



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117487877 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202311322488.5

(22) 申请日 2023.10.12

(71) 申请人 黄冈人福药业有限责任公司

地址 438011 湖北省黄冈市黄州区火车站
经济开发区知青路一号

(72) 发明人 胡甜 陈海林 赵静 刘林 何鑫
汪洋 蔡啸 左权 宋庭宁

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 袁文正 黄益澍

(51) Int. Cl.

C12P 33/20 (2006.01)

C12P 33/10 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系及方
法

(57) 摘要

本发明公开了一种生产11 α -OH-坎利酮的
反应体系及方法,所述反应体系包含:坎利酮和
金龟子绿僵菌发酵液。本发明提供的反应体系和
方法操作简便、对设备要求低且底物转化率高。

1. 一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系,其特征在于,所述反应体系包含:坎利酮和金龟子绿僵菌发酵液。

2. 如权利要求1所述的反应体系,其特征在于,所述反应体系还包含卵磷脂;和/或,所述金龟子绿僵菌的保藏号为CGMCC No:3.17278;

优选地,所述坎利酮的投料的质量分数为1.5%-2%;和/或,所述卵磷脂的质量分数为1.5%-2%。

3. 一种生产11 α -OH-坎利酮的方法,其特征在于,利用如权利要求1或2所述的反应体系生产11 α -OH-坎利酮;

优选地,所述生产的条件选自以下一种或多种:

所述坎利酮的添加形式为干粉;

温度为25-30℃;

转速为200-300rpm;

2-5L/min通入空气;

转化40-50h。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述金龟子绿僵菌发酵液由种子液接种至发酵培养基中经发酵获得;

优选地,所述种子液由孢子悬液接种到种子培养基中经培养获得;所述孢子悬液例如由无菌水和孢子混合获得;

更优选地,所述孢子由金龟子绿僵菌接种至斜面培养获得。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述发酵的条件为25-30℃,200-300rpm,2-3L/min通入空气,培养15-20h;和/或,

所述种子液的培养条件为25-30℃,150-250rpm,培养15-20h;和/或,

所述斜面菌种的培养条件为25-30℃,恒温培养5-10天。

6. 如权利要求4或5所述的方法,其特征在于,所述种子培养基和/或发酵培养基的成分包括:葡萄糖10g/L,黄豆粉10g/L,蝉蛹粉5g/L,余量为水;

优选地,所述斜面培养基的成分包括:马铃薯200g/L、葡萄糖20g/L、琼脂15-20g/L,余量为水。

7. 如权利要求4-6任一项所述的方法,其特征在于,所述种子液的接种体积比为5%-10%;和/或,

所述孢子悬液的接种体积比为4%-6%;和/或,

所述孢子悬液的浓度为 8×10^6 - 1.5×10^8 个/mL。

8. 如权利要求3-7任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括纯化的步骤;

优选地,所述纯化选自萃取、浓缩、析晶和过滤中的一种或多种。

9. 一种金龟子绿僵菌或如权利要求1或2所述的反应体系在生产11 α -OH-坎利酮中的应用。

10. 如权利要求9所述的应用,其中,所述金龟子绿僵菌的保藏号为CGMCC No:3.17278。

一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系及方法

技术领域

[0001] 本发明属于应用微生物技术领域,涉及一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系及方法。

背景技术

[0002] 坎利酮(canrenone)是一种甾体激素类药物,在临床上主要用作非选择性醛固酮受体拮抗剂来治疗心血管疾病,可有效阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的作用,但在心脏病治疗中有可能引起用药过量而致死的风险。另一种药物依普利酮(eplerenone)就可以大大降低这种风险,且可以通过中间体11 α -OH-坎利酮来合成。

