



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201343623 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：102103119

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 28 日

(51)Int. Cl.：

C07C59/19 (2006.01)

C12P7/28 (2006.01)

C12P7/56 (2006.01)

C12P19/24 (2006.01)

C12P33/02 (2006.01)

C12P33/16 (2006.01)

(30)優先權：2012/02/07

歐洲專利局

12450007.5

2012/09/12

世界智慧財產權組織

PCT/EP2012/067781

2012/12/10

奧地利

A1284/2012

(71)申請人：安尼基有限公司 (奧地利) ANNIKKI GMBH (AT)

奧地利

(72)發明人：爾托 奧特溫 ERTL, ORTWIN (AT)；史陶尼 妮可 STAUNIG, NICOLE (AT)；

沙特 瑪塔 SUT, MARTA (PL)；梅爾 班德 MAYER, BERND (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：11 共 60 頁

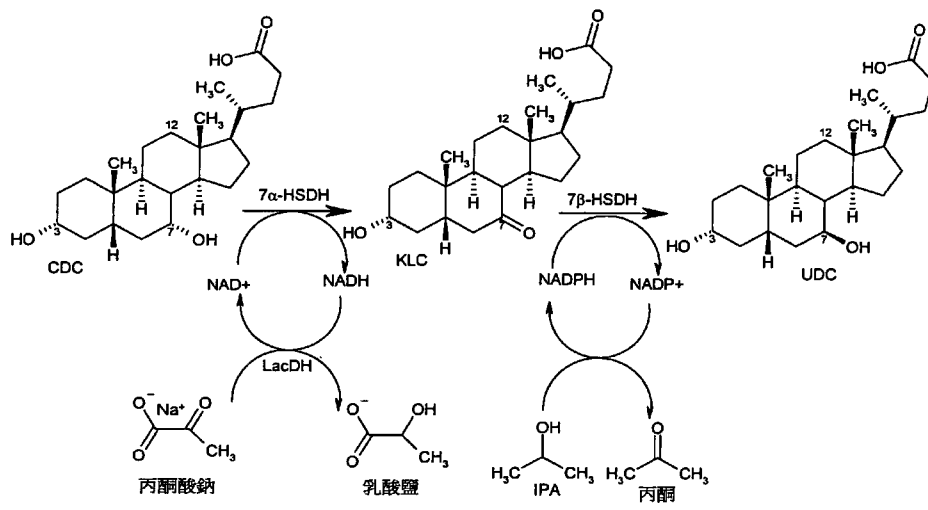
(54)名稱

使氧化還原輔因子經酶催化再生之方法

PROCESS FOR THE ENZYMATIC REGENERATION OF REDOX COFACTORS

(57)摘要

一種使氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應(one-pot reaction)中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次(產物形成反應)中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：a)在經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，氧或通式 $\text{R}_1\text{C}(\text{O})\text{COOH}$ 之化合物被還原，及 b)在經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，通式 $\text{R}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_3$ 之化合物被氧化，該等化合物中之 R_1 、 R_2 和 R_3 具有不同意義。



第 1 圖



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201343623 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：102103119

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 28 日

(51)Int. Cl.：

C07C59/19 (2006.01)

C12P7/28 (2006.01)

C12P7/56 (2006.01)

C12P19/24 (2006.01)

C12P33/02 (2006.01)

C12P33/16 (2006.01)

(30)優先權：2012/02/07

歐洲專利局

12450007.5

2012/09/12

世界智慧財產權組織

PCT/EP2012/067781

2012/12/10

奧地利

A1284/2012

(71)申請人：安尼基有限公司 (奧地利) ANNIKKI GMBH (AT)

奧地利

(72)發明人：爾托 奧特溫 ERTL, ORTWIN (AT)；史陶尼 妮可 STAUNIG, NICOLE (AT)；

沙特 瑪塔 SUT, MARTA (PL)；梅爾 班德 MAYER, BERND (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：11 共 60 頁

(54)名稱

使氧化還原輔因子經酶催化再生之方法

PROCESS FOR THE ENZYMATIC REGENERATION OF REDOX COFACTORS

(57)摘要

一種使氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應(one-pot reaction)中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次(產物形成反應)中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：a)在經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，氧或通式 $\text{R}_1\text{C}(\text{O})\text{COOH}$ 之化合物被還原，及 b)在經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，通式 $\text{R}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_3$ 之化合物被氧化，該等化合物中之 R_1 、 R_2 和 R_3 具有不同意義。

發明摘要

※申請案號：102103119

※申請日：102 年 01 月 28 日

※IPC 分類：

C07C59/19 (2006.01)
 C12P 01/58 (2006.01)
 C12P 01/56 (2006.01)
 C12P 14/54 (2006.01)
 C12P 33/62 (2006.01)
 C12P 33/66 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

使氧化還原輔因子經酶催化再生之方法

Process for the enzymatic regeneration of redox cofactors

【中文】

一種使氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應 (one-pot reaction) 中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次 (產物形成反應) 中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：a) 在經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，氧或通式 $\text{R}_1\text{C}(\text{O})\text{COOH}$ 之化合物被還原，及 b) 在經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，通式 $\text{R}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_3$ 之化合物被氧化，該等化合物中之 R_1 、 R_2 和 R_3 具有不同意義。

【 英文 】

A process for the enzymatic regeneration of the redox cofactors NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in a one-pot reaction, wherein, as a result of at least two further enzymatically catalyzed redox reactions proceeding in the same reaction batch (product-forming reactions), one of the two redox cofactors accumulates in its reduced form and, respectively, the other one in its oxidized form, characterized in that a) in the regeneration reaction which reconverts the reduced cofactor into its original oxidized form, oxygen or a compound of general formula $\text{R}_1\text{C}(\text{O})\text{COOH}$ is reduced, and b) in the regeneration reaction which reconverts the oxidized cofactor into its original reduced form, a compound of general formula $\text{R}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_3$ is oxidized and wherein R_1 , R_2 and R_3 in the compounds have different meanings.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】（中文/英文）

