



(21) 申请号 202211046345.1

C12N 9/04 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.30

(71) 申请人 湖北葛店人福药业有限责任公司

地址 436070 湖北省鄂州市葛店经济技术
开发区湖北葛店人福药业有限责任公
司

(72) 发明人 艾勇泉 何鑫 陈海林 刘林

杨艳青 郑承刚 邓霞飞

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限

公司 42102

专利代理师 李艳景

(51) Int. Cl.

C12P 33/00 (2006.01)

C12P 33/06 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图6页

(54) 发明名称

一种适用于甾族化合物酮基还原酶催化的
酶液套用方法

(57) 摘要

本发明是涉及一种适用于甾族化合物酶催化的酶液套用方法。本发明提供了一种将正常批酶催化的酶液进行套用工艺。反应体系中添加的乳化剂会使底物和产物与水形成乳化作用,通过添加消泡剂助剂可以破坏产物的乳化作用,使产物在消泡剂助剂的作用下,从乳化状态剥离出来,形成了不溶粉末状固体产物,在此同时也不会影响底物反应,也有助于促进反应向正方向进行,之后再通过过滤得到酶液进行套用批反应。可有效降低成本,且收率能够进一步提高。

1. 一种适用于甾族化合物酶催化的酶液套用方法,包括以下步骤:

(1) 搭建一个正常的提供正常批酶催化反应体系,催化完成后,降温至5-10℃过滤得到酶液,所述的正常批酶催化反应体系为:磷酸氢二钾1.800-5.900g/L,磷酸二氢钾0.775-2.325g/L,葡萄糖38.500-115.500g/L,乳化剂13.500-40.688g/L,消泡剂助剂0.050-0.150g/L、酮基还原酶3-4g/L,葡萄糖脱氢酶0.5-1.0g/L, NADP^+ 0.15-0.20g/L,甾族化合物底物50-100g/L;

(2) 向得到的酶液中依次加入底物50-100g/L、葡萄糖77-154g/L、酮基还原酶和 NADP^+ ,得到酶液套用体系;

(3) 步骤(2)搭建好的酶液套用反应体系催化得到产物。

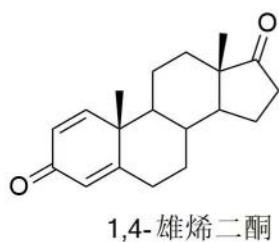
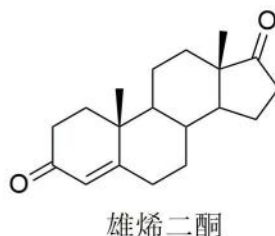
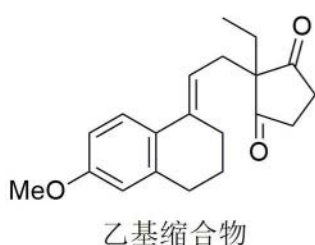
2. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,所述步骤(2)中,酮基还原酶和 NADP^+ 添加量为正常批酶催化反应体系10%-50%的酶量。

3. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,所述催化条件为:控制pH在6.75~6.95,温度25~35℃进行。

4. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,乙基羟化物平均收率可达到95%,产品纯度 $\geq 98.5\%$;睾酮平均收率可达到93%,产品纯度 $\geq 99.5\%$;宝丹酮平均收率可达到95%,产品纯度 $\geq 99.0\%$;雌二醇平均收率可达到94%,产品纯度 $\geq 98.5\%$ 。

5. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,所述的乳化剂选自吐温60,吐温80,曲拉通X-100中的一种或以上的组合。

6. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,所述的甾族化合物底物为乙基缩合物、雄烯二酮、1,4-雄烯二酮、雌酚酮,乙基缩合物、雄烯二酮、1,4-雄烯二酮、雌酚酮的结构式如下所示:



7. 根据权利要求1所述的酶液套用方法,其特征在于,所述的消泡剂助剂为聚醚消泡剂、聚硅氧烷消泡剂、酯化型消泡剂、聚氧丙烯甘油醚消泡剂中的一种或以上的组合。

一种适用于甾族化合物酮基还原酶催化的酶液套用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种适用于甾族化合物酮基还原酶催化的酶液套用方法。

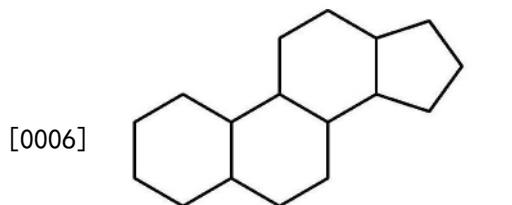
背景技术

[0002] 甾族化合物是一种不溶于水的环戊烷多氢菲母核化合物,其基本结构如图1所示,一般分为雌激素、雄激素、孕激素、盐皮质激素和糖皮质激素五类,雌激素具有维持女性第二性征、促进其发育的功能,例如乳房的发育、形体的改变、脂肪的富集、控制妊娠、哺乳等功能;雄激素具有促进男性第二性征的成熟、维持正常性欲及生殖功能、促进精子发育、成熟的功能;孕激素对受精卵的着床和妊娠的维持提供基本保障作用;盐皮质激素可作用于肾脏、汗腺、唾液腺和胃肠道来维持电解质和细胞外液平衡;糖皮质激素具有调节血压、蛋白质和脂质的代谢,抗炎以及抑制免疫反应的功能。

