



(21) 申请号 202410244589.3

(22) 申请日 2024.03.05

(71) 申请人 葳龙生物科技(浙江)有限公司
地址 310000 浙江省杭州市上城区九环路9
号4号楼7楼722室

(72) 发明人 李清声 林占军 张慧立

(74) 专利代理机构 浙江和纳律师事务所 33314
专利代理师 李赞坚

(51) Int. Cl.

C12P 13/04 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

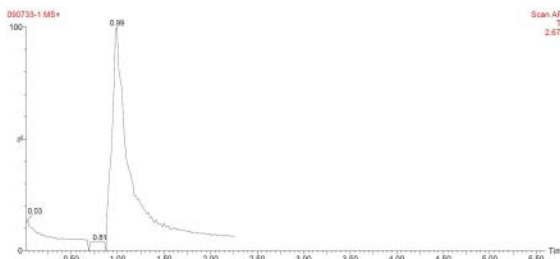
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种草铵膦的生物合成方法

(57) 摘要

本发明涉及一种草铵膦的生物合成方法,涉及生物农药的技术领域,包括以下步骤:S1,将培养基所用设备管路消毒灭菌;S2,向搅拌罐中加入培养基:葡萄糖、无机盐、酶、香樟叶提取液、水;S3,封闭搅拌罐后灭菌,得到灭菌后的培养基;S4,将灭菌后的培养基转移至发酵罐中,将棕榈链霉菌投入培养基进行发酵。本发明利用微生物发酵的方法合成草铵膦,不仅所需成本较低,而且能在合成过程中减少污染。



1. 一种草铵膦的生物合成方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1,将培养基所用设备管路消毒灭菌;

S2,向搅拌罐中加入培养基:葡萄糖、无机盐、酶、香樟叶提取液、水;

S3,封闭搅拌罐后灭菌,得到灭菌后的培养基;

S4,将灭菌后的培养基转移至发酵罐中,将棕榈链霉菌投入培养基进行发酵。

2. 根据权利要求1所述草铵膦的生物合成方法,其特征在于,所述酶为 α -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述草铵膦的生物合成方法,其特征在于,所述步骤S3灭菌时,搅拌罐中罐压升至0.14~0.24兆帕,料温升至120°C~125°C,保持罐压和温度30min后结束灭菌,灭菌后的培养基冷却后置入发酵罐。

4. 根据权利要求1所述草铵膦的生物合成方法,其特征在于,在18°C~25°C的温度下,在无菌环境中将棕榈链霉菌投入培养基,保持18°C~25°C的温度,继续有氧发酵3~5天,从微生物发酵液及其培养液中提纯分离出发酵代谢产物草铵膦。

5. 根据权利要求1所述草铵膦的生物合成制备方法,其特征在于,所述步骤S2中向搅拌罐中加入培养基原料时包括以下步骤:

步骤一,先向搅拌罐内加入水;

步骤二,加入香樟叶提取液,搅拌,使得水和香樟叶提取液充分混合;

步骤三,加入葡萄糖、无机盐,搅拌;

步骤四,加入酶,搅拌。

一种草铵磷的生物合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物农药的技术领域,尤其是涉及一种草铵磷的生物合成方法。

背景技术

[0002] 在农业领域,草铵磷除草剂是一种广泛使用的除草剂,具有高效、低毒、低残留等特点。

[0003] 公告号为CN1267305A的中国专利中公开了一种用于制备草铵磷的方法以及中间体,草铵磷及其2-甲基类似物可用多步骤合成,由甲基磷化合物(II)与不饱和的酮类化合物(III)反应产生加合物(IV),经后续的史塔克合成反应及最终的氨基腈(V)水解:步骤1:(II)+(III)→加合物(IV);步骤2:加合物(IV)例如 $\text{NH}_3/\text{NaCN}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (V);步骤3:水解(V)产生草铵磷。

[0004] 上述中的现有技术存在以下缺陷:其采用的是化学合成的方法制备草铵磷,该方法的成本较高,且容易产生工业三废污染,本申请发明人采用生物方法合成草铵磷,研发出了一种草铵磷发酵的制备方法,不仅降低了成本,而且能有效减少制备过程中污染物的产生,符合绿色发展的理念。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种草铵磷的生物合成方法,利用微生物发酵的方法制备草铵磷,不仅所需成本较低,而且能在制备过程中减少污染。