使氧化還原輔因子經酶催化再生之方法

Process for the enzymatic regeneration of redox cofactors

【技術領域】

本發明關於用於將氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應（one-pot reaction）中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次（即產物形成反應）中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚。

【先前技術】

酶催化之氧化還原反應係用於工業操作中，例如用於製造手性醇、 α -胺基酸及 α -羥基酸。大部分工業氧化還原反應中所採用的酶係使用諸如 NADH 或 NADPH 之輔因子。在經酶催化之氧化還原反應之中，其中氧化還原輔因子係藉由原位輔因子再生系統恢復的反應特別重要。其原因為在此反應中僅使用催化量的昂貴輔因子（ $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ）是可行的。合適之脫氫酶及其他酶之可利用性導致發展出各種輔因子再生系統。

迄今所描述之再生系統可被歸類為：酶聯、受質聯、

活體內（在存活有機體中之天然輔因子再生系統）、光化學、化學或電-酶催化性。此處所描述之方法係關於酶聯再生系統。酶聯系統之優點為高選擇性、製造各種產物之適用性及輔因子之高復用率（總周轉數，TTN）。

在 90 年代中期，第一次採用規模為噸之使用酶聯輔因子再生系統的工業方法。在該方法中係使用來自博伊丁氏假絲酵母（*Candida boidinii*）之甲酸脫氫酶。而已知之工業方法通常使用一種氧化還原酶來合成產物，並使用另一種酶來再生輔因子。

其中涉及形成產物及二種用於再生輔因子之酶系統（同時或依次）的二或多個經酶催化之氧化還原反應係在一個反應批次中進行，而不需分離出中間產物的方法必須與之區分。最近，這類經酶催化之級聯反應-此處稱為一鍋反應（one-pot reaction）-已引起重大關注，因為其可有效地降低營運成本、操作時間及環境影響。此外，經酶催化之氧化還原級聯反應可促進不容易藉由常規化學方法實現的轉化。

然而，在一鍋反應中同時執行幾個反應（氧化和還原反應），並進行輔因子再生是種挑戰，因為個別轉化通常需要高度分歧之反應條件。到目前為止，已執行之包含氧化和還原反應與相關聯之輔因子再生系統的單一容器試驗僅非常少數。

文獻 *Advanced Synth. Catal.*, 2008, Volume 351, Issue 9, p. 1303-1311 中已描述使用 7 α -羥基類固醇脫氫酶

(HSDH)、 7β -HSDH 和 12α -HSDH 的一鍋反應實驗。該方法中係在膽酸的位置 7 和 12 處進行氧化反應（區域選擇性和立體選擇性二者），然後在位置 7 處進行區域選擇性和立體選擇性還原。該方法中係使用乳酸脫氫酶（ NAD^+ -依賴型）及葡萄糖脫氫酶（ NADP^+ -依賴型）來作為輔因子再生系統。使用丙酮酸和葡萄糖作為輔受質。雖然此方法最初係針對真正的一鍋反應，但結束時氧化和還原反應係分開進行。這樣做時，氧化和還原步驟之分割係在所謂的“茶袋”反應器或在膜反應器中發生。為了避免因 NADPH -葡萄糖脫氫酶之低輔因子選擇性而產生副產物，該分割是必要的。然而，在一鍋反應中，葡萄糖脫氫酶- NADP^+ 亦部分轉化成 NAD^+ ，這阻礙了氧化反應。在該描述之方法中，僅使用 12.5 mM ($\sim 0.5\%$) 之受質膽酸，這使得從生態的角度來看，該方法不令人感興趣。

再者，文獻 J. Am. Chem. Soc., 2008, Volume 130, p.13969-13972 中已描述使用單一容器系統，經由作為中間產物之前手性酮來將二級醇之外消旋物去外消旋化的嘗試。將二級醇去外消旋化可經由兩種具有不同輔因子特異性的醇脫氫酶（S-和 R-特異性）達成。在該系統中， NADP 係藉由 NADPH 氧化酶製造過氧化氫再生，而 NADH 係藉由甲酸脫氫酶再生。甲酸和氧係作為輔受質（cosubstrates）。在該系統中係使用 4 種酶，但不區分氧化和還原步驟。該方法之缺點為使用非常低之 0.2-0.5% 的受質濃度，這並不適合工業用途。

另一種單一容器系統已描述於 WO 2009/121785 A2 中。該方法中係將光學活性二級醇之立體異構物氧化成酮，然後再還原成對應之光對映體，其中係使用具有相反的立體選擇性和兩種不同的輔因子特異性之醇脫氫酶。該輔因子係藉由所謂的“氫負離子轉移系統”，僅使用一種額外的酶再生。爲了再生輔因子，使用各種酶，諸如甲酸脫氫酶、葡萄糖脫氫酶、乳酸脫氫酶。該方法之缺點爲使用低濃度之受質。

而已知之涉及輔因子再生系統的經酶催化之單一容器方法的缺點爲受質之濃度非常低，這對工業方法而言不夠有效。

相反地，現已知許多其中使用輔因子再生系統之個別的經酶催化之氧化還原反應。該實驗之描述中係使用整個微生物、細胞裂解物或分離的酶並同時進行 NAD(P)H 或 NAD(P)^+ 再生。已知之用於個別氧化還原反應的經酶催化之輔因子再生系統包含，例如用於 NADH 之甲酸脫氫酶（使用甲酸作爲輔受質）、用於 NADH 之來自假單胞菌屬的醇脫氫酶（使用 2-丙醇作爲輔受質）、用於 NADH 和 NADPH 之氫化酶（使用 H_2 作爲輔受質）、用於 NADPH 之來自腸膜明串珠菌（*L. mesenteroides*）的葡萄糖-6-磷酸脫氫酶（使用葡萄糖-6-磷酸作爲輔受質）、用於 NADH 和 NADPH 之葡萄糖脫氫酶（使用葡萄糖作爲輔助受質）、用於 NADH 之 NADH 氧化酶（使用 O_2 作爲輔受質）及用於 NADH 之亞磷酸脫氫酶（使用亞磷酸作爲輔

