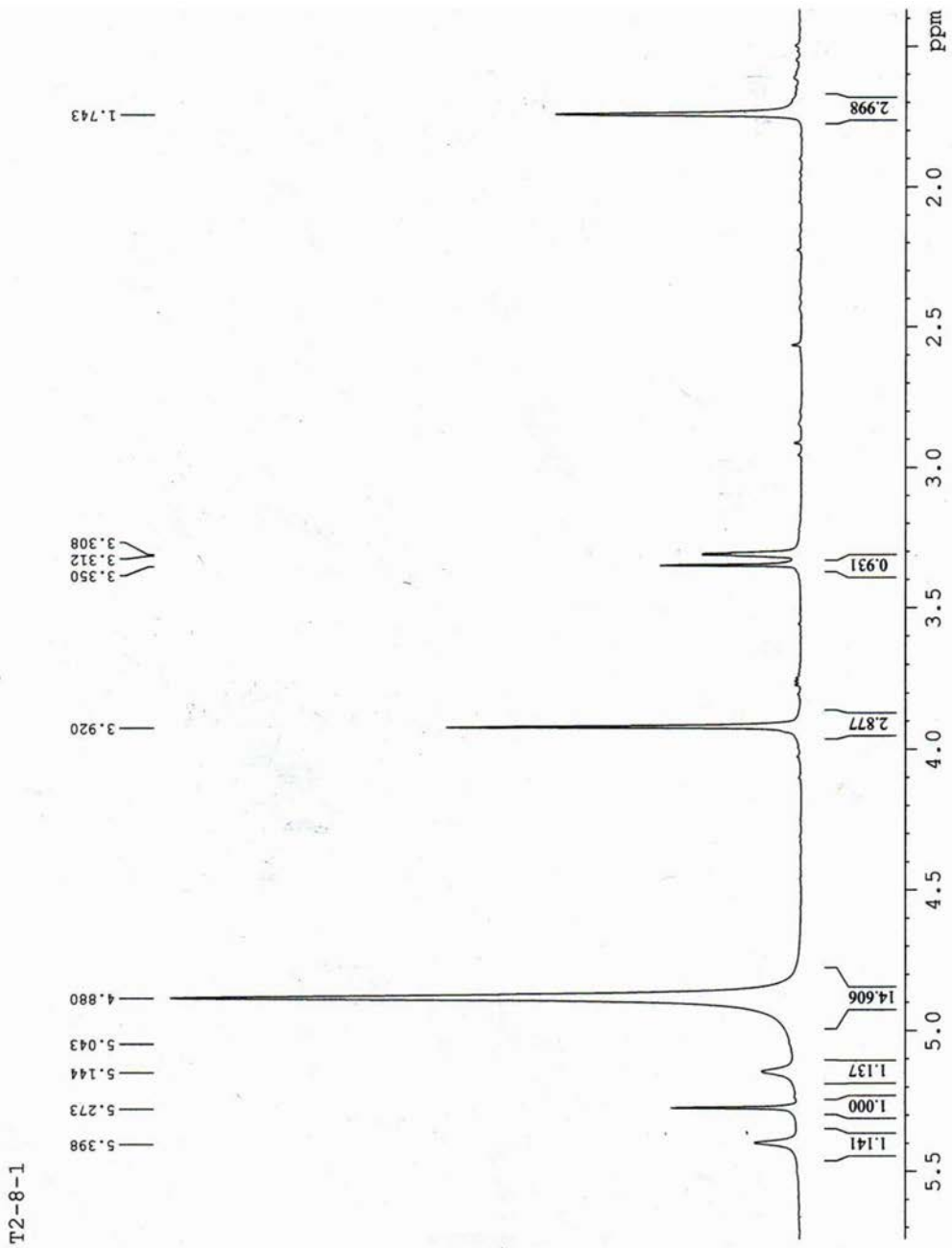


图1