[0006] 本发明的上述发明目的是通过以下技术方案得以实现的:

一种草铵磷的生物合成方法,包括以下步骤:

S1,将培养基所用设备管路消毒灭菌;

S2,向搅拌罐中加入培养基:葡萄糖、无机盐、酶、香樟叶提取液、水;

S3,封闭搅拌罐后灭菌,得到灭菌后的培养基;

S4,将灭菌后的培养基转移至发酵罐中,将棕榈链霉菌投入培养基进行发酵。

[0007] 在此过程中,先将配制培养基的设备及管路进行消毒灭菌,避免设备及管路中的微生物及有毒有害物质对培养基的污染,消毒灭菌后加入培养基原料,再进行灭菌后将其转移至发酵罐中,投入功能菌种进行发酵,发酵得到所需产物经过提纯分离后得到草铵磷。使用该生物发酵的方法制备草铵磷,不仅具有成本较低的优点,而且也能在制备过程中减少污染。当得到的草铵磷喷洒到杂草叶面后,能够迅速渗透到杂草体内传导,药剂能到达杂草末梢部位甚至传遍杂草全株,即可触杀。主要抑制杂草体内负责催化芳香族氨基酸的生物合成的5-磷酸酶乙酰乙酸羧化酶(EPSPS),阻断芳香族氨基酸的合成,抑制杂草叶绿素细胞生长,抑制杂草光合作用,并迅速降解和破坏叶绿素细胞体内铵代谢紊乱、杂草体内的养分传输受阻和细胞脱水造成枯萎死亡。

[0008] 优选的,所述培养基原料为:香樟叶提取液、葡萄糖、无机盐、酶、水。

[0009] 培养基原料中的葡萄糖、无机盐为菌种生长提供其所需的大量营养元素;并且香

樟叶提取液为菌种提供生长调节因子和较好的生长环境,且能在一定程度上提高草铵膦的产量;酶能帮助分解香樟叶提取液,为菌种生长提供营养物质,进而也能在一定程度上提高草铵膦的产量。

[0010] 优选的,所述步骤S2中向搅拌罐中加入培养基原料时包括以下步骤:

步骤一,先向搅拌罐内加入水;

步骤二,加入香樟叶提取液,搅拌,使得水和香樟叶提取液充分混合;

步骤三,加入葡萄糖、无机盐,搅拌;

步骤四,加入酶,搅拌。

[0011] 香樟叶提取液能为菌种提供生长调节因子和较好的生长环境,并且能在一定程度上提高草铵膦的产量。

[0012] 优选的,所述酶为 α -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶中的一种或多种。

[0013] α -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶能分解相应的淀粉、细胞壁的纤维素、果胶、蛋白质等,有效提高香樟叶提取液的利用率,并且为菌种生长提供营养物质。

[0014] 优选的,所述步骤S3灭菌时,搅拌罐中罐压升至0.14~0.24兆帕,料温升至120℃~125℃,保持罐压和温度30min后结束灭菌,灭菌后的培养基冷却后置入发酵罐。

[0015] 再加入培养基原料后,采用120℃~125℃、0.14~0.24兆帕、30min灭菌的方式,能达到较好的灭菌效果,也在一定程度上更利于后续菌种利用培养基原料。

[0016] 优选的,在18℃~25℃的温度下,在无菌环境中将功能菌种投入培养基,保持18℃~25℃的温度,继续有氧发酵3~5天,从微生物细胞及发酵液中及其培养液中提纯分离出发酵代谢产物草铵膦。

[0017] 发酵过程的温度保持18℃~25℃,采用有氧发酵的方式,棕榈链霉菌能充分利用培养基,进而得到大量的草铵膦,后续对微生物细胞及发酵液及培养液中提纯分离可得到发酵代谢产物草铵膦。

[0018] 综上所述,本发明包括以下至少一种有益技术效果:

1. 使用生物发酵的方法制备草铵膦,不仅具有成本较低的优点,而且也能在制备过程中减少污染,当得到的草铵膦喷洒到杂草叶面后,能够迅速渗透到杂草体内传导,药剂能到达杂草末梢部位甚至传遍杂草全株,即可触杀,抑制杂草叶绿素细胞生长,抑制杂草光合作用,并迅速降解和破坏叶绿素细胞体内铵代谢紊乱、杂草体内的养分传输受阻和细胞脱水造成枯萎死亡;