[0003] 目前甾族化合物药物合成主要是化学法和生物法,化学合成一般需要多步反应完成,且需要在大量有机溶剂、催化剂、加热、加压等条件下参与反应,存在成本高、收率低、污染大等缺点;生物法采用分子生物学技术构建工程菌生物转化制备甾族化合物中间体,与化学合成方法制备甾族化合物中间体相比,生物催化与转化的制备条件比较温和,具有成本低、污染低、收率高等优点。

[0004] 酶催化属生物催化转化,具有效率高、特异性高、反应条件温和、环境友好等优势,甾族化合物的羟基化在微生物中广泛存在,如C6、C7、C11、C12或C17单羟基化以及两个位点同时发生的双羟基化,例如C17位点的酮基 $\text{CH}=\text{O}$ 和醇基 CH_2-OH 之间的氧化还原反应可采用17 β -羟基化类固醇脱氢酶完成,由生理活性较低的甾族化合物药物中间体雄烯二酮与生理活性较高的甾族化合物激素药物睾酮和孕酮之间互相转化等。

[0005] 酶一般都是在水溶液中与底物反应,反应结束后酶难以回收,现有对酶重复利用的方法主要是酶固定化技术,但是此方法过于繁琐,研发成本较大,且大部分只适用于水溶性的底物。本发明提供了一种适用于甾族化合物酶催化的酶液套用方法,通过将正常批酶催化完成后,将降温过滤后得到的酶液进行套用,相比于正常批,套用批只需添加葡萄糖以及部分的酶,即可达到正常批底物投料水平,可以有效降低成本,且收率相比正常批有较大的提高。



甾族化合物的甾烷核结构

发明内容

[0007] 本发明的主要内容是提供一种适用于甾族化合物酶催化的酶液套用方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供的技术解决方案如下:

[0009] 提供一种适用于甾族化合物酶催化的酶液套用方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 搭建一个正常的提供正常批酶催化反应体系,催化完成后,降温至5-10℃过滤得到酶液,所述的正常批酶催化反应体系为:磷酸氢二钾1.800-5.900g/L,磷酸二氢钾0.775-2.325g/L,葡萄糖38.500-115.500g/L,乳化剂13.500-40.688g/L,消泡剂助剂0.050-0.150 g/L、酮基还原酶3-4g/L,葡萄糖脱氢酶0.5-1.0g/L, NADP^+ 0.15-0.20g/L,甾族化合物底物50-100g/L;

[0011] (2) 向得到的酶液中依次加入底物50-100g/L、葡萄糖77-154g/L、酮基还原酶和 NADP^+ ,得到酶液套用体系;

[0012] (3) 步骤(2)搭建好的酶液套用反应体系催化得到产物。

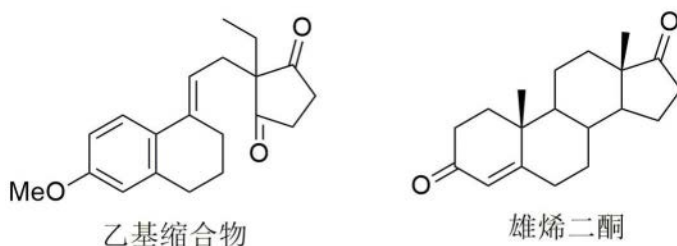
[0013] 按上述方案,所述步骤(2)中,酮基还原酶和 NADP^+ 添加量为正常批酶催化反应体系 10%-50%的酶量。

[0014] 按上述方案,所得催化条件为:控制pH在6.75~6.95,温度25~35℃进行。

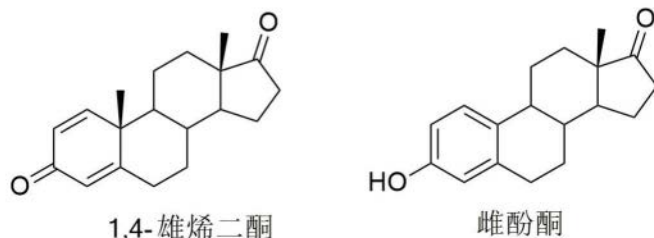
[0015] 按上述方案,乙基缩合物平均收率可达到95%,产品纯度 $\geq 98.5\%$;睾酮平均收率可达到93%,产品纯度 $\geq 99.5\%$;宝丹酮平均收率可达到95%,产品纯度 $\geq 99.0\%$;雌二醇平均收率可达到94%,产品纯度 $\geq 98.5\%$

[0016] 按上述方案,所述的乳化剂可选自吐温60,吐温80,曲拉通X-100中的一种或以上的组合。具体地,对于乙基缩合物,可选自吐温60和曲拉通X-100联用,对于雄烯二酮,可选自曲拉通X-100或吐温60,对于1,4-雄烯二酮(ADD)可选自吐温60,对于雌酚酮可选自吐温80。