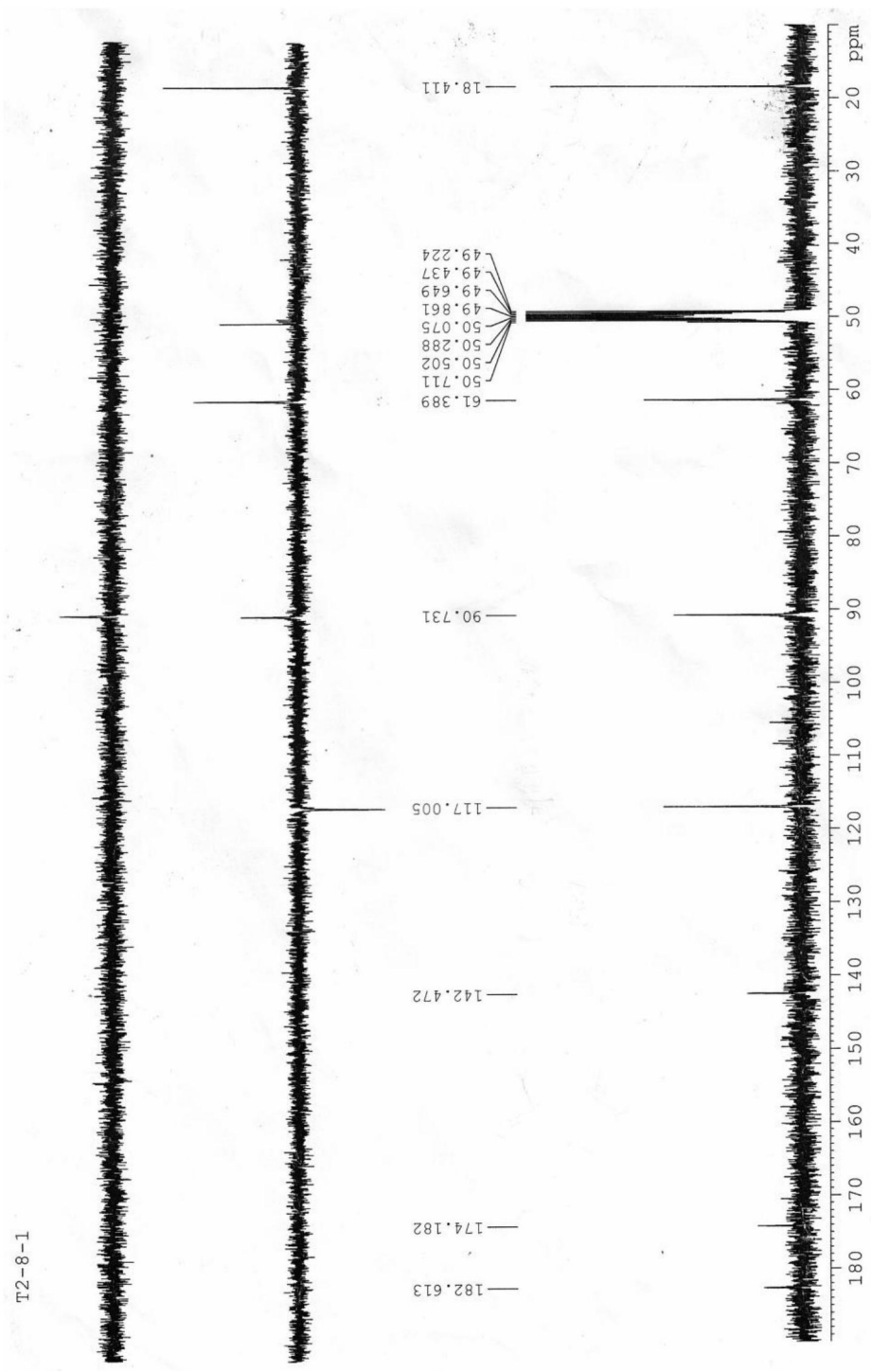


图2

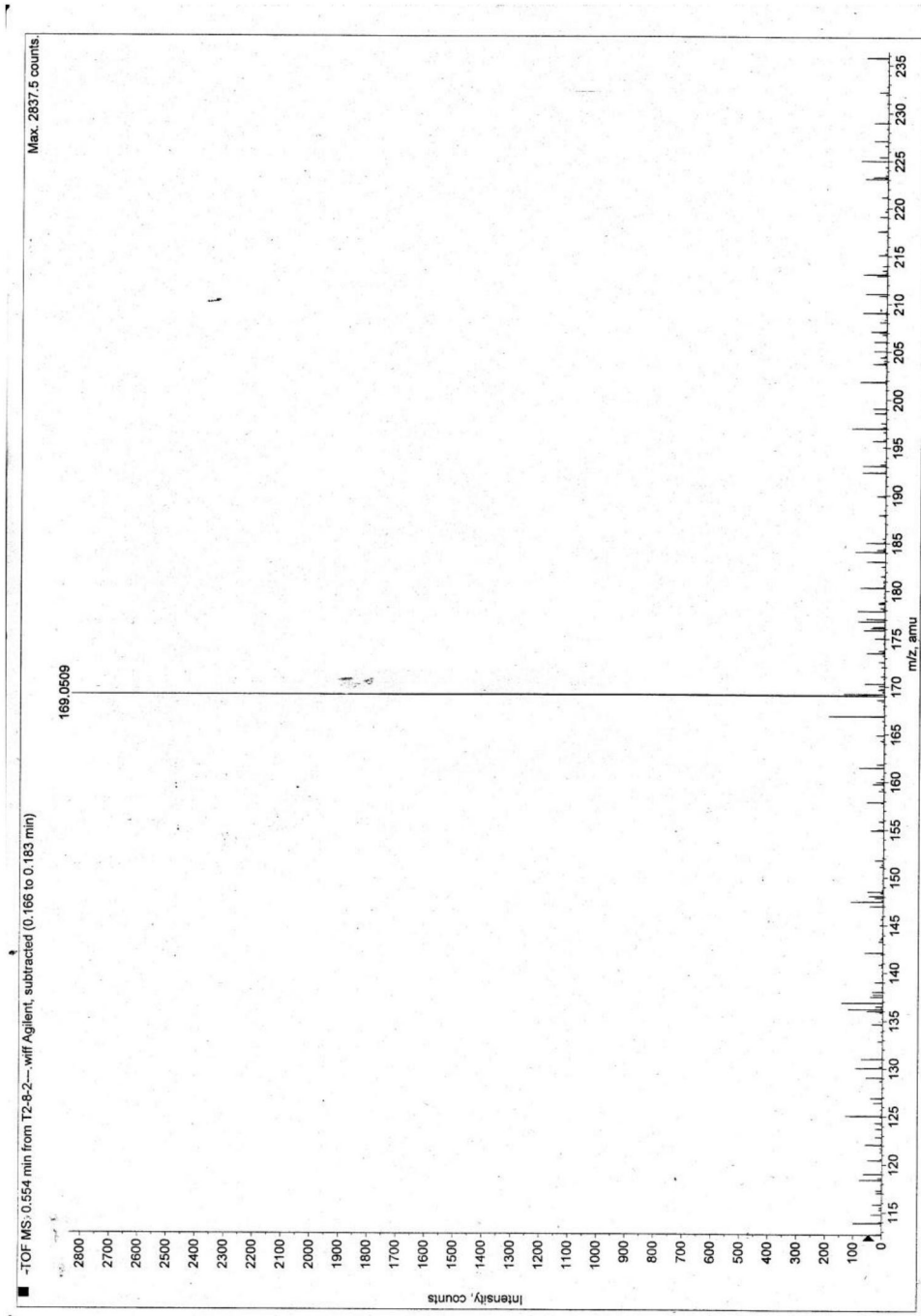