2. 培养基原料中的葡萄糖、无机盐为菌种生长提供其所需的基本营养物质;并且香樟叶提取液为菌种提供生长调节因子和较好的生长环境,且能在一定程度上提高草铵膦的产量;酶能帮助分解香樟叶提取液,为菌种生长提供营养物质,进而也能在一定程度上提高草铵膦的产量。

附图说明

[0019] 图1是发酵代谢产物的LC-MS正离子模式色图谱;

图2是发酵代谢产物的LC-MS正离子模式质谱图;

图3是发酵代谢产物的LC-MS负离子模式色图谱;

图4是发酵代谢产物的LC-MS负离子模式质谱图;

图5-7是利用得到的草铵膦进行杂草抑制效果检验的结果图。

具体实施方式

[0020] 以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。

[0021] 实施例1

一种草铵膦的生物合成方法,包括以下步骤:

S1,将培养基所用设备管路采用高温蒸汽充分消毒灭菌;

S2,向搅拌罐中加入培养基原料:

其中,包括以下步骤:

步骤一,先向搅拌罐内加入30份水;

步骤二,加入22份香樟叶提取液,搅拌30min,使得水和香樟叶提取液充分混合;

步骤三,加入14份葡萄糖、3份无机盐(氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠中的一种),搅拌30min至混合均匀;

步骤四,加入13份酶,酶为 α -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶以及蛋白酶,搅拌1.5h。

[0022] S3,封闭搅拌罐后灭菌,灭菌时,搅拌罐中罐压升至0.16兆帕(也可以是0.14~0.24兆帕范围内),料温升至121℃(也可以是120℃~125℃范围内),保持罐压和温度30min后结束灭菌,得到灭菌后的培养基;

S4,将灭菌后的培养基转移至发酵罐中,将棕榈链霉菌投入培养基进行发酵,其中棕榈链霉菌及培养基的重量比为4:91。在18℃~25℃的温度下,在无菌环境中将功能菌种投入培养基,保持18℃~25℃的温度,继续有氧发酵3~5天,从微生物细胞及发酵液中及其培养液中提纯分离出发酵代谢产物草铵膦。

[0023] 实施例2-5

S4中投入棕榈链霉菌及培养基的配方为(按重量份数):棕榈链霉菌2~7份,培养基80~120份。

[0024] 实施例2-5与实施例1的不同在于,S4中投入棕榈链霉菌及培养基的配方重量份不同,详见表1。

[0025] 表1

| | 棕榈链霉菌 | 培养基 |
|-------|-------|-----|
| 实施例 1 | 5 | 91 |
| 实施例 2 | 2 | 91 |
| 实施例 3 | 7 | 91 |
| 实施例 4 | 5 | 80 |
| 实施例 5 | 5 | 120 |

[0026] 实施例6-15

S2,向搅拌罐中加入培养基原料的配方为(按重量份数):香樟叶提取液10-40份,葡萄糖5-20份,无机盐1-7份,酶8-20份,水10-40份。

[0027] 实施例6-15与实施例1的区别在于向搅拌罐中加入培养基原料的配方重量份不同,详见表2。

[0028] 表2

| | 香樟叶提取液 | 葡萄糖 | 无机盐 | 酶 | 水 |
|--------|--------|-----|-----|----|----|
| 实施例 1 | 27 | 14 | 3 | 13 | 30 |
| 实施例 6 | 10 | 14 | 3 | 13 | 30 |
| 实施例 7 | 40 | 14 | 3 | 13 | 30 |
| 实施例 8 | 27 | 5 | 3 | 13 | 30 |
| 实施例 9 | 27 | 20 | 3 | 13 | 30 |
| 实施例 10 | 27 | 14 | 1 | 13 | 30 |
| 实施例 11 | 27 | 14 | 7 | 13 | 30 |
| 实施例 12 | 27 | 14 | 3 | 8 | 30 |
| 实施例 13 | 27 | 14 | 3 | 20 | 30 |
| 实施例 14 | 27 | 14 | 3 | 13 | 10 |
| 实施例 15 | 27 | 14 | 3 | 13 | 40 |

