



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111593086 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 05

(21) 申请号 202010460194.9

(22) 申请日 2020.05.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111593086 A

(43) 申请公布日 2020.08.28

(73) 专利权人 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 陈海林 蔡啸 宋盟军 应娟

狄飞飞 汪洋 胡甜

(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 乔宇

(51) Int. Cl.

C12P 33/10 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

审查员 张范范

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法,包括如下步骤:将绿僵菌菌种培养获得绿僵菌菌体,收集菌体;收集菌体后投料转化:将底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用由DMF和DMSO组成的混合溶剂溶解,将收集的菌体投入到底物中,将底物转化为11 $\alpha$ -羟基-18-甲基雌甾-4-烯-3,17-二酮。本发明方法可明显减少乙基双酮生物羟化产物中杂质的生成,尤其是10 $\alpha$ -OH乙基双酮和6 $\beta$ -乙基双酮的生成,提升了转化率,并简化了后处理工艺,提高了平均收率。

1. 一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 采用保藏编号为CGMCC No.3.17278的金龟子绿僵菌菌株,将绿僵菌菌种培养获得绿僵菌菌体,收集菌体;

(2) 收集菌体后投料转化:将底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用由DMF和DMSO组成的混合溶剂溶解,所用混合溶剂中按体积比计,DMF:DMSO=1~20:1,将收集的菌体投入到底物中,将底物转化为11 $\alpha$ -羟基-18-甲基雌甾-4-烯-3,17-二酮。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)的转化时间为24-50h。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)的转化温度为20-40℃。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:底物的溶解温度在40-90℃,所用混合溶剂的量为底物投料量的1~20倍。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述底物和菌体的质量比例为1~10:1。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)的培养方法为:

(1.1) 将绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养;

(1.2) 将上述菌种在无菌条件下接种于装有液体培养基的摇瓶中,旋转式摇床培养得种子液;

(1.3) 培养好的摇瓶种子液转接至小罐培养,获得菌体。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:步骤(1.1)中绿僵菌菌株培养温度为25-32℃,培养时间3-10天;

所述步骤(1.2)中,摇床培养转速为100-200rpm,培养温度为25-32℃,培养时间10-20h;

所述步骤(1.3)中,小罐培养时间为16-48h,培养温度为25-32℃,通气量为0.2-1.2vvm。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述的液体培养基为7.5~10g/L葡萄糖、7.5~10g/L黄豆粉、3.5~5g/L蚕蛹粉。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:11 $\alpha$ -羟基-18-甲基雌甾-4-烯-3,17-二酮的转化率达到60%,收率达到50%。

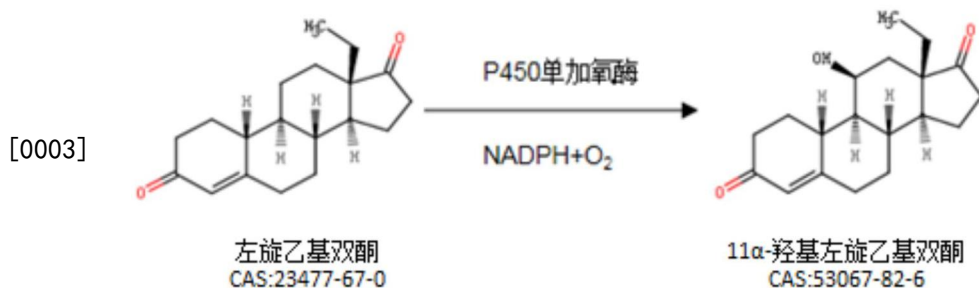
## 一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法。

### 背景技术

[0002] 现有技术公开了甾体合成中生物转化的应用,主要包括羟基化、边链降解、双键还原等。相比于化学法,生物转化具有反应温和、污染少、收率高等特点。因此在甾体合成中,通常利用两者的优势配合使用。尽管微生物转化具有独特的优势,但工业应用中常受到实际困难的制约,其中,去氧孕烯合成过程中,乙基双酮的11 $\alpha$ 羟化是整个合成工艺中关键的一步,目前工业生产中存在产率低、杂质多的情况。因此降低杂质的含量,提高转化率是目前面临的主要问题。