受質)。

這類個別氧化還原反應之用途的一種實例為從適當之前手性酮基化合物製造手性羥基化合物。該方法中，輔因子係藉由額外的酶再生。這些方法的共通之處在於其構成分離的還原反應及再生 NAD (P) H (參見，例如 EP 1 152 054)。

EP 1 731 618 ; WO 2007/118644 ; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011 Volume 90 p.127-135 中已有關於使用羥基類固醇脫氫酶加輔因子再生系統之酶催化方法的描述，此方法係在較高之受質濃度 (約>1%) 下進行。該方法中，輔因子 NAD (P) H 或 NAD (P) 係藉由不同的酶再生，諸如，例如乳酸脫氫酶 (使用丙酮酸作為輔受質)、來自布氏熱厭氧菌 (*T. brockii*) 之醇脫氫酶 (使用異丙醇作為輔受質)、來自短乳桿菌 (*L. brevis*)、小乳桿菌 (*L. minor*)、肉色明串珠菌 (*Leuconostoc carnosum*)、嗜熱厭氧菌乙醇菌 (*T. ethanolicus*)、拜氏梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium beijerinckii*) 之醇脫氫酶。然而，這些已知之方法僅與用於氧化羥基化合物或還原側氧基化合物之分離的單一反應有關。

Can. J. Chem. Eng. 1992, Volume 70, p. 306-312 中已有關於使用蘋果酸脫氫酶 (“蘋果酸酶”) 之用於 NADH 的輔因子再生系統的描述。在該刊物中，此系統係用於藉由丙胺酸脫氫酶將丙酮酸進行還原性胺化。在輔因子再生期間出現之丙酮酸隨後被用於產物形成反應中。

在 WO 2004/022764 中同樣描述藉由蘋果酸脫氫酶再生 NADH。與先前描述之刊物不同，在蘋果酸之氧化脫羧期間出現的丙酮酸並未被進一步使用。

FEBS J., 2005, Volume 272, p. 3816- 3827 中已描述其中涉及輔因子再生系統之經酶催化的 D-木糖還原成木糖醇的實例。來自假單胞菌之 NADPH 依賴性亞磷酸脫氫酶的突變體被用來作為輔因子再生反應之酶。此亦為用於形成產物之單一反應。

Organic Letters, 2003, Volume 5, p. 3649-3650; US 7,163,815; Biochem. Eng. J., 2008, Volume 39 (2) p. 319-327; EP 1 285 962 中已描述經酶催化之製造富含手性對映體的有機化合物（例如醇或胺基酸）之進一步實例。在該系統中係使用來自短乳桿菌或舊金山乳桿菌（*Lactobacillus sanfranciscensis*）之 NAD（P）H 依賴性氧化酶作為輔因子再生反應之酶。同樣地，該試驗構成用於形成產物之單一反應。

WO 2011/000693 中描述 17 β -羥基類固醇脫氫酶和能夠在 4-雄甾烯-3,17 二酮之位置 17 處執行氧化還原反應的方法。同樣地，此為單獨之還原反應。上文中提及之個別進行的氧化或還原反應缺乏一鍋反應之優點，諸如，例如由節省時間和材料造成之成本效益，以及因為酶催化之級聯反應所造成的較佳更換率。

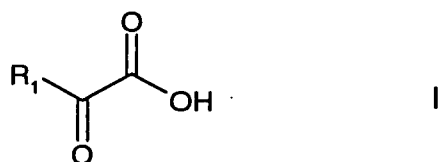
【發明內容】

方法之目的和描述

本發明之目的係提供用於再生氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 和/或，例如 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 的方法，以藉此以經濟方式在一個反應批次中進行二或更多個經酶催化的氧化還原反應。

根據本發明，該目的係以開始時提及之那類方法實現，其中係提供在一鍋反應中經酶催化再生氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 和/或，例如 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次（產物形成反應）中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：

a) 在經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，氧或通式 I 之化合物被還原，



其中 R_1 代表直鏈或支鏈（ $\text{C}_1\text{-C}_4$ ）烷基或（ $\text{C}_1\text{-C}_4$ ）羧基烷基，及

b) 在經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，（ $\text{C}_4\text{-C}_8$ ）環烷醇或通式 II 之化合物被氧化，

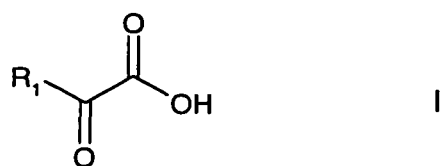


其中 R_2 和 R_3 獨立選自下列群組： H 、 (C_1-C_6) 烷基（其中烷基為直鏈或支鏈）、 (C_1-C_6) 烯基（其中烯基為直鏈或支鏈且包含一至三個雙鍵）、芳基（尤其是 C_6-C_{12} 芳基）、羧基及 (C_1-C_4) 羧基烷基，尤其是亦選自環烷基，例如 C_3-C_8 環烷基。