[0029] 实施例16-28

S2,向搅拌罐中加入培养基原料中的酶为 α -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶以及蛋白酶中的一种或多种。

[0030] 实施例16-28与实施例1的区别在于,S2中加入的酶的种类不同,详见表3,其中“√”代表添加了该酶,“/”代表未添加该酶。

[0031] 表3

| | α -淀粉酶 | 纤维素酶 | 果胶酶 | 蛋白酶 |
|--------|---------------|------|-----|-----|
| 实施例 1 | √ | √ | √ | √ |
| 实施例 16 | √ | / | / | / |
| 实施例 17 | / | √ | / | / |
| 实施例 18 | / | / | √ | / |
| 实施例 19 | / | / | / | √ |
| 实施例 20 | √ | √ | / | / |
| 实施例 21 | √ | / | √ | / |
| 实施例 22 | √ | / | / | √ |
| 实施例 23 | / | √ | √ | / |
| 实施例 24 | / | √ | / | √ |
| 实施例 25 | / | / | √ | √ |
| 实施例 26 | √ | √ | √ | / |
| 实施例 27 | √ | √ | / | √ |
| 实施例 28 | √ | / | √ | √ |

[0032] 试验结果

如图1-4所示,草铵膦在发酵代谢产物中具有较高的含量,进一步提纯分离后用于进行杂草喷洒试验。

[0033] 如图5-7所示,得到的草铵膦能有效除草,当得到的草铵膦喷洒到杂草叶面后,能够迅速渗透到杂草体内传导,药剂能到达杂草末梢部位甚至传遍杂草全株,即可触杀,抑制杂草叶绿素细胞生长,抑制杂草光合作用,并迅速降解和破坏叶绿素细胞体内铵代谢紊乱、杂草体内的养分传输受阻和细胞脱水造成枯萎死亡。