[0017] 按上述方案,所述的甾族化合物底物为乙基缩合物、雄烯二酮、1,4-雄烯二酮(ADD)、雌酚酮。乙基缩合物、雄烯二酮、1,4-雄烯二酮(ADD)、雌酚酮的结构式如图2所示。



[0018]



甾族化合物底物结构式

[0019] 按上述方案,所述的消泡剂助剂为聚醚消泡剂、聚硅氧烷消泡剂、酯化型消泡剂、聚氧丙烯甘油醚消泡剂中的一种或以上的组合。对于乙基缩合物,所述的消泡剂助剂可选聚氧丙烯甘油醚消泡剂,对于雄烯二酮,所述的消泡剂助剂可选酯化型消泡剂,对于1,4-雄烯二酮(ADD),所述的消泡剂助剂可选聚氧丙烯甘油醚消泡剂,对于雌酚酮,所述的消泡剂

助剂可选为聚硅氧烷消泡剂。

[0020] 本发明提供了一种将正常批酶催化的酶液进行套用工艺。反应体系中添加的乳化剂会使底物和产物与水形成乳化作用,通过添加消泡剂助剂可以破坏产物的乳化作用,使产物在消泡剂助剂的作用下,从乳化状态剥离出来,形成了不溶粉末状固体产物,在此同时也不会影响底物反应,也有助于促进反应向正方向进行,之后再通过过滤得到酶液则进行套用批反应。

[0021] 除此,在正常批反应体系中加入消泡剂助剂,进行套用批反应,还可利用体系中滤液中产物含量到达饱和的特点,降低体系中乳化剂的使用对产物收率的影响,由此降低产物的损失,相应提高收率。

[0022] 如对于甾族化合物中间体乙基羟化物的合成,一般正常酶反应体系中平均收率在80%左右,酶液中有一部分产物溶解在体系中无法得到,且酶不稳定,易失活,无法继续增加投料量,滤液舍弃会造成一定浪费。

[0023] 本发明通过加入消泡剂,提升了正常批次的收率,达到了90%左右,同时将正常批过滤得到的酶液进行套用,只添加底物、葡萄糖、酮基还原酶和 NADP^+ (用量只需正常批10%-50%),就可以使其达到正常批的投料水平,成本比之前降低,且收率能够进一步提高,达到95%左右,纯度与正常批一致。

[0024] 该方法优点如下:

[0025] 1. 本发明体系添加消泡剂助剂利于产物收集,能够进行酶液套用,且反应平均收率较正常批有较大提高,能达到正常批相同的纯度和杂质水平。

[0026] 2. 套用酶液只需添加底物和葡萄糖以及部分的酮基还原酶和 NADP^+ ,可以有效降低成本。

附图说明

[0027] 图1为甾族化合物的甾烷核结构

[0028] 图2为甾族化合物底物结构式

[0029] 图3为实施例1乙基羟化物酶催化反应示意图

[0030] 图4为实施例1正常批产物HPLC图谱

[0031] 图5为实施例1套用批产物HPLC图谱

[0032] 图6为实施例2正常批产物HPLC图谱

[0033] 图7为实施例2套用批产物HPLC图谱

[0034] 图8为实施例3酮酶催化反应示意图

[0035] 图9为实施例3正常批产物HPLC图谱

[0036] 图10为实施例3套用批产物HPLC图谱

[0037] 图11为实施例4雌二醇酶催化反应示意图

[0038] 图12为实施例4正常批产物HPLC图谱

[0039] 图13为实施例4套用批产物HPLC图谱

[0040] 图14为实施例5宝丹酮酶催化反应示意图

[0041] 图15为实施例5正常批产物HPLC图谱

[0042] 图16为实施例5套用批产物HPLC图谱。

具体实施方式

[0043] 实施例一：

[0044] 反应示意图见图3,称取30g葡萄糖、0.678g磷酸二氢钾、1.605g磷酸氢二钾加入到三口烧瓶中,再加入300mL的水,搅拌0.5h后加入1g吐温60、10.5g曲拉通、0.04g聚氧丙烯甘油醚消泡剂、19.5g乙基缩合物,搅拌,待pH稳定在6.85,温度30℃后,再依次加入0.975g酮基还原酶、0.195g葡萄糖脱氢酶、48.75mg NADP⁺酶液,进行转化。

[0045] 催化完成后,降温至5℃过滤,得到酶液和乙基羟化物粗品,粗品加入195mL水打浆0.5h,过滤,烘干,得到乙基羟化物17.84g,收率为91.49%,HPLC测得纯度为98.860%,见图4。

[0046] 向得到的酶液中依次加入19.5g乙基缩合物、30g葡萄糖、0.4875g酮基还原酶和24.375mg NADP⁺开始反应,pH稳定在6.85,温度30℃。

[0047] 催化完成后,降温至5℃,保温1h,过滤得到酶液(做废液处理)和乙基羟化物粗品,粗品加入195mL水打浆0.5h,过滤,烘干,得到乙基羟化物19.03g,收率为97.59%,HPLC测得纯度为97.810%,见图5。