根據本發明所提供之方法在本文中亦稱為根據本發明的方法鈹（本發明的方法）。

於另一觀點中，本發明提供根據本發明之用於經酶催化氧化還原輔因子 $NAD^+/NADH$ 和 / 或，例如 $NADP^+/NADPH$ 再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次（=產物形成反應）中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：

a) 在該經氧化之輔因子再生期間，通式 I 之化合物被還原，



其中 R_1 代表經取代或未經取代之 C_1-C_4 烷基，及

b) 在該經還原之輔因子再生期間，通式 II 之化合物被氧化，



其中 R_2 和 R_3 彼此獨立地選自下列群組：

- 1) -H,
- 2) -(C₁-C₆) 烷基，其中烷基為直鏈或支鏈，
- 3) -(C₁-C₆) 烯基，其中烯基為直鏈或支鏈且選擇性地包含達三個雙鍵，
- 4) -環烷基，尤其是 C₃-C₈ 環烷基，
- 5) -芳基，尤其是 C₆-C₁₂ 芳基，
- 6) -(C₁-C₄) 羧基烷基，若該通式 I 之化合物為丙酮酸，亦選擇性地為羧基。

於進一步之觀點中，於根據本發明之方法中，R₂ 和 R₃ 彼此獨立地選自下列群組：H、(C₁-C₆) 烷基（其中烷基為直鏈或支鏈）、(C₁-C₆) 烯基（其中烯基為直鏈或支鏈且包含一至三個雙鍵）、芳基（尤其是 C₆-C₁₂ 芳基）、羧基及 (C₁-C₄) 羧基烷基。

相較於先前技藝，根據本發明之方法能顯著改良其中同時經酶催化地氧化和還原該化合物之方法，因為該方法能在一個反應批次中運行所需之氧化和還原反應，以及用於輔因子再生之相關聯的反應，並同時使用明顯高於先前技藝所使用之受質濃度。

於根據本發明的方法中係使用輔因子 NADH 和/或 NADPH。其中，NAD⁺代表煙醯胺腺嘌呤二核苷酸之氧化形式，且 NADH 代表還原形式，而 NADP⁺代表磷酸煙醯胺腺嘌呤二核苷酸之氧化形式，而 NADPH 代表還原形式。

非為輔因子再生反應之一部分，且在根據本發明之方

法中參與形成產物之經酶催化的氧化還原反應在此稱為“氧化反應”及“還原反應”。“氧化反應”及“還原反應”摘要於術語“產物形成反應”中。於各情況中，在根據本發明之方法中的用於形成產物之反應包含至少一種氧化反應及至少一種還原反應。

若使用 NAD^+ 作為氧化反應之輔因子，則 NADPH 為還原反應之輔因子。若使用 NADP^+ 作為氧化反應之輔因子，則 NADH 為還原反應之輔因子。

在根據本發明之方法中，氧化反應和還原反應可以按時間先後並行進行或按時間先後連續進行，較佳為在相同之反應批次中按時間先後並行進行。

用於形成產物之化合物在本文中稱為受質。在輔因子再生過程中反應之化合物在本文中稱為輔受質。

在根據本發明之方法中可使用一種受質及數種受質。這樣做時，還原和/或氧化反應可在同一受質（分子骨架）上發生，亦可在不同的受質上發生，較佳為在同一受質上發生。此外，於根據本發明之方法中，還原和/或氧化反應可在相同或不同的官能團上發生。

根據本發明之方法適合用於多個反應，例如經由氧化成對應之酮和隨後還原成相反之立體特異性羥基化合物來將立體異構型羥基化合物的結構反轉。

此文中，“一鍋反應”一詞係指其中有二或多種參與形成產物之經酶催化的氧化還原反應及二種用於再生輔因子之酶系統在一個反應批次中進行，但未分離出中間產物

之方法。

此處提及之酸或酸之鹽包含各自之未提及的術語。同樣地，此處提及之酸（尤其是膽汁酸）包括所有由其衍生之酯。此外，（部分）具有保護基之化合物係包含在提及之相關物質中。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於該氧化反應和還原反應係按時間先後並行進行。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於該氧化反應和還原反應二者係在相同的分子骨架上發生。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用丙酮酸（輔受質）作為式 I 化合物（2-含氧酸）以藉由乳酸脫氫酶經還原成乳酸，這意味著在該經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，丙酮酸係藉由乳酸脫氫酶經還原成乳酸。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用 2-丙醇（異丙醇，IPA）（輔受質）作為式 II 化合物（二級醇），其係藉由醇脫氫酶氧化成丙酮，這意味著在該經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，2-丙醇藉由醇脫氫酶經氧化成丙酮。

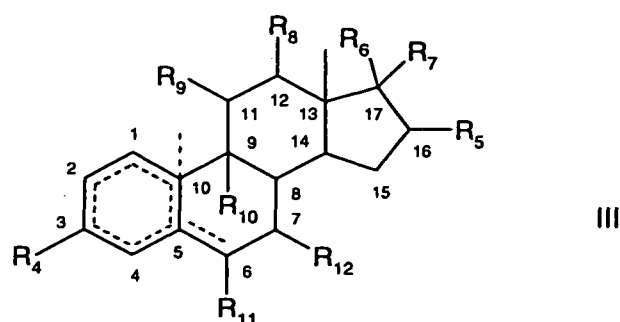
於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用氧，該氧係藉由 NADH 氧化酶而被還原。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用蘋果酸（輔受質）作為二級醇，其藉由草醯醋酸

脫羧化蘋果酸脫氫酶（“蘋果酸酶”）經氧化成丙酮酸和 CO_2 ，例如在該經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，蘋果酸係藉由蘋果酸脫氫酶而經氧化成丙酮酸及 CO_2 。

於此實施例中，該新生之丙酮酸係在不用來形成產物，但構成第二輔因子再生反應之進一步的氧化還原反應中反應。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於其係用於在相同的反應批次中對通式 III 之化合物分別進行至少一種氧化反應及至少一種還原反應，



其中

R_4 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_5 代表氫、羥基、側氧基或甲基，

R_6 代表氫或羥基，

R_7 代表氫、 $-\text{COR}_{13}$ ，其中 R_{13} 為未經取代或經羥基取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、或經取代（尤其是經羥基取代）或未經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 羧基烷基，

或者 R_6 和 R_7 一起表示側氧基，

R_8 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_9 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_{10} 代表氫、甲基或鹵素，

