



(21) 申请号 202211136276.3

(22) 申请日 2022.09.19

(71) 申请人 湖北共同药业股份有限公司

地址 441000 湖北省襄阳市宜城市小河高
坑一组

(72) 发明人 陶琳 系祖斌 艾文 马雷 杨兵

(74) 专利代理机构 北京睿智保诚专利代理事务
所(普通合伙) 11732

专利代理师 张宁

(51) Int.Cl.

C12P 33/10 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,属于生物合成技术领域。本发明提供的一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,包括如下步骤:(1)将赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中,在26~28℃下培养20~30h,得到赭曲霉种子液;(2)将赭曲霉种子液按照8~12v/v%的接种量接种于发酵培养基中,在28~30℃下培养,培养期间每隔3~5h进行一次超声处理,培养16~20h后,得到发酵液;(3)在所述发酵液中加入17 α -羟基黄体酮,继续发酵60~80h即可。本发明通过调整赭曲霉所处培养基的渗透压和辅以超声处理提高了赭曲霉对11 α ,17 α -羟基黄体酮的生产效率。

1. 一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中,在26~28℃下培养20~30h,得到赭曲霉种子液;

(2) 将赭曲霉种子液按照8~12v/v%的接种量接种于发酵培养基中,在28~30℃下培养,培养期间每隔3~5h进行一次超声处理,培养16~20h后,得到发酵液;

(3) 在所述发酵液中加入17 α -羟基黄体酮,继续发酵60~80h即可。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述种子培养基包括如下浓度的组分:葡萄糖15~25g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.2~0.4mol/L, pH=6.0~7.0。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述发酵培养基包括如下浓度的组分:葡萄糖20~40g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.5~0.7mol/L, pH=6.0~7.0。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述超声处理的频率为0.5~1MHz,声强为0.1~1.0W/cm²,时间为5~15min。

5. 如权利要求1~4任一项所述的方法,其特征在于,所述17 α -羟基黄体酮加入发酵液后的浓度为40~50g/L。

一种制备11 α , 17 α -羟基黄体酮的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物合成技术领域,尤其涉及一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法。

背景技术

[0002] 11 α ,17 α -羟基黄体酮是合成甾体类药物醋酸泼尼松龙的重要中间体。11 α ,17 α -羟基黄体酮的制备是以17 α -羟基黄体酮为底物,通过霉菌发酵获得。但由于17 α -羟基黄体酮极低的水溶性,霉菌摄取困难,导致霉菌发酵生产11 α ,17 α -羟基黄体酮的效率较低。

[0003] 目前,主要是通过向霉菌发酵液中加入助溶剂的方式,增加17 α -羟基黄体酮的溶解性,提高生产效率。但是添加助溶剂不可避免的引入外源杂质,且助溶剂的成分可能对霉菌细胞或羟基化酶产生抑制作用,从而降低霉菌的生产能力,影响11 α ,17 α -羟基黄体酮的生产效率。因此,有必要提供一种新的制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,提高霉菌的生产11 α ,17 α -羟基黄体酮的能力。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,提高赭曲霉生产11 α ,17 α -羟基黄体酮的能力。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 将赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中,在26~28℃下培养20~30h,得到赭曲霉种子液;

[0008] (2) 将赭曲霉种子液按照8~12v/v%的接种量接种于发酵培养基中,在28~30℃下培养,培养期间每隔3~5h进行一次超声处理,培养16~20h后,得到发酵液;

[0009] (3) 在所述发酵液中加入17 α -羟基黄体酮,继续发酵60~80h即可。

[0010] 优选的,所述种子培养基包括如下浓度的组分:葡萄糖15~25g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.2~0.4mol/L,pH=6.0~7.0。

[0011] 优选的,所述发酵培养基包括如下浓度的组分:葡萄糖20~40g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.5~0.7mol/L,pH=6.0~7.0。

[0012] 优选的,所述超声处理的频率为0.5~1MHz,声强为0.1~1.0W/cm²,时间为5~15min。

[0013] 优选的,所述17 α -羟基黄体酮加入发酵液后的浓度为40~50g/L。

[0014] 本发明提供了一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,本发明通过调整赭曲霉所处培养基的渗透压和辅以超声处理改变赭曲霉菌细胞膜的通透性,增加了对17 α -羟基黄体酮底物的摄入能力,提高了对17 α -羟基黄体酮的转化率,最终提高了11 α ,17 α -羟基黄体酮的生产效率。本发明能够将11 α ,17 α -羟基黄体酮底物的浓度提高到50g/L,转化率保持在96%左右。