[0034] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例作出没有创造性贡献的修改,但只要在本申

请的权利范围内都受到专利法的保护。

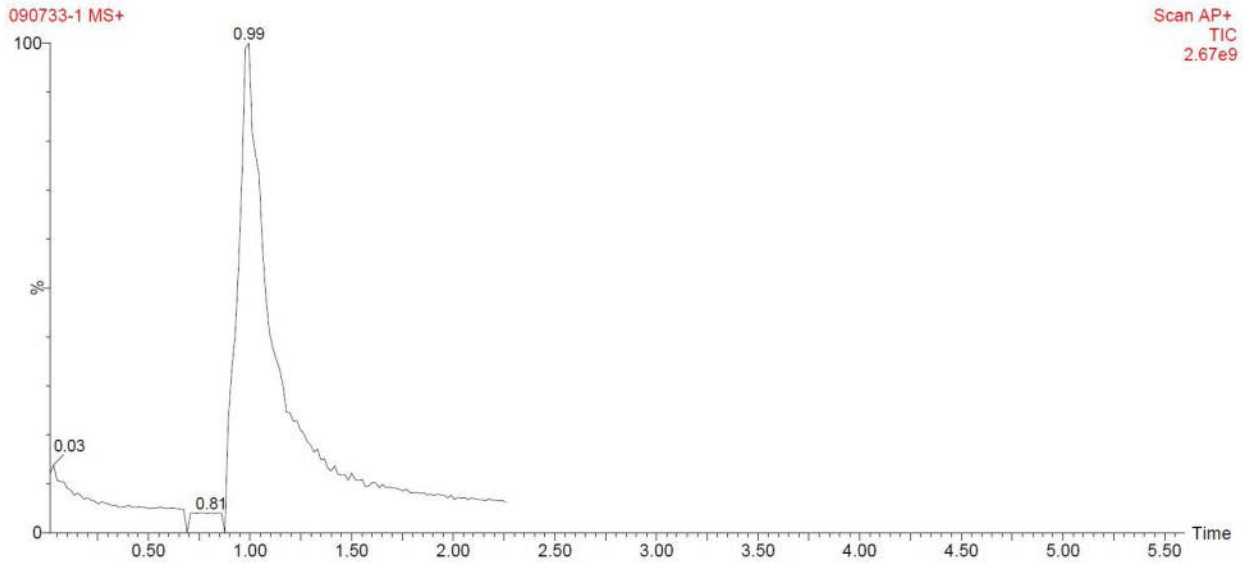


图 1