[0003] 目前微生物转化坎利酮生产11 α -OH-坎利酮有一些研究和报道,主要是利用赭曲霉和根霉等。专利申请CN104046675A利用根霉(*Rhizopus* sp.UJ-0602)的酶液生产11 α -OH-坎利酮,专利申请CN103255192A利用赭曲霉(*Aspergillus ochraceus* TCCC41060)通过高密度发酵高效生产11 α -OH-坎利酮。同时,专利申请CN102876582A公开了金龟子绿僵菌突变株(*Metarhizium anisopliae*)11490可以在19-去甲基-13-乙基-雄甾-4-烯-3,17-二酮、雄甾-4-烯-3,17-二酮及雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮上有效的引入11 α 羟基。也有报道金龟子绿僵菌还可以在甾体底物16 α ,17 α 环氧黄体酮上引入11 α 羟基,具有广泛的甾体底物选择性。但是利用金龟子绿僵菌转化坎利酮合成11 α -OH-坎利酮还鲜有报道。

[0004] 上述现有技术存在以下问题:专利申请CN104046675A需要将菌体用超声波破碎得到含羟化酶的酶液,然后进行转化,投料量5g/L,转化84h,11 α -OH-坎利酮纯度达到96.0%。专利申请CN103255192A在发酵过程需要流加葡萄糖实现高密度发酵,投料量15g/L时,转化58h,转化率97%。操作繁琐,对设备的要求高,且增加了成本。

发明内容

[0005] 为了解决现有合成11 α -OH-坎利酮的技术中存在的操作繁琐、对设备的要求高和成本高的问题,本发明提供了一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系及方法,本发明提供的反应体系和方法操作简便、对设备要求低且底物转化率高。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明的第一方面提供了一种生产11 α -OH-坎利酮的反应体系,所述反应体系包含:坎利酮和金龟子绿僵菌发酵液。

[0007] 在本发明的一些实施方案中,所述反应体系还包含卵磷脂;和/或,所述金龟子绿僵菌的保藏号为CGMCC No:3.17278。

[0008] 在本发明的一些优选实施方案中,所述坎利酮的投料的质量分数为1.5%-2%,例如1.5%、1.8%或2%;和/或,所述卵磷脂的质量分数为1.5%-2%,例如1.5%或2%。

[0009] 为了解决上述技术问题,本发明的第二方面提供了一种生产11 α -OH-坎利酮的方法,所述方法为利用如本发明第一方面所述的反应体系生产11 α -OH-坎利酮。

[0010] 在本发明的一些优选实施方案中,所述生产的条件选自以下一种或多种:

[0011] 所述坎利酮的添加形式为干粉;和/或,

- [0012] 温度为25-30℃,例如28℃、29℃或30℃;
- [0013] 转速为200-300rpm,例如200rpm或250rpm;
- [0014] 2-5L/min通入空气,例如3L/min;
- [0015] 转化40-50h,例如42h或48h。
- [0016] 在本发明的一些实施方案中,所述金龟子绿僵菌发酵液由种子液接种至发酵培养基中经发酵获得。
- [0017] 在本发明的一些优选实施方案中,所述种子液由孢子悬液接种到种子培养基中经培养获得;所述孢子悬液例如由无菌水和孢子混合获得。
- [0018] 在本发明的一些更优选实施方案中,所述孢子由金龟子绿僵菌接种至斜面培养获得。
- [0019] 在本发明的一些实施方案中,所述发酵的条件为25-30℃,200-300rpm,2-3L/min通入空气,培养15-20h;和/或,
- [0020] 所述种子液的培养条件为25-30℃,150-250rpm,培养15-20h;和/或,
- [0021] 所述斜面菌种的培养条件为25-30℃,恒温培养5-10天。
- [0022] 在本发明的一些实施方案中,所述种子培养基和/或发酵培养基的成分包括:葡萄糖10g/L,黄豆粉10g/L,蝉蛹粉5g/L,余量为水。
- [0023] 在本发明的一些优选实施方案中,所述斜面培养基的成分包括:马铃薯200g/L、葡萄糖20g/L、琼脂15-20g/L,余量为水。
- [0024] 在本发明的一些实施方案中,所述种子液的接种体积比为5%-10%;和/或,
- [0025] 所述孢子悬液的接种体积比为4%-6%;和/或,
- [0026] 所述孢子悬液的浓度为 8×10^6 - 1.5×10^8 个/mL。
- [0027] 在本发明的一些实施方案中,所述方法还包括纯化的步骤;
- [0028] 在本发明的一些优选实施方案中,所述纯化选自萃取、浓缩、析晶和过滤中的一种或多种。
- [0029] 为了解决上述技术问题,本发明的第三方面提供了一种金龟子绿僵菌或如本发明的第一方面所述的反应体系在生产11 α -OH-坎利酮中的应用。
- [0030] 在本发明的一些优选实施方案中,其中,所述金龟子绿僵菌的保藏号为CGMCC No: 3.17278。
- [0031] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。
- [0032] 本发明所用试剂和原料均市售可得。
- [0033] 本发明的积极进步效果在于:
- [0034] 本发明直接利用金龟子绿僵菌GD-6生产11 α -OH-坎利酮,投料量20g/L时,转化48h,产物纯度高达98.7%,更加高效,操作更加简单,对设备要求低。