[0048] 实施例二：

[0049] 称取150g葡萄糖、3.39g磷酸二氢钾、8.025g磷酸氢二钾加入到三口烧瓶中,再加入1500mL的水,搅拌0.5h后加入5g吐温60、52.5g曲拉通X-100、0.2g聚氧丙烯甘油醚消泡剂、97.5g乙基缩合物,搅拌,待pH稳定在6.85,温度30℃后,再依次加入4.875g 酮基还原酶、0.975g葡萄糖脱氢酶、243.75mg NADP⁺酶液,进行转化。

[0050] 催化完成后,降温至10℃过滤,得到酶液和乙基羟化物粗品,粗品加入975mL水打浆0.5h,过滤,烘干,得到乙基羟化物89.35g,收率为91.64%,HPLC测得纯度为98.886%,见图6。

[0051] 向得到的酶液中依次加入97.5g乙基缩合物、150g葡萄糖、2.4375g酮基还原酶和121.875mg NADP⁺,pH稳定在6.85,温度30℃。

[0052] 催化完成后,降温至10℃,保温1h,过滤,得到酶液(做废液处理)和乙基羟化物粗品,粗品加入975mL水打浆0.5h,过滤,烘干,得到乙基羟化物94.82g,收率为97.25%,HPLC测得纯度为98.589%,见图7。

[0053] 实施例三：

[0054] 反应示意图见图8,称取22.5g葡萄糖、0.339g磷酸二氢钾、0.8025g磷酸氢二钾加入到三口烧瓶中,再加入200mL的水,搅拌0.5h后加入6g曲拉通X-100、0.02g酯化型消泡剂、15g雄烯二酮,搅拌,待pH稳定在6.8,温度30℃后,再依次加入0.75g酮基还原酶、0.15g葡萄糖脱氢酶、37.5mg NADP⁺酶液,进行转化。

[0055] 催化完成后,降温至10℃过滤,得到酶液和睾酮粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到睾酮14.06g,收率为93.73%,HPLC测得纯度为99.690%,见图9。

[0056] 向得到的酶液中依次加入15g雄烯二酮、22.5g葡萄糖、0.075g酮基还原酶和3.75mg NADP⁺,pH稳定在6.85,温度30℃。

[0057] 催化完成后,降温至10℃过滤,得到酶液(做废液处理)和睾酮粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到睾酮14.61g,收率为97.4%,HPLC测得纯度为99.818%,见图10。

[0058] 实施例四：

[0059] 反应示意图见图11,称取30g葡萄糖、0.339g磷酸二氢钾、0.8025g磷酸氢二钾加入到三口烧瓶中,再加入300mL的水,搅拌0.5h后加入10g吐温80、0.03g聚硅氧烷消泡剂、15g雌酚酮,搅拌,待pH稳定在6.85,温度30℃后,再依次加入0.9g酮基还原酶、0.15g 葡萄糖脱氢酶、45mg NADP^+ 酶液,进行转化。

[0060] 催化完成后,降温至10℃过滤,得到酶液和雌二醇粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到雌二醇13.65g,收率为91.00%,HPLC测得纯度为99.854%,见图12。

[0061] 向得到的酶液中依次加入15g雌酚酮、30g葡萄糖、0.45g酮基还原酶和22.5mg NADP^+ 开始反应,pH稳定在6.85,温度30℃。

[0062] 催化完成后,降温至10℃,保温0.5h,过滤得到酶液(做废液处理)和雌二醇粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到雌二醇14.22g,收率为94.80%,HPLC测得纯度为99.894%,见图13。

[0063] 实施例五:

[0064] 反应示意图见图14,称取30g葡萄糖、0.339g磷酸二氢钾、0.8025g磷酸氢二钾加入到三口烧瓶中,再加入300mL的水,搅拌0.5h后加入10g吐温60、0.03g聚氧丙烯甘油醚消泡剂、15g 1,4雄烯二酮,搅拌,待pH稳定在6.85,温度30℃后,再依次加入0.9g酮基还原酶、0.15g葡萄糖脱氢酶、45mg NADP^+ 酶液,进行转化。

[0065] 催化完成后,降温至10℃过滤,得到酶液和宝丹酮粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到宝丹酮13.98g,收率为93.20%,HPLC测得纯度为99.703%,见图15。

[0066] 向得到的酶液中依次加入15g 1,4雄烯二酮、30g葡萄糖、0.27g酮基还原酶和22.5mg NADP^+ 开始反应,pH稳定在6.85,温度30℃。

[0067] 催化完成后,降温至10℃,保温0.5h,过滤得到酶液(做废液处理)和宝丹酮粗品,粗品乙酸乙酯精制后,得到宝丹酮14.35g,收率为95.67%,HPLC测得纯度为99.688%,见图16。