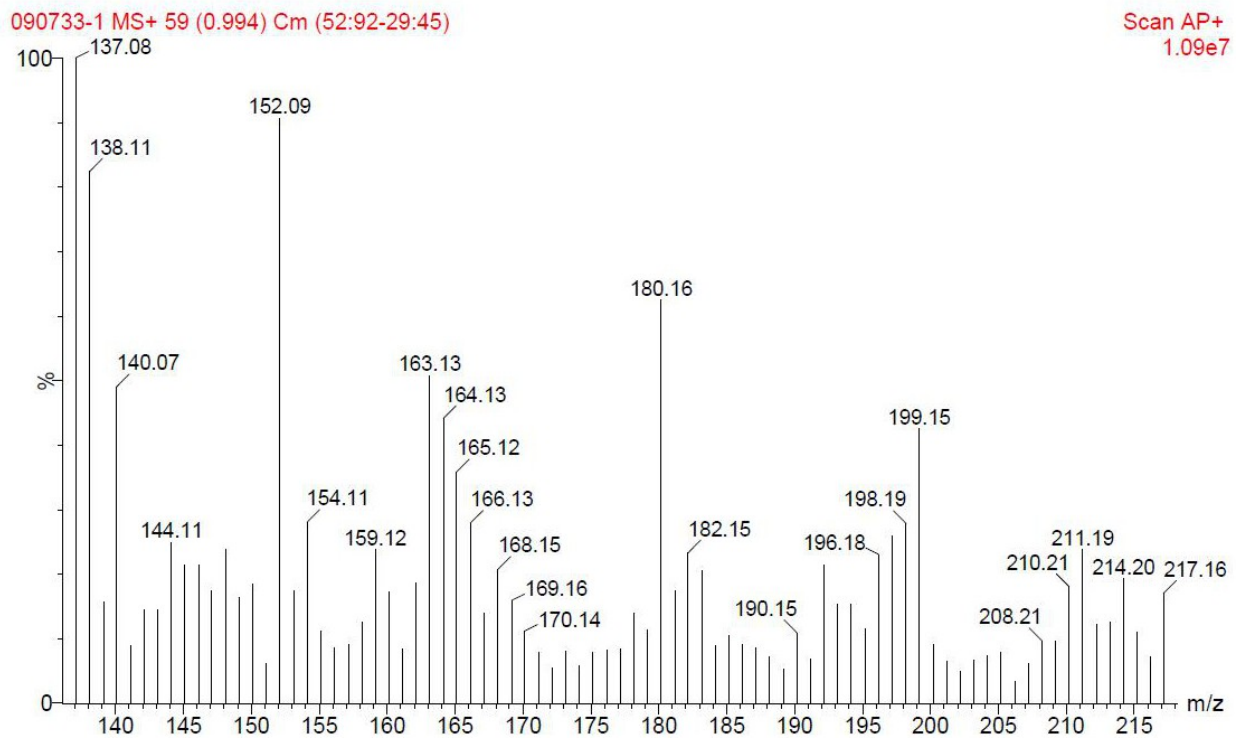


图 2

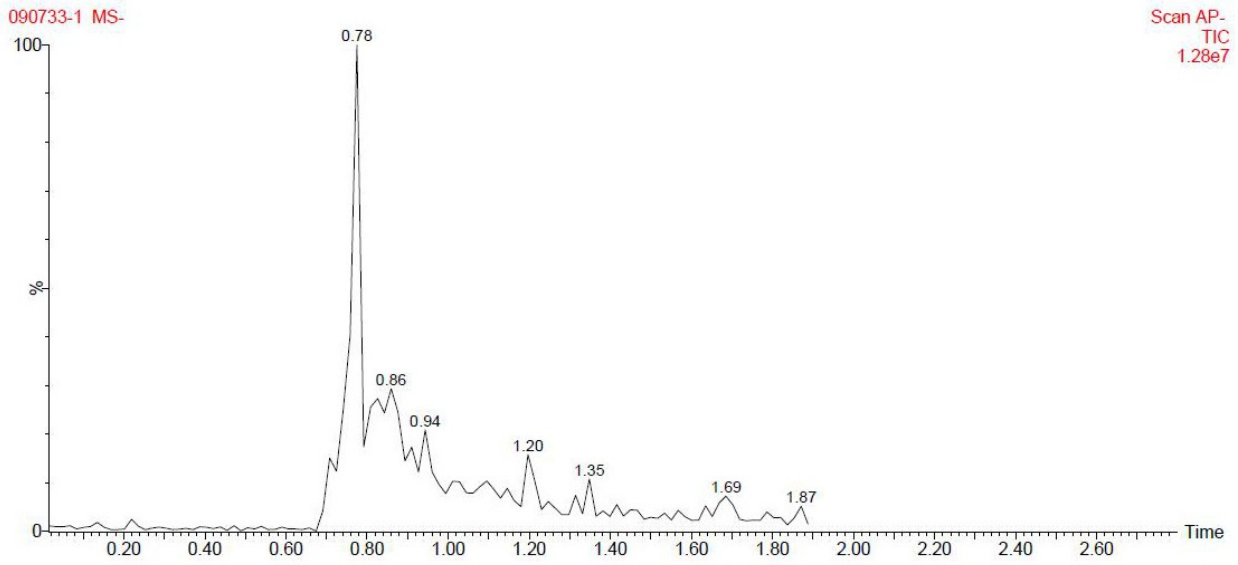


图 3

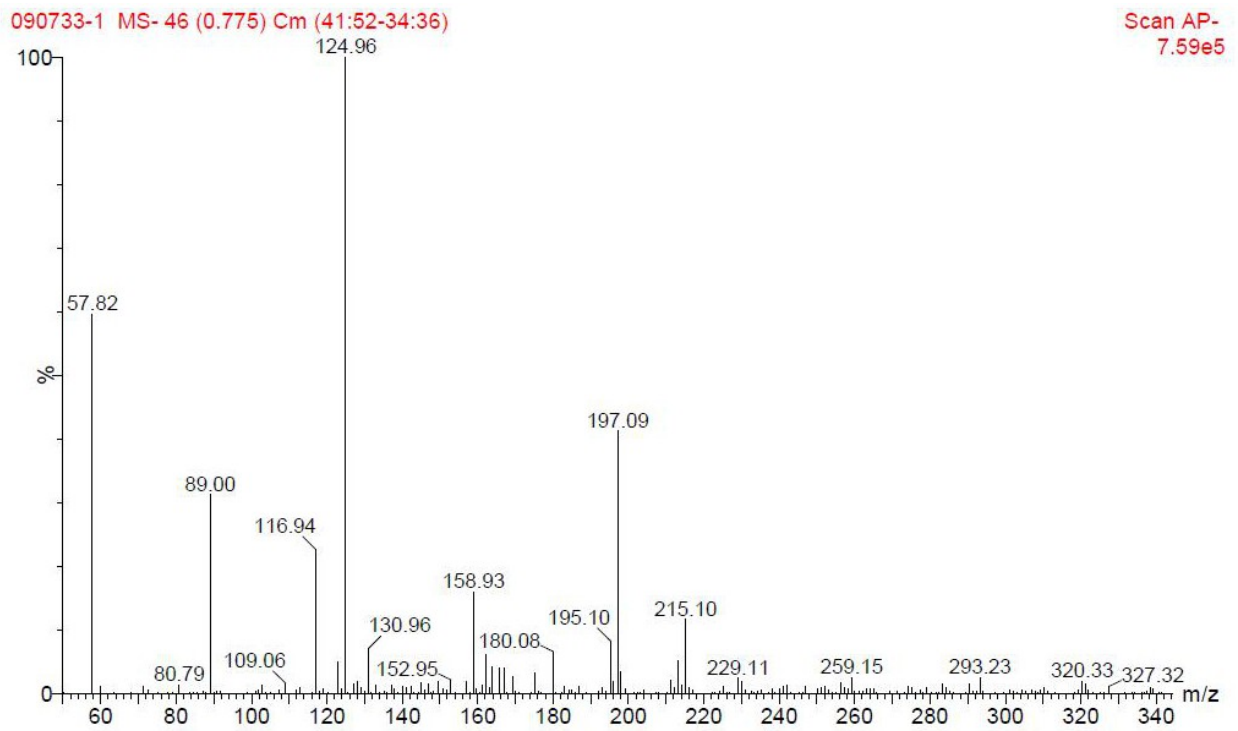


图 4