[0004] 目前乙基双酮的11 $\alpha$ -羟化主要采用微生物细胞转化的方法,文献“11 $\alpha$ -羟基化左旋乙基甾烯双酮的生物催化”和“金龟子绿僵菌对甾体C11- $\alpha$ 羟化反应工艺的研究”都有所报道,所采用的菌株为赭曲霉和绿僵菌,转化率在30-60%,收率在30%左右,转化过程中杂质点多,后处理一步用浓缩低温重结晶方法,需要反复进行4~5次去除杂质,处理过程非常繁琐困难。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种简单有效的利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供的技术解决方案如下:

[0007] 一种利用混合溶剂减少乙基双酮11 $\alpha$ 羟化过程中杂质的方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将绿僵菌菌种培养获得绿僵菌菌体,收集菌体;

[0009] (2) 收集菌体后投料转化:将底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用由DMF和DMSO组成的混合溶剂溶解,将收集的菌体投入到底物中,将底物转化为11 $\alpha$ -羟基-18-甲基雌甾-4-烯-3,17-二酮。

[0010] 按上述方案,所述步骤(2)的转化时间为24-50h。

[0011] 按上述方案,所述步骤(2)的转化温度为20-40℃。

[0012] 按上述方案,所述步骤(2)中,所用混合溶剂中按体积比计,DMF:DMSO=1~20:1。

[0013] 按上述方案,底物的溶解温度在40-90℃,所用混合溶剂的量为底物投料量的1~20倍。

[0014] 按上述方案,所述底物和菌体的质量比例为1~10:1。

[0015] 按上述方案,所述步骤(1)的培养方法为:

[0016] (1.1)将绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养;

[0017] (1.2)将上述菌种在无菌条件下接种于装有液体培养基的摇瓶中,旋转式摇床培养得种子液;

[0018] (1.3)培养好的摇瓶种子液转接至小罐培养,获得菌体。

[0019] 按上述方案,步骤(1.1)中绿僵菌菌株培养温度为25-32℃,培养时间3-10天。

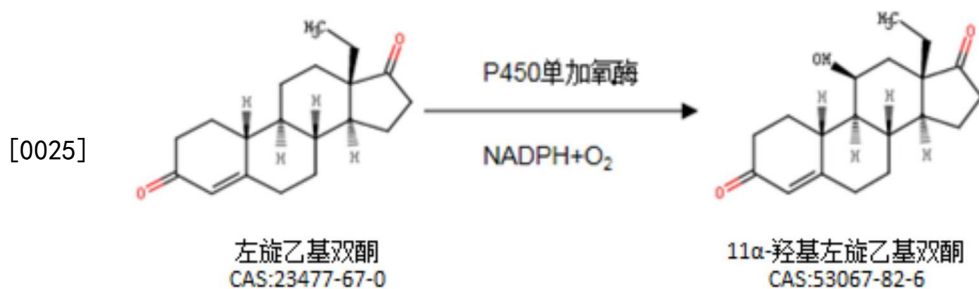
[0020] 按上述方案,所述的液体培养基为7.5~10g/L葡萄糖、7.5~10g/L黄豆粉、3.5~5g/L蚕蛹粉。

[0021] 按上述方案,所述步骤(1.2)中,摇床培养转速为100-200rpm,培养温度为25-32℃,培养时间10-20h。

[0022] 按上述方案,所述步骤(1.3)中,小罐培养时间为16-48h,培养温度为25-32℃,通气量为0.2-1.2vvm。

[0023] 按上述方案,本方案处理的得到11 $\alpha$ -OH乙基双酮转化率达到60%,收率达到50%,产品纯度 $\geq$ 99.5%。

[0024] 本发明通过利用DMF和DMSO一定配比的混合溶剂,优化了绿僵菌羟基化的代谢通路减少了杂质的生成,尤其是10 $\alpha$ -OH乙基双酮和6 $\beta$ -乙基双酮的生成,提升了转化率,并简化了后处理工艺,提高了平均收率,产品纯度高,可达99.9%。