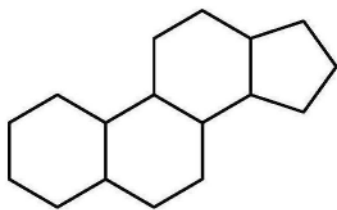


图1

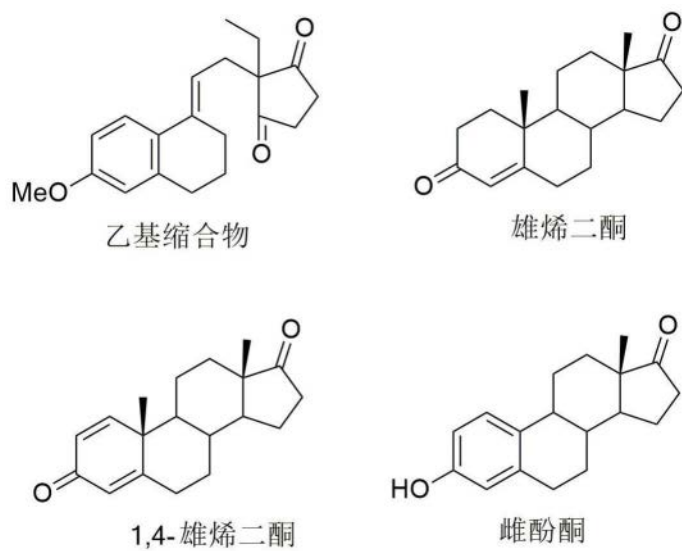


图2

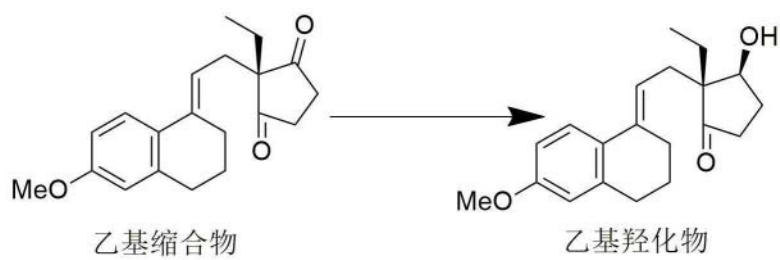


图3

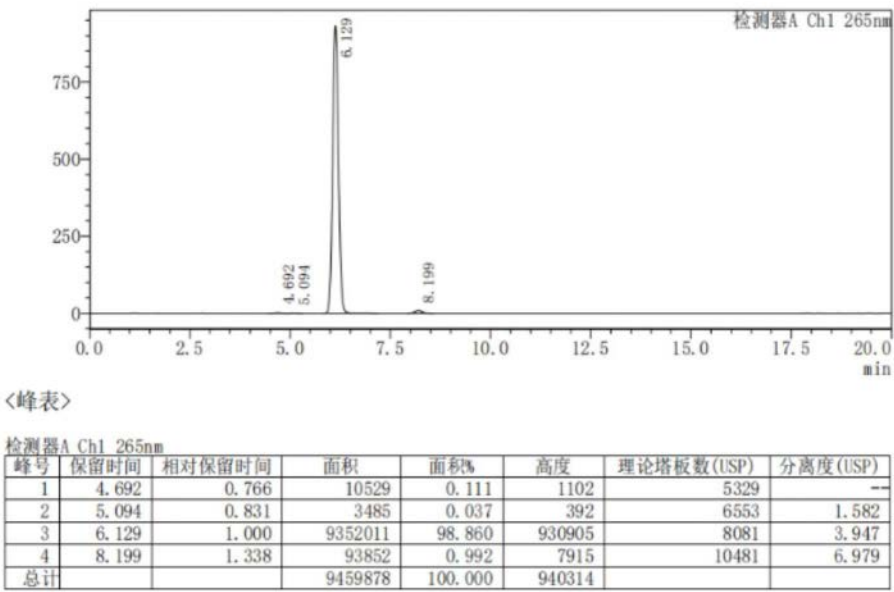


图4