图3

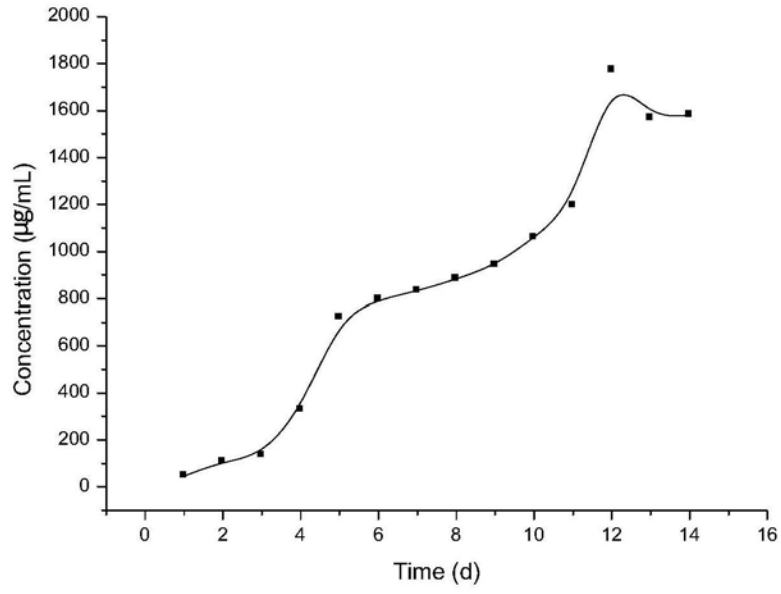


图4