附图说明

- [0035] 图1为转化结束后的具体纯化步骤。

具体实施方式

[0036] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0037] 实施例1金龟子绿僵菌发酵制备11 α -OH-坎利酮

[0038] 1.斜面菌种制备:将金龟子绿僵菌(CGMCC 3.17278)接种到斜面培养基(PDA):马铃薯200g/L、葡萄糖20g/L、琼脂15-20g/L、自然pH。28℃恒温培养7天,待其表面布满菌丝,且菌丝开始变绿,得到斜面菌种。

[0039] 2.孢子悬液制备:将无菌水加入到斜面菌种中,洗下孢子,用6层擦镜纸过滤掉菌丝体得到孢子悬液,用无菌水调节孢子悬液浓度为 2.46×10^7 个/mL。

[0040] 3.种子液制备:将孢子悬液以体积比5%的接种量接种到种子培养基(葡萄糖10g/L,黄豆粉10g/L,蝉蛹粉5g/L)中,装液量50mL/250mL三角瓶。29℃,170rpm培养16h,得到种子液。

[0041] 4.发酵液制备:将种子液以体积比5%的接种量接种到发酵培养基(葡萄糖10g/L,黄豆粉10g/L,蝉蛹粉5g/L)中。发酵培养基占发酵罐体积比为70%,28℃,200rpm,2L/min通入空气培养16h得到发酵液。

[0042] 5.转化过程:在发酵液中直接加入坎利酮干粉,投料浓度1.5%,同时加入1.5%卵磷脂,28℃,200rpm,3L/min通入空气转化42h,得到11 α -羟基化坎利酮。转化结束用乙酸乙酯进行萃取、浓缩、析晶、过滤得到11 α -OH-坎利酮,具体操作如图1所示。相比已有报道酶液法和高密度发酵法,此方法不需要非常规设备辅助。

[0043] 6.HPLC检测:仪器:HPLC LC-40DXR岛津

[0044] 检测方法:

[0045] (1)溶液的配制:

[0046] 取样品,用乙腈-水(60:40)溶液分别配制浓度为0.5mg/ml的溶液。

[0047] (2)色谱条件:

[0048] 色谱柱:c18 250*4.6mm 5 μ m

[0049] 流速:1.0ml/min

[0050] 柱温:室温

[0051] 波长:280nm

[0052] 进样量:20 μ l

[0053] 流动相:乙腈:水=60:40(v/v)

[0054] 稀释液:乙腈:水=60:40

[0055] HPLC检测纯度95.3%。

[0056] 实施例2金龟子绿僵菌发酵制备11 α -OH-坎利酮

[0057] 1.斜面菌种制备:将金龟子绿僵菌接种到斜面培养基,28℃恒温培养8天,待其表面布满菌丝,且菌丝开始变绿,得到斜面菌种。

[0058] 2.孢子悬液制备:将无菌水加入到斜面菌种中,洗下孢子,用6层擦镜纸过滤掉菌丝体得到孢子悬液,用无菌水调节孢子悬液浓度为 8.2×10^6 个/mL。