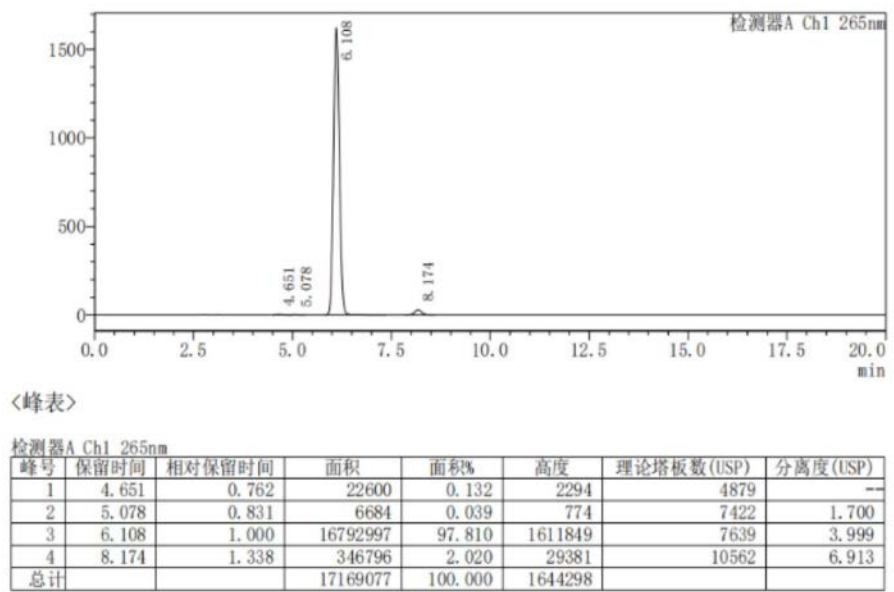


图5

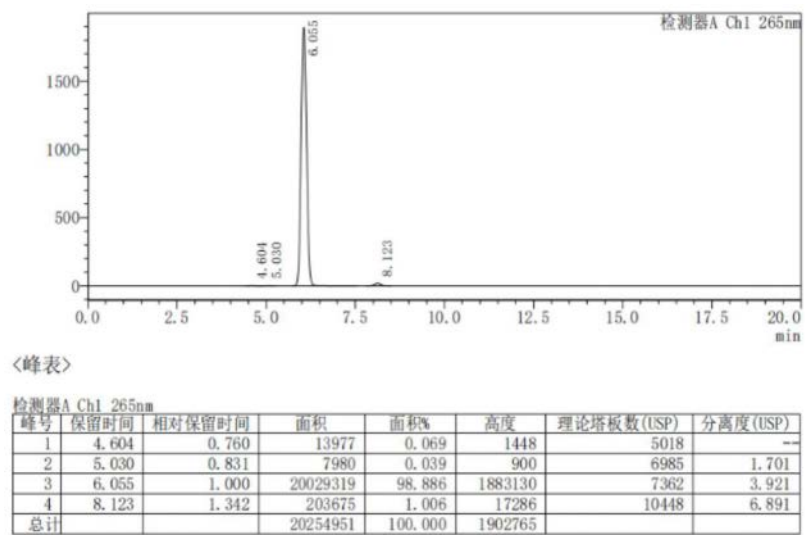


图6

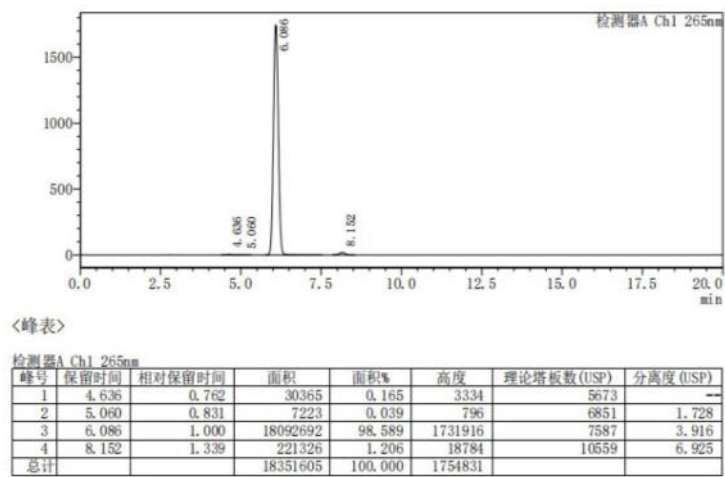


图7

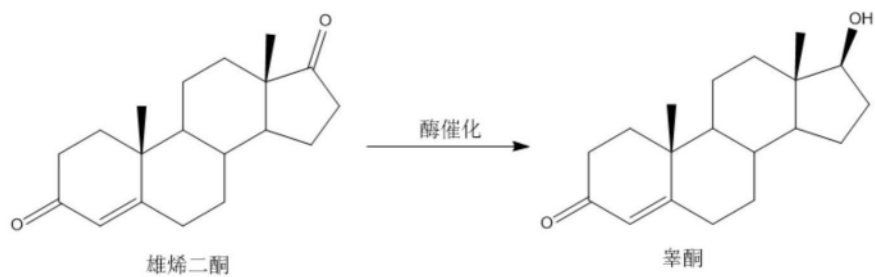
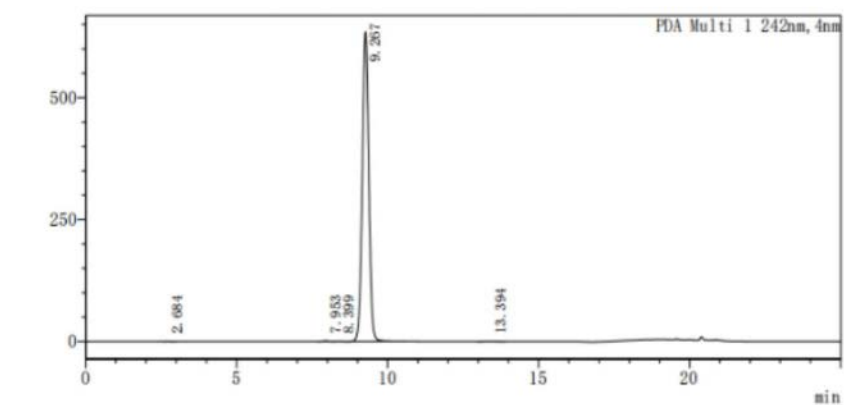