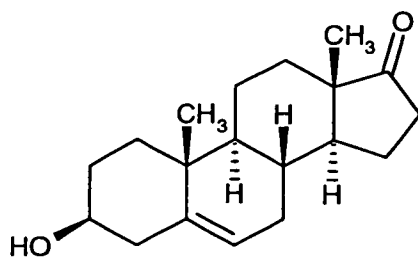
R_{11} 代表氫、甲基、羥基、側氧基或鹵素，且

R_{12} 代表氫、羥基、側氧基或甲基，其中下列結構單元



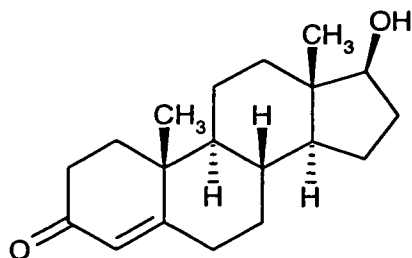
代表苯環或包含 6 個碳原子及 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的環；其中在該參與形成產物之還原反應的反應批次中，該受質之濃度較佳為 <5%（重量/體積）。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於發生式 VII 之脫氫表雄固酮（dehydroepiandrosterone）（DHEA）轉化



VII

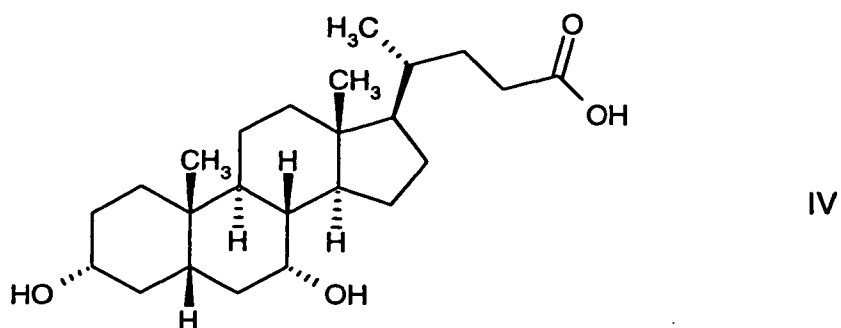
成式 VIII 之睪酮（testosterone）的經酶催化之轉化反應。



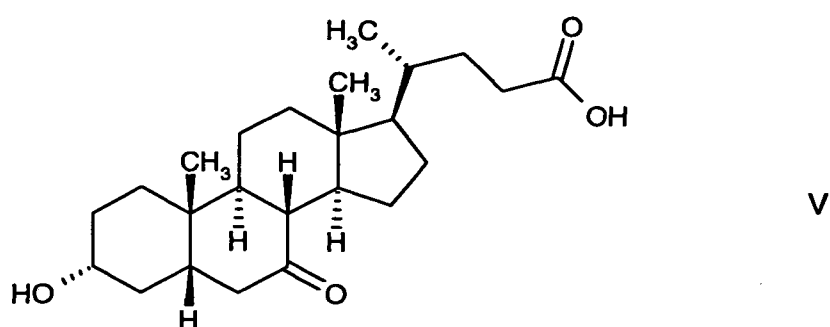
VIII

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用兩種相反立體特異性之羥化類固醇脫氫酶使式 IV 之 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基- 5β -膽烷酸（鵝去氧膽酸，CDC）經酶催

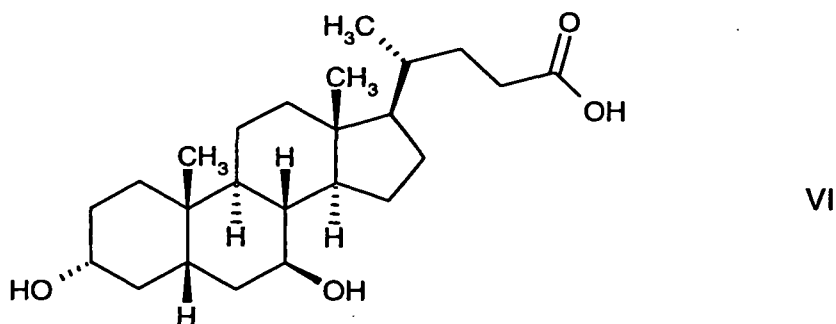
化差向異構化



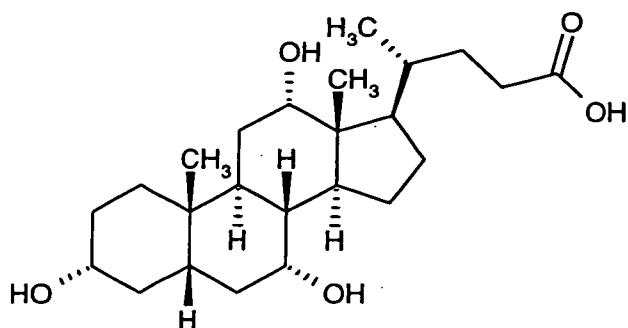
藉由氧化反應轉化成式 V 之酮基石膽酸 (KLC)



且隨後藉由還原反應轉化成式 VI 之 $3\alpha, 7\beta$ -二羟基- 5β -膽烷酸 (熊去氧膽酸, UDC)



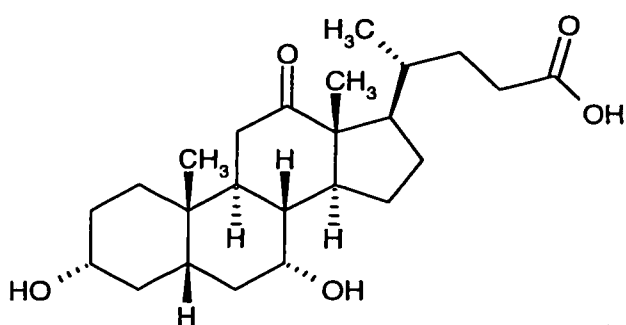
於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於其，例如使用 3 種立體特異性之羥化類固醇脫氫酶 (其中 2 種具有相反의立體特異性) 使式 IX 之 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -三羟基- 5β -膽烷酸 (膽烷酸) 經酶催化差向異構化，