[0026] 乙基双酮生物催化合成11 $\alpha$ -OH乙基双酮的过程中,主要生成以下几种杂质:6 $\beta$ -OH乙基双酮、10 $\alpha$ -OH乙基双酮、6 $\beta$ ,10 $\alpha$ -OH乙基双酮,其中10 $\alpha$ -OH乙基双酮由于与11 $\alpha$ -OH乙基双酮性状相近,在实际工业生产中难以分离,而在实验过程中,我们通过使用DMF和DMSO混合溶剂进行投料转化,发现10 $\alpha$ -OH乙基双酮和6 $\beta$ -乙基双酮的生成量显著下降,11 $\alpha$ -OH乙基双酮产量有一定提升,得到的转化液经浓缩结晶后即可得到纯度 $\geq$ 99.5%的11 $\alpha$ -OH乙基双酮。

[0027] 本发明的有益效果如下:

[0028] 本发明方法可明显减少乙基双酮生物羟化产物中杂质的生成,尤其是10 $\alpha$ -OH乙基双酮和6 $\beta$ -乙基双酮的生成,提升了转化率,并简化了后处理工艺,提高了平均收率,底物转化率高,转化率可达到60%,收率可达到50%。

[0029] 操作简单,产品后处理分离过程不需要特殊的分离提纯设备,正常的浓缩结晶即可得到合格品。

#### 附图说明

[0030] 图1为本发明工艺流程图。

## 具体实施方式

[0031] 对比例一：

[0032] 取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,25℃培养3-10天。

[0033] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为150rpm,培养温度为27℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、4g/L蚕蛹粉,培养14h。

[0034] 小罐培养时间为16h,培养温度为27℃,通气量为0.1vvm。

[0035] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:3,底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用DMF溶剂500mL溶解,温度40℃,转化24h,投料浓度4g/L,投料量52g,24℃转化24h,升温至70℃维持5min,终止反应。抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率52.2%,已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为8.5%、7.2%、18.5%,纯化后得到合格品22.46g,收率43.2%。

[0036] 对比例二：

[0037] 取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,28℃培养3-10天。

[0038] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为150rpm,培养温度为27℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、4g/L蚕蛹粉,培养14h。

[0039] 小罐培养时间为16h,培养温度为27℃,通气量为0.2vvm。

[0040] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:5,底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用DMSO溶剂500mL溶解,温度50℃,转化24h,投料浓度4g/L,投料量58g,24℃转化24h,升温至70℃维持5min,终止反应。抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率54.9%,已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为7.6%、8.3%、19.7%纯化后得到合格品27.96g,收率48.2%。

[0041] 实施例一：

[0042] 如图1所示,取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,28℃培养3-10天。

[0043] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为150rpm,培养温度为27℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、4g/L蚕蛹粉,培养14h。

[0044] 小罐培养时间为16h,培养温度为27℃,通气量为0.5vvm。

[0045] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:7,底物DL-18-甲基-4-雌烯-3,17-二酮采用DMF和DMSO的混合溶剂500mL溶解,温度55℃,体积比DMF:DMSO=5:1,投料浓度4g/L,投料量56g,24℃转化24h,升温至70℃维持5min,终止反应。抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率62%,已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为1.3%、0.8%、12.3%纯化后得到合格品28.34g,纯度99.6%,含量99.3%,收率50.6%。

[0046] 实施例二：

[0047] 如图1所示,取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,28℃培养3-10天。

[0048] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为160rpm,培养温度为29℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、8.5g/L蚕蛹粉,培养15h。

[0049] 小罐培养时间为30h,培养温度为32℃,通气量为0.8vvm。

[0050] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:1,底物采用DMF和DMSO溶解,溶料温度60℃,转化24h,DMF:DMSO=8:1,投料浓度4g/L,投料量50g,使用溶剂500ml,32℃转化40h,升温至70℃维持5min,终止反应,抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率60.5%,粗品中含已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为2.4%、0.3%、13.5%,纯化后得到合格品26.25g,纯度99.8%,含量99.3%,收率52.5%。