图8

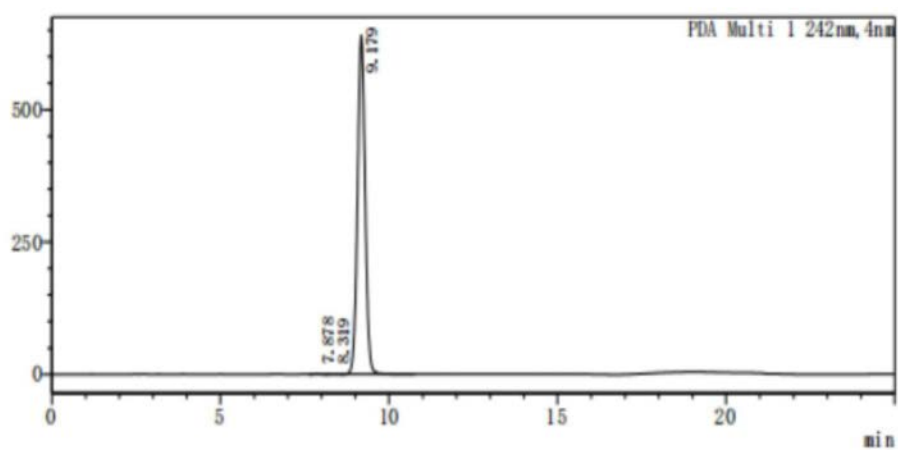


<峰表>

PDA Ch1 242nm

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数(USP)	分离度(USP)
1	2.684	0.290	4341	0.046	603	3185	--
2	7.953	0.858	13495	0.142	1087	8752	19.872
3	8.399	0.906	6558	0.069	513	8968	1.284
4	9.267	1.000	9500670	99.690	633062	8562	2.299
5	13.394	1.445	5153	0.054	248	9482	8.681
总计			9530218	100.000	635512		

图9



<峰表>

PDA Ch1 242nm

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数(USP)	分离度(USP)
1	7.878	0.858	13211	0.131	1005	7797	--
2	8.319	0.906	5126	0.051	387	8145	1.215
3	9.179	1.000	10030282	99.818	638793	7724	2.186
总计			10048618	100.000	640185		