具体实施方式

[0015] 本发明提供了一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,包括如下步骤:

[0016] (1) 将赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中,在26~28℃下培养20~30h,得到赭曲霉种子液;

[0017] (2) 将赭曲霉种子液按照8~12v/v%的接种量接种于发酵培养基中,在28~30℃下培养,培养期间每隔3~5h进行一次超声处理,培养16~20h后,得到发酵液;

[0018] (3) 在所述发酵液中加入17 α -羟基黄体酮,继续发酵60~80h即可。

[0019] 本发明将赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中,在26~28℃下培养20~30h,得到赭曲霉种子液。

[0020] 在本发明中,所述赭曲霉孢子悬液是将赭曲霉先接种到斜面培养基上培养得到赭曲霉孢子,然后制备的赭曲霉孢子悬液。

[0021] 在本发明中,所述赭曲霉购自宁波明舟生物科技有限公司,菌种编号为B72170。

[0022] 在本发明中,所述斜面培养基优选包括如下浓度的组分:马铃薯15~25g/L、葡萄糖15~25g/L、琼脂15~25g/L、自然pH。进一步优选为马铃薯20g/L、葡萄糖20g/L、琼脂20g/L、自然pH。

[0023] 在本发明中,所述赭曲霉在斜面培养基上培养的温度优选为26~30℃,进一步优选为28℃;所述培养的时间优选为3~7天,进一步优选为5天。

[0024] 在本发明中,所述赭曲霉孢子悬液用含0.01%吐温-20的灭菌生理盐水配置。

[0025] 在本发明中,所述赭曲霉孢子悬液的浓度优选为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL,进一步优选为 10^8 个/mL。

[0026] 在本发明中,所述赭曲霉孢子悬液接种于种子培养基中的接种量优选为6~10v/v%,进一步优选为8v/v%。

[0027] 在本发明中,所述种子培养基,优选包括如下浓度的组分:葡萄糖15~25g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.2~0.4mol/L, pH=6.0~7.0,进一步优选包括如下浓度的组分:葡萄糖20g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.3mol/L, pH=7.0。

[0028] 在本发明中,所述赭曲霉种子液的培养温度进一步优选为27℃,时间进一步优选为25h。

[0029] 在本发明中,所述赭曲霉种子液培养时的转速优选为150~250r/min,进一步优选为200r/min。

[0030] 培养得到赭曲霉种子液后,将赭曲霉种子液按照8~12v/v%的接种量接种于发酵培养基中,在28~30℃下培养,培养期间每隔3~5h进行一次超声处理,培养16~20h后,得到发酵液。

[0031] 在本发明中,所述赭曲霉种子液的接种量进一步优选为10v/v%。

[0032] 在本发明中,所述发酵培养基,优选包括如下浓度的组分:葡萄糖20~40g/L、玉米浆20~30g/L、酵母膏10~30g/L、蛋白胨20~40g/L、NaCl 0.5~0.7mol/L, pH=6.0~7.0,进一步优选包括如下浓度的组分:葡萄糖30g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.6mol/L, pH=6.0。