[0059] 3.种子液制备:将孢子悬液以体积比6%的接种量接种到种子培养基中,装液量

50mL/250mL三角瓶。30℃,200rpm培养18h,得到种子液。

[0060] 4.发酵液制备:将种子液以体积比8%的接种量接种到发酵培养基中。发酵培养基占发酵罐体积比为60%,30℃,200rpm,2L/min通入空气培养18h得到发酵液。

[0061] 5.转化过程:在发酵液中直接加入坎利酮干粉,投料浓度1.8%,同时加入2%卵磷脂,30℃,200rpm,3L/min通入空气转化48h,得到11 α -羟基化坎利酮。转化结束用乙酸乙酯进行萃取、浓缩、析晶、过滤得到11 α -OH-坎利酮,具体操作如图1所示。HPLC检测纯度98.3%。

[0062] 实施例3金龟子绿僵菌发酵制备11 α -OH-坎利酮

[0063] 1.斜面菌种制备:将金龟子绿僵菌接种到斜面培养基,29℃恒温培养8天,待其表面布满菌丝,且菌丝开始变绿,得到斜面菌种。

[0064] 2.孢子悬液制备:将无菌水加入到斜面菌种中,洗下孢子,用6层擦镜纸过滤掉菌丝体得到孢子悬液,用无菌水调节孢子悬液浓度为 1.23×10^8 个/mL。

[0065] 3.种子液制备:将孢子悬液以体积比4%的接种量接种到种子培养基中,装液量50mL/250mL三角瓶。29℃,220rpm培养17h,得到种子液。

[0066] 4.发酵液制备:将种子液以体积比8%的接种量接种到发酵培养基中。发酵培养基占发酵罐体积比为70%,29℃,200rpm,3L/min通入空气培养17h得到发酵液。

[0067] 5.转化过程:在发酵液中直接加入坎利酮干粉,投料浓度2%,同时加入2%卵磷脂,29℃,250rpm,3L/min通入空气转化48h,得到11 α -羟基化坎利酮。转化结束用乙酸乙酯进行萃取、浓缩、析晶、过滤得到11 α -OH-坎利酮,具体操作如图1所示。HPLC检测纯度98.7%。

[0068] 实施例4金龟子绿僵菌发酵制备11 α -OH-坎利酮

[0069] 1.斜面菌种制备:将金龟子绿僵菌接种到斜面培养基,28℃恒温培养7天,待其表面布满菌丝,且菌丝开始变绿,得到斜面菌种。

[0070] 2.孢子悬液制备:将无菌水加入到斜面菌种中,洗下孢子,用6层擦镜纸过滤掉菌丝体得到孢子悬液,用无菌水调节孢子悬液浓度为 9.2×10^7 个/mL。

[0071] 3.种子液制备:将孢子悬液以体积比6%的接种量接种到种子培养基中,装液量50mL/250mL三角瓶。30℃,200rpm培养18h,得到种子液。

[0072] 4.发酵液制备:将种子液以体积比5%的接种量接种到发酵培养基中。发酵培养基占发酵罐体积比为70%,28℃,200rpm,2L/min通入空气培养18h得到发酵液。

[0073] 5.转化过程:在发酵液中直接加入坎利酮干粉,投料浓度1.5%,先用DMF将底物溶解,30℃,200rpm,3L/min通入空气转化48h,得到11 α -羟基化坎利酮。转化结束用乙酸乙酯进行萃取、浓缩、析晶、过滤得到11 α -OH-坎利酮,具体操作如图1所示。HPLC检测纯度80.85%。

[0074] 实施例5金龟子绿僵菌发酵制备11 α -OH-坎利酮

[0075] 1.斜面菌种制备:将金龟子绿僵菌接种到斜面培养基,29℃恒温培养8天,待其表面布满菌丝,且菌丝开始变绿,得到斜面菌种。

[0076] 2.孢子悬液制备:将无菌水加入到斜面菌种中,洗下孢子,用6层擦镜纸过滤掉菌丝体得到孢子悬液,用无菌水调节孢子悬液浓度为 1.23×10^8 个/mL。