IX

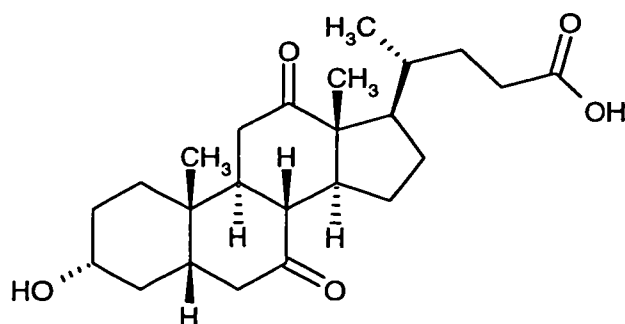
由：

A) 氧化反應以獲得式 X 之 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-側氧基-CDC)



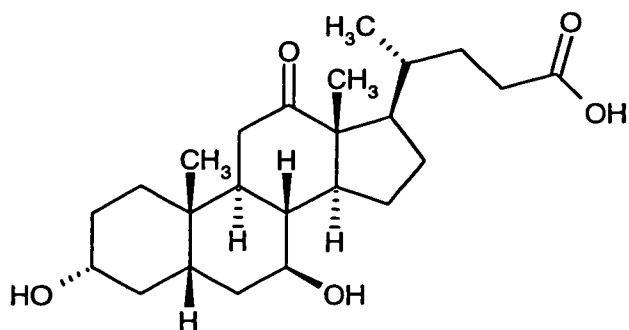
X

其進一步經反應以獲得式 XI 之 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸 (12 側氧基-KLC)



XI

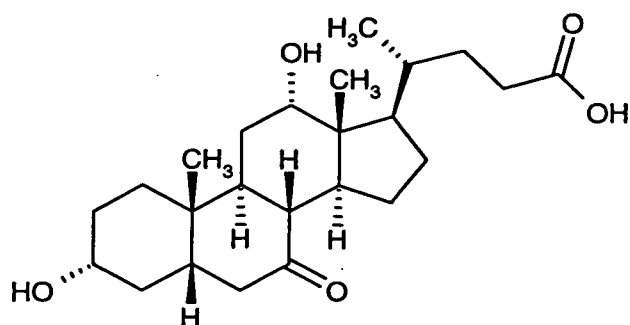
隨後經還原成式 XII 之立體異構性羥基化合物 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-酮基-熊去氧膽烷酸)



XII

或

B) 氧化反應以獲得式 XIII 之 $3\alpha, 12\alpha$ -二羥基-7-側氧基- 5β -膽烷酸，

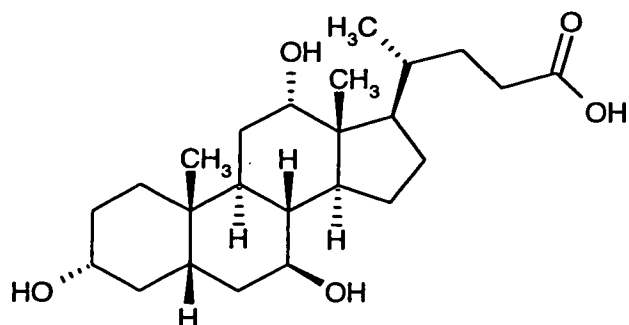


XIII

隨後經酶催化之氧化反應以獲得式 XI 之 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸 (12 側氧基-KLC)，且再隨後經還原反應以獲得式 XII 之立體異構性羥基化合物 $3\alpha, 7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-酮基-熊去氧膽烷酸)，

或

C) 氧化反應以獲得式 XIII 之 $3\alpha, 12\alpha$ -二羥基-7-側氧基- 5β -膽烷酸，隨後經酶催化之還原反應以獲得式 XIV 之 $3\alpha, 7\beta, 12\alpha$ -三羥基- 5β -膽烷酸，



XIV

且再隨後經氧化反應以獲得式 XII 之立體異構性羥基化合物 3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸（12-酮基-熊去氧膽烷酸）。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於使用 C₅ 或 C₆ 糖作為受質，例如該方法為使 C₅ 或 C₆ 糖類異構化之方法。

於本發明之較佳實施例中，根據本發明之方法的特徵在於葡萄糖之異構化係經由將葡萄糖還原成山梨醇，隨後氧化成果糖來進行，例如該方法係經由將葡萄糖還原成山梨醇，接著氧化成果糖來進行。

較佳地，根據本發明之方法係在水性體系中進行，其中該用於氧化和還原反應中之部分受質以在懸浮液中之未溶解狀態和/或以第二液相之形式提供是可行的。

於一特定實施例中，根據本發明之方法的特徵在於該參與形成產物之氧化反應中所使用之受質在反應批次中的濃度為至少 5%（重量/體積），更佳為 7%（重量/體積）和高於 7%，特佳為 9%（重量/體積）和高於 9%，例如 5%（重量/體積）至 20%（重量/體積），諸如 5%（重量/體積）至 15%（重量/體積），例如 5%（重量/體積）至 12%（重量/體積），諸如 5%（重量/體積）至 10%（重

量/體積)。

於特定之實施例中，根據本發明之方法的特徵在於該產物形成反應所達到之整體更替率為 $\geq 70\%$ ，尤其是 $\geq 90\%$ ，例如 $\geq 70\%$ 至 100% ，諸如 $\geq 70\%$ 至 90% 、 91% 、 92% 、 93% 、 94% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 或 100% 。