[0051] 实施例三:

[0052] 如图1所示,取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,28℃培养3-10天。

[0053] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为180rpm,培养温度为30℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、4g/L蚕蛹粉,培养16h。

[0054] 小罐培养时间为24h,培养温度为27℃,通气量为1.2vvm。

[0055] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:10,底物采用DMF和DMSO溶解,转化24h,DMF:DMSO=10:1,投料浓度4g/L,投料量60g,使用溶剂500ml,溶料温度70℃,40℃转化24h,升温至70℃维持5min,终止反应,抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率64%,粗品中含已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为3.1%、0.5%、19.6%,纯化后得到合格品31.07g,纯度99.8%,含量99.3%,收率51.7%。

[0056] 实施例四:

[0057] 如图1所示,取绿僵菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基培养,28℃培养3-10天。

[0058] 取一环转接至摇瓶培养基培养,摇床培养转速为180rpm,培养温度为28℃,液体培养基为8.5g/L葡萄糖、8.5g/L黄豆粉、4g/L蚕蛹粉,培养16h。

[0059] 小罐培养时间为24h,培养温度为29℃,通气量为0.8vvm。

[0060] 收集菌体后投料转化,底物和菌体质量比为1:6,底物采用DMF和DMSO溶解,溶料温度65℃,转化24h,DMF:DMSO=20:1,投料浓度4g/L,投料量60g,使用溶剂500ml,32℃转化50h,升温至70℃维持5min,终止反应,抽滤得菌体后用500ml乙酸乙酯萃取30min,重复三次,合并萃取液浓缩析晶,转化率60%,粗品中含已知杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为7.2%、0.1%、24.3%,纯化后得到合格品30.05g,收率50.0%,含量99.5%,纯度99.9%。

[0061] 如果混合溶剂中DMF含量较少(低于1:1),或DMSO含量较多(大于20:1),杂质含量会更高,我们测试采用DMF:DMSO=0.5:1条件下,杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为8.2%、6.2%、26.3%,

[0062] DMF:DMSO=25:1条件下,杂质6β-OH乙基双酮、10α-OH乙基双酮,6β,10α-OH乙基双酮含量分别为7.0%、5.6%、25.3%。

[0063] 上述实施例中的绿僵菌可采用CGMCC No.3.17278(保藏日期2014年3月31日)的金龟子绿僵菌菌株。

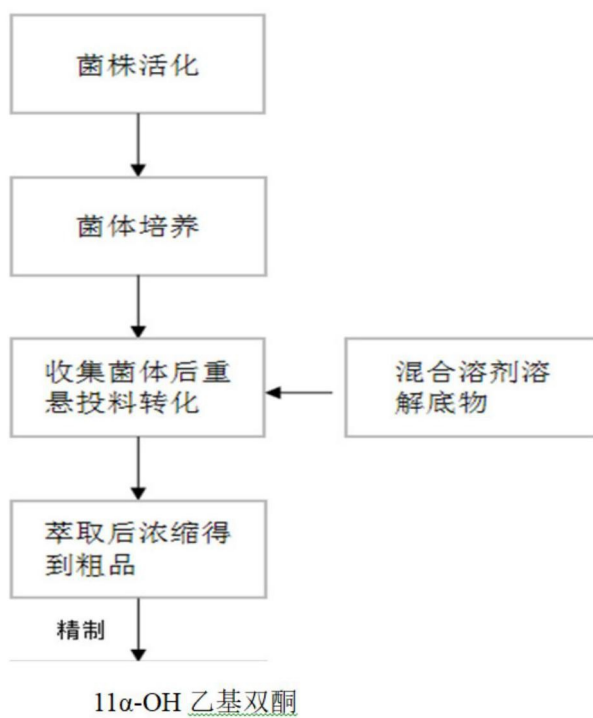


图1