[0033] 在本发明中,所述发酵液的培养温度进一步优选为29℃。

- [0034] 在本发明中,所述培养期间优选每隔4h进行一次超声处理。
- [0035] 在本发明中,所述超声处理的频率优选为0.5~1MHz,进一步优选为0.7MHz。
- [0036] 在本发明中,所述超声处理的声强优选为0.1~1.0W/cm²,进一步优选为0.5W/cm²。
- [0037] 在本发明中,所述每次超声处理的时间优选为5~15min,进一步优选为10min。
- [0038] 在本发明中,所述发酵液的培养时间进一步优选为18h。
- [0039] 在本发明中,所述发酵液培养期间维持转速优选为200~300r/min,进一步优选为280r/min。
- [0040] 制备得到发酵液后,在所述发酵液中加入17 α -羟基黄体酮,继续发酵60~80h即可。
- [0041] 在本发明中,所述17 α -羟基黄体酮加入发酵液后的浓度优选为40~50g/L,进一步优选为50g/L。
- [0042] 在本发明中,所述继续发酵的时间进一步优选为72h。
- [0043] 本发明在种子培养基和发酵培养基中添加氯化钠的目的是控制培养基的渗透压。
- [0044] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。
- [0045] 实施例1
- [0046] 配置斜面培养基(水):马铃薯20g/L、葡萄糖20g/L、琼脂20g/L,自然pH,121℃湿热灭菌30min。
- [0047] 将活化的赭曲霉(购自宁波明舟生物科技有限公司,菌种编号为B72170)。接种到斜面培养基上。在28℃下培养5天,得到赭曲霉孢子。
- [0048] 用含0.01%吐温-20的灭菌生理盐水配置赭曲霉孢子悬液,使悬液的菌浓度为10⁸个/mL。
- [0049] 配置种子培养基(水):葡萄糖20g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.3mol/L,pH=7.0,121℃湿热灭菌30min。
- [0050] 将配好的赭曲霉孢子悬液按照8v/v%的比例接种到种子培养基中,置于27℃、200r/min下培养25h,得到赭曲霉种子液。
- [0051] 配置发酵培养基(水):葡萄糖30g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.6mol/L,pH=6.0,121℃湿热灭菌20min。
- [0052] 将赭曲霉种子液按照10v/v%的比例接种到发酵培养基中,在29℃、250r/min下进行发酵,发酵期间每隔4h进行一次超声处理,每次超声处理的条件为:频率0.7MHz、声强0.5W/cm²、时间10min。培养18h后,得到发酵液,在发酵液中一次性加入17 α -羟基黄体酮作为发酵底物,其在发酵液中的初始浓度为50g/L。之后继续发酵72h,维持继续发酵的温度为29℃、250r/min,每隔4h进行一次超声处理,每次超声处理的频率为0.7MHz、声强为0.5W/cm²、时间为10min。
- [0053] 发酵终止后,利用高效液相色谱(HPLC)分析,终止发酵液中11 α ,17 α -羟基黄体酮的转化率为96%。
- [0054] 实施例2
- [0055] 配置斜面培养基(水):马铃薯15g/L、葡萄糖15g/L、琼脂15g/L,自然pH,121℃湿热灭菌30min。

[0056] 将活化的赭曲霉(购自宁波明舟生物科技有限公司,菌种编号为B72170)。接种到斜面培养基上。在26℃下培养7天,得到赭曲霉孢子。

[0057] 用含0.01%吐温-20的灭菌生理盐水配置赭曲霉孢子悬液,使悬液的菌浓度为 10^7 个/mL。

[0058] 配置种子培养基(水):葡萄糖25g/L、玉米浆30g/L、酵母膏30g/L、蛋白胨40g/L、NaCl 0.4mol/L,pH=7.0,121℃湿热灭菌30min。

[0059] 将配好的赭曲霉孢子悬液按照6v/v%的比例接种到种子培养基中,置于26℃、250r/min下培养20h,得到赭曲霉种子液。

[0060] 配置发酵培养基(水):葡萄糖30g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.6mol/L,pH=6.0,121℃湿热灭菌20min。

[0061] 将赭曲霉种子液按照8v/v%的比例接种到发酵培养基中,在30℃、200r/min下进行发酵,发酵期间每隔3h进行一次超声处理,每次超声处理的条件为:频率0.5MHz、声强 $0.1\text{W}/\text{cm}^2$ 、时间15min。培养18h后,得到发酵液,在发酵液中一次性加入17 α -羟基黄体酮作为发酵底物,其在发酵液中的初始浓度为40g/L。之后继续发酵60h,维持继续发酵的温度为30℃、200r/min,每隔3h进行一次超声处理,每次超声处理的频率为0.5MHz、声强为 $0.1\text{W}/\text{cm}^2$ 、时间为15min。

[0062] 发酵终止后,利用高效液相色谱(HPLC)分析,终止发酵液中11 α ,17 α -羟基黄体酮的转化率为98%。

[0063] 实施例3

[0064] 配置斜面培养基(水):马铃薯25g/L、葡萄糖25g/L、琼脂25g/L,自然pH,121℃湿热灭菌30min。

[0065] 将活化的赭曲霉(购自宁波明舟生物科技有限公司,菌种编号为B72170)。接种到斜面培养基上。在27℃下培养5天,得到赭曲霉孢子。

[0066] 用含0.01%吐温-20的灭菌生理盐水配置赭曲霉孢子悬液,使悬液的菌浓度为 10^8 个/mL。

[0067] 配置种子培养基(水):葡萄糖15g/L、玉米浆20g/L、酵母膏10g/L、蛋白胨20g/L、NaCl 0.2mol/L,pH=6.0,121℃湿热灭菌30min。