於根據本發明之方法中可在水性系統中添加緩衝劑。合適之緩衝劑為，例如 pH 值介於 5 至 10 之間的磷酸鉀、Tris-HCl 和甘胺酸，較佳為 6 至 9。此外，或者可將用於穩定酶的離子（諸如 Mg^{2+} ）或其它添加劑（諸如甘油）添加到系統中。於根據本發明之方法中，所添加之輔因子 NAD(P)⁺和 NAD(P)H 的濃度通常介於 0.001mM 和 10mM 之間，較佳為介於 0.01mM 和 1mM 之間。

根據所使用之酶，根據本發明之方法可在 10°C 至 70°C 的溫度範圍內進行，較佳為 20°C 至 45°C 。

據理解，羥基類固醇脫氫酶（HSDH）為催化類固醇骨架上之羥基氧化成對應之酮基，或相反地，酮基還原成對應之羥基的酶。

可用於羥基類固醇上之氧化還原反應的適當之羥基類固醇脫氫酶有，例如 3α -HSDH、 3β -HSDH、 7α -HSDH、 7β -HSDH 或 17β -HSDH。

具 7α -HSDH 活性之合適的酶可從，例如梭狀芽孢桿菌（不同梭狀芽孢桿菌（*Clostridium absonum*）、污泥梭狀芽孢桿菌（*Clostridium sordelii*））、大腸桿菌或脆弱

桿菌 (*Bacteroides fragilis*) 獲得。

具 7β -HSDH 活性之合適的酶可從例如瘤胃球菌屬 (*Ruminococcus sp.*) 或不同梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium absonum*) 獲得。

合適之乳酸脫氫酶可從例如穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 獲得。

合適之醇脫氫酶可從例如高加索酸牛奶乳桿菌 (*Lactobacillus kefir*) 獲得。

合適之木糖還原酶可從例如熱帶假絲酵母 (*Candida tropicalis*) 獲得。

合適之山梨糖醇脫氫酶可從例如綿羊肝、枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) 或蘋果 (*Malus domestica*) 獲得。

合適之 NADH 氧化酶可從例如腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、變形鏈球菌 (*Streptococcus mutans*)、胺基戊酸梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium aminovalericum*) 獲得。

於根據本發明之方法中，較佳地，該酶係以過度表達於大腸桿菌中之重組蛋白質形式使用，其中該對應之細胞裂解物宜不經任何進一步純化繼續使用。於前述情況中，酶單位 1 U 對應於每分鐘反應 1 微莫耳受質所需的酶量。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示出藉由使用2-丙醇和丙酮酸之輔因子再生系統，鵝去氧膽酸經由中間產物 3α -羥基-7側氧基- 5β -膽烷

酸被轉化成熊去氧膽酸之差向異構化反應圖解。

第2圖顯示出藉由使用蘋果酸和丙酮酸之輔因子再生系統，鵝去氧膽酸經由中間產物 3α -羥基-7側氧基- 5β -膽烷酸被轉化成熊去氧膽酸之差向異構化反應圖解。

第3圖顯示出藉由使用2-丙醇和氧之輔因子再生系統，鵝去氧膽酸經由中間產物 3α -羥基-7側氧基- 5β -膽烷酸被轉化成熊去氧膽酸之差向異構化反應圖解。

第4圖顯示出藉由使用2-丙醇和丙酮酸之輔因子再生系統，葡萄糖被轉化為果糖之差向異構化反應圖解。

第5圖顯示出藉由使用2-丙醇和氧之輔因子再生系統，葡萄糖被轉化為果糖之差向異構化反應圖解。

第6圖顯示出藉由使用2-丙醇和丙酮酸之輔因子再生系統，膽烷酸經由中間產物 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸和 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸被轉化為 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸之差向異構化反應圖解。

第7圖顯示出藉由使用2-丙醇和氧之輔因子再生系統，膽烷酸經由中間產物 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸和 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸被轉化為 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸之差向異構化反應圖解。

第8圖和第9圖顯示出藉由使用2-丙醇、丙酮酸和氧之輔因子再生系統，膽烷酸經由中間產物 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸和 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸被轉化為 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸之差向異構

化反應圖解。

第 10 圖顯示出經由不同的中間產物和輔因子再生系統，膽烷酸被轉化為 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸之可能的差向異構化反應圖解。在 NAD^+ 之再生系統中可替換使用乳酸脫氫酶（以丙酮酸作為受質）和 NADH 氧化酶（以氧作為受質）。在 NADPH 之再生系統中係使用醇脫氫酶（以異丙醇作為受質）。

第 11 圖顯示出藉由使用 2-丙醇和 2-戊醇（在每一種情況中均使用醇脫氫酶）以及丙酮酸（乳酸脫氫酶）和氧（ NADH 氧化酶）之輔因子再生系統，鵝去氧膽酸經由中間產物 3α -羥基-7側氧基- 5β -膽烷酸（7-酮基石膽酸 = 7K-LCA = KLC）被轉化成熊去氧膽酸之差向異構化反應圖解。

圖形中係使用下列縮寫：

BsSDH		來自枯草芽孢桿菌之山梨醇脫氫酶
CA	=	$3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -三羥基- 5β -膽烷酸
7β -CA	=	$3\alpha,7\beta,12\alpha$ -三羥基- 5β -膽烷酸
Caoxo		胺基戊酸梭狀芽孢桿菌 NADH 氧化酶
CDC, CDCA		$3\alpha,7\alpha$ -二羥基- 5β -膽烷酸
CtXR		熱帶假絲酵母木糖還原酶
7α -HSDH		7α -羥基類固醇脫氫酶
7β -HSDH		7β -羥基類固醇脫氫酶
12α -HSDH	=	12α -羥基類固醇脫氫酶