[0077] 3.种子液制备:将孢子悬液以体积比4%的接种量接种到种子培养基中,装液量

50mL/250mL三角瓶。29℃,220rpm培养17h,得到种子液。

[0078] 4.发酵液制备:将种子液以体积比8%的接种量接种到发酵培养基中。发酵培养基占发酵罐体积比为70%,29℃,200rpm,3L/min通入空气培养17h得到发酵液。

[0079] 5.转化过程:在发酵液中直接加入坎利酮干粉,投料浓度2%,不加入卵磷脂,29℃,250rpm,3L/min通入空气转化48h,得到11 α -羟基化坎利酮。转化结束用乙酸乙酯进行萃取、浓缩、析晶、过滤得到11 α -OH-坎利酮,具体操作如图1所示。HPLC检测纯度62.9%。

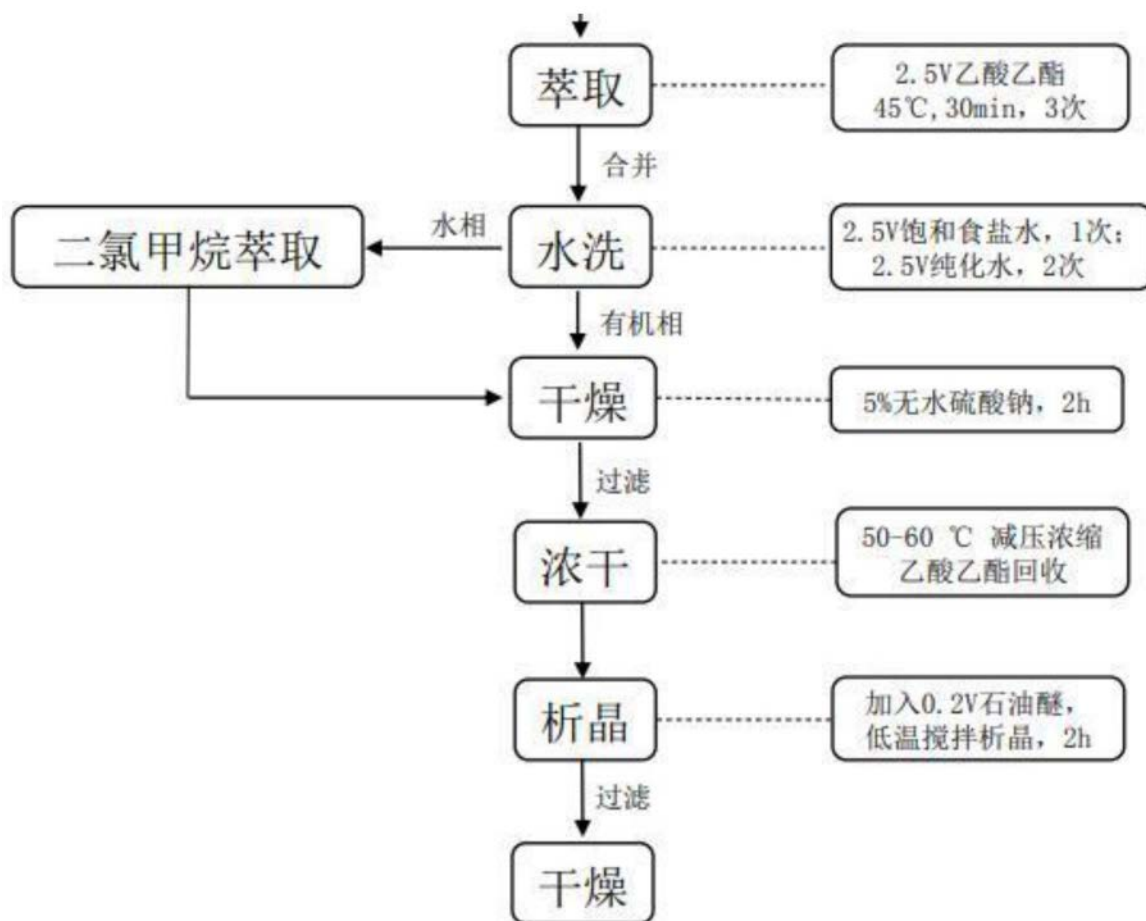


图1