[0068] 将配好的赭曲霉孢子悬液按照10v/v%的比例接种到种子培养基中,置于28℃、150r/min下培养30h,得到赭曲霉种子液。

[0069] 配置发酵培养基(水):葡萄糖30g/L、玉米浆25g/L、酵母膏20g/L、蛋白胨30g/L、NaCl 0.6mol/L,pH=6.0,121℃湿热灭菌20min。

[0070] 将赭曲霉种子液按照12v/v%的比例接种到发酵培养基中,在28℃、300r/min下进行发酵,发酵期间每隔5h进行一次超声处理,每次超声处理的条件为:频率1.0MHz、声强 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 、时间5min。培养20h后,得到发酵液,在发酵液中一次性加入17 α -羟基黄体酮作为发酵底物,其在发酵液中的初始浓度为50g/L。之后继续发酵80h,维持继续发酵的温度为28℃、300r/min,每隔5h进行一次超声处理,每次超声处理的频率为1.0MHz、声强为 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 、时间为5min。

[0071] 发酵终止后,利用高效液相色谱(HPLC)分析,终止发酵液中11 α ,17 α -羟基黄体酮的转化率为95%。

[0072] 对比例1

[0073] 本对比例1与实施例1的区别在于没有进行超声处理,也没有在种子培养基和发酵培养基中添加氯化钠。本发明在种子培养基和发酵培养中添加氯化钠的作用是为了调解培养基的渗透压,通过改变赭曲霉细胞所处的渗透压环境,改变其细胞膜的通透性,从而提高赭曲霉菌对底物17 α -羟基黄体酮的摄入,提高赭曲霉生产11 α ,17 α -羟基黄体酮的能力。经过对对比例1终止发酵液的检测,在11 α ,17 α -羟基黄体酮的添加量为50g/L的情况下,其发酵液中11 α ,17 α -羟基黄体酮的转化率为47.8%,也就是说赭曲霉在对比例1的发酵条件下仅能转化23.9g/L的11 α ,17 α -羟基黄体酮。可见,本发明在超声辅助渗透压处理后,显著提高了赭曲霉生产11 α ,17 α -羟基黄体酮的能力。

[0074] 对比例2

[0075] 本对比例与实施例1的区别在于超声处理的条件不同,本对比例设置了两个对比:

[0076] (1) 超声处理的频率为50kHz、声强为50mW/cm²、时间为10min。

[0077] (2) 超声处理的频率为5MHz、声强为5W/cm²、时间为10min。

[0078] 经过对对比例2两个超声条件下终止发酵液的检测,在11 α ,17 α -羟基黄体酮的添加量为50g/L的情况下,发酵液中11 α ,17 α -羟基黄体酮的转化率分别为64.5%和26.7%,也就是说赭曲霉在对比例2第(1)超声条件下仅能转化32.25g/L的11 α ,17 α -羟基黄体酮,第(2)超声条件下仅能转化13.35g/L的11 α ,17 α -羟基黄体酮。可见,超声频率和声强对赭曲霉的细胞通透性和细胞活力具有显著影响。尤其是在显著增加超声频率和声强的情况下,其转化17 α -羟基黄体酮的能力甚至相对于空白对照(对比例1)大幅度下降了。这表明本发明给予的超声条件是能够显著促进赭曲霉生产性能的条件。

[0079] 由以上实施例可知,本发明提供了一种制备11 α ,17 α -羟基黄体酮的方法,本发明通过调整赭曲霉所处培养基的渗透压和辅以超声处理改变赭曲霉菌细胞膜的通透性,增加了对17 α -羟基黄体酮底物的摄入能力,提高了对17 α -羟基黄体酮的转化率,最终提高了11 α ,17 α -羟基黄体酮的生产效率。本发明能够将11 α ,17 α -羟基黄体酮底物的浓度提高到50g/L,转化率保持在96%左右。

[0080] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。