图10

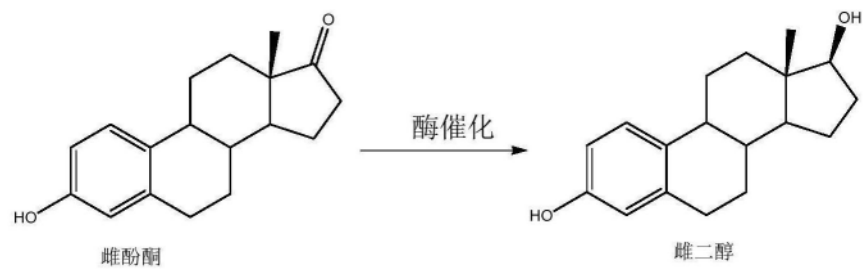


图11

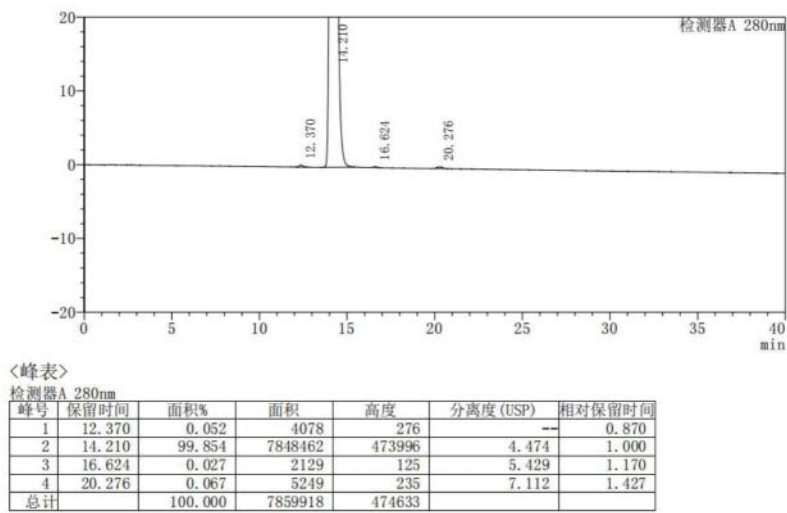


图12

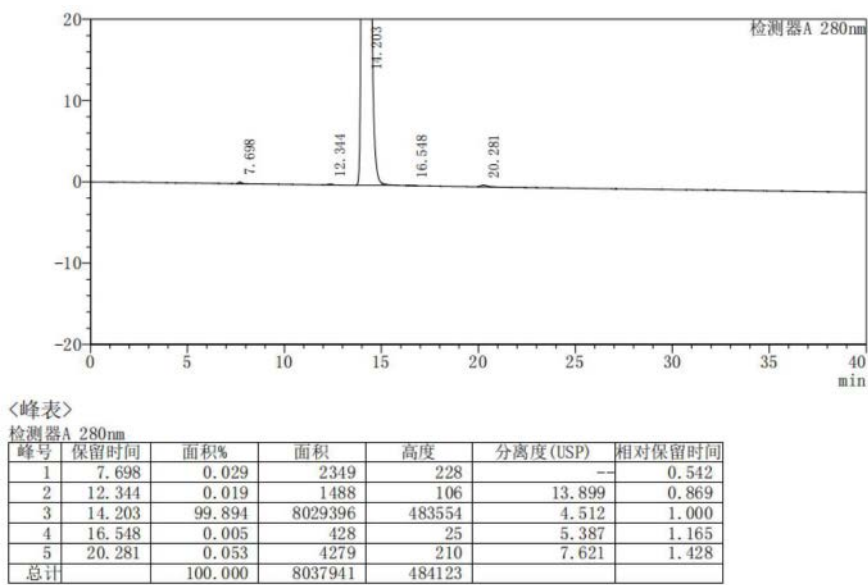


图13

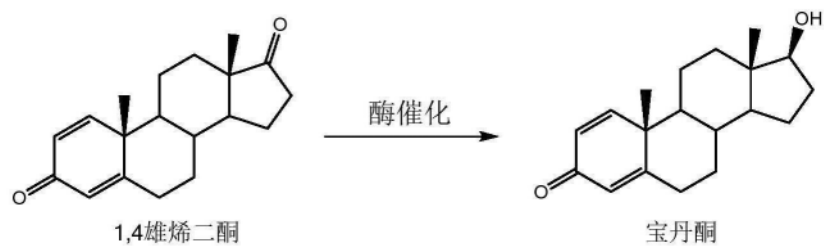


图14

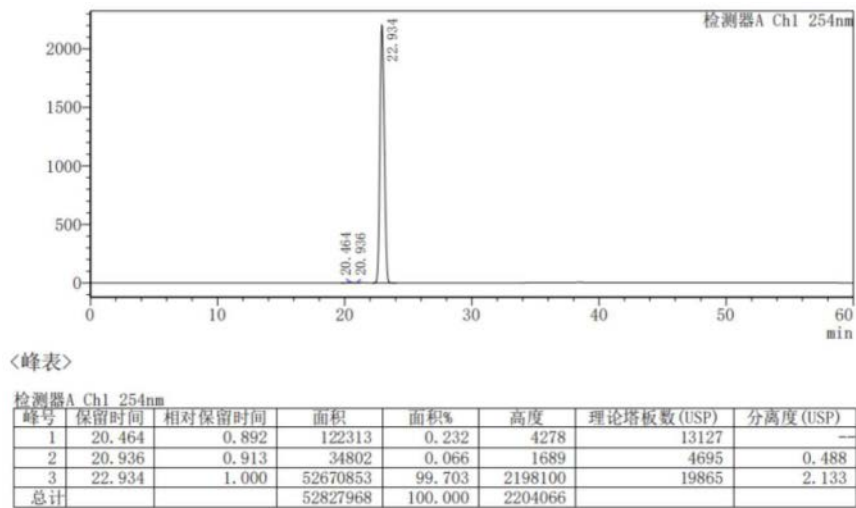


图15

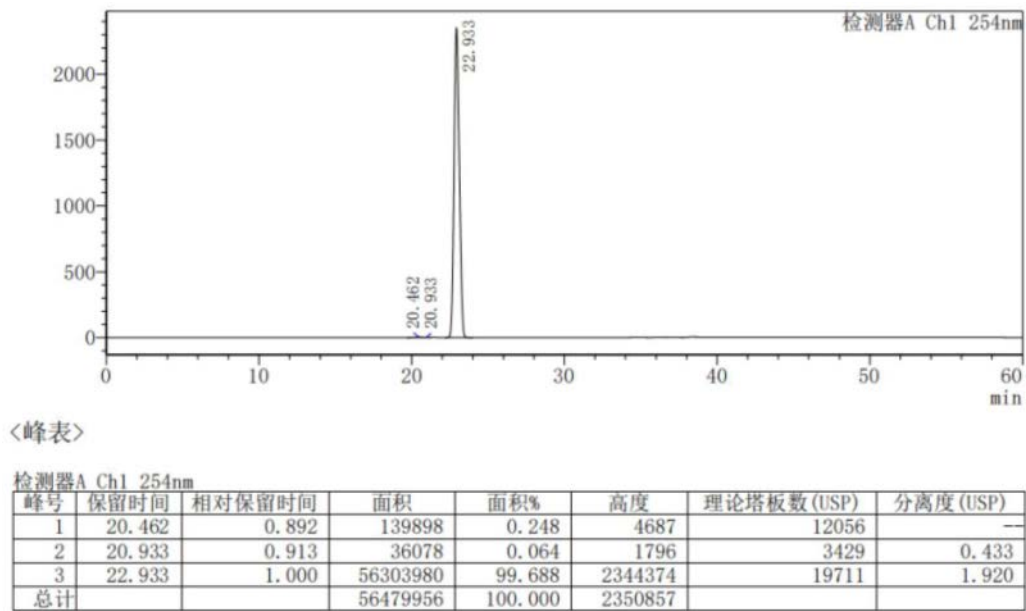


图16