KLC		3 α -羥基-7-側氧基-5 β -膽烷酸
7K-LCA	=	3 α -羥基-7-側氧基-5 β -膽烷酸
LacDH		乳酸脫氫酶 NAD (H) -依賴性
LkADH		高加索酸牛奶桿菌醇脫氫酶 NADP(H)-依賴性
Lmoxid	=	腸膜明串珠菌 NADH-氧化酶
MalDH		大腸桿菌蘋果酸脫氫酶 NADP(H)- 依賴性
7oxo-CA	=	3 α ,12 α -二羥基-7-側氧基-5 β -膽烷酸
12oxo-CDC	=	3 α ,7 α -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸
12oxo-KLC	=	3 α -羥基-7,12-二側氧基-5 β -膽烷酸
12oxo-UDC	=	3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸
SISDH		綿羊肝山梨醇脫氫酶
SmOxo		變形鏈球菌 NADH 氧化酶
UDC.UDCA		3 α ,7 β -二羥基-5 β -膽烷酸

在下列實例中，所有的溫度數據係以攝氏溫度（℃）表示。使用下列縮寫：

EtOAc	醋酸乙酯
h	小時
IPA	異丙醇（2-丙醇）
MeOH	甲醇
Rt	室溫

【實施方式】

實例 1

藉由使用乳酸脫氫酶和醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統，使鵝去氧膽酸經由 7α -羥基類固醇脫氫酶及 7β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化成熊去氧膽酸

0.5 毫升之反應物中含有 50 毫克鵝去氧膽酸、12 U 之來自大腸桿菌的重組 7α -羥基類固醇脫氫酶、6 U 之來自扭鏈瘤胃球菌 (*Ruminococcus torques*) 的重組 7β -羥基類固醇脫氫酶以及 0.5 mM NAD^+ 和 0.3 mM NADPH。使用 6 U 之重組乳酸脫氫酶和 350 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD^+ 。使用 6 U 之來自高加索酸牛奶桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2.4% 之 IPA (重量/體積) 以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液 (100mM, pH 值 = 7.8) 中進行反應，並一邊持續搖動 (850rpm)。持續使用開放系統以促進丙酮蒸發並使反應轉移朝向熊去氧膽酸。6 小時後追加 1.6% (重量/體積) 之 IPA 劑量，16 小時後追加 2.4% (重量/體積) 之 IPA，24 小時後追加 3.9% (重量/體積) 之 IPA 且 40 小時後追加 0.8% (重量/體積) 之 IPA。此外，24 小時後添加 20 微升之 4-甲基-2-戊醇。46 小時後加入 200 微升之 2-戊醇及 1.6% (重量/體積) 之 IPA。48 小時後，在反應混合物中之所有膽汁酸中的熊去氧膽酸的比例為約 97%。

實例 2

藉由使用乳酸脫氫酶和蘋果酸脫氫酶依賴性輔因子再生系統，使鵝去氧膽酸經由 7α -羥基類固醇脫氫酶及 7β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化成熊去氧膽酸

0.5 毫升之反應物中含有 50 毫克鵝去氧膽酸、20 U 之來自大腸桿菌的重組 7α -羥基類固醇脫氫酶、20 U 之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7β -羥基類固醇脫氫酶以及 1 mM NAD^+ 和 1 mM NADPH。使用 10U 之重組乳酸脫氫酶以用於再生 NAD^+ ，並使用 16.5mM 丙酮酸鈉以用於起始反應。使用 20 U 之來自大腸桿菌的重組蘋果酸脫氫酶和 320 mM 之蘋果酸鈉以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液（100mM，pH 值 = 7.8）中進行反應，並一邊持續搖動（850rpm）。持續使用開放系統被，以令新產生之 CO_2 逸散。16 小時和 40 小時後追加 20 U 之 7α -HSDH 和 10 U 之蘋果酸脫氫酶。20 小時、24 小時、44 小時和 48 小時後追加 10 U 之 7β -HSDH。此外，40 小時後追加 10 U 之蘋果酸脫氫酶。72 小時後，在反應混合物中之所有膽汁酸中的熊去氧膽酸的比例為約 90%。

實例 3

藉由使用 NADH 氧化酶和醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統，使鵝去氧膽酸經由 7α -羥基類固醇脫氫酶及 7β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化成熊去氧膽酸

0.5 毫升之反應物中含有 50 毫克鵝去氧膽酸、12 U 之來自大腸桿菌的重組 7α -羥基類固醇脫氫酶、7.5 U 之

來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7 β -羥基類固醇脫氫酶以及 1 mM NAD⁺和 1 mM NADPH。使用 20 U 之來自胺基戊酸梭狀芽孢桿菌的重組 NADH 氧化酶以用於再生 NAD⁺。使用 5 U 之來自高加索酸牛奶桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2 % 之 IPA (重量/體積) 以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液 (100mM, pH 值=6) 中進行反應，並一邊持續搖動 (850rpm)。持續使用開放系統以促進丙酮蒸發並使反應轉移朝向熊去氧膽酸。18 小時、22 小時、26 小時和 41 小時後追加 2% 之 IPA 劑量，並在 41 小時和 48 小時後追加 5% 之 IPA。24 小時後追加 20 U 之 NADH 氧化酶，且 41 小時後追加 7.5 U 之 7 β -羥基類固醇脫氫酶以及 5 U 之醇脫氫酶。48 小時後，在反應混合物中之所有膽汁酸中的熊去氧膽酸的比例為約 95-98%。

實例 4

膽汁酸之再處理和分析

完成如實例 1 至 3 中所描述之反應後，以 EtOAc 萃取反應混合物。隨後，藉由蒸發除去溶劑。將蒸發殘質溶解於甲醇：乙腈：磷酸鈉緩衝液的混合物 (pH=3, 0.78 克/升 (40:30:37)) 中並藉由 HPLC 監測鵝去氧膽酸被轉化成熊去氧膽酸。於前述情況中，使用逆相分離柱 (ZORBAX[®]Eclipse[®] XDB C18, 流量 0.8 毫升/分鐘) 及光折射檢測器 (RID)，安捷倫 (Agilent) 1260 Infinity[®] (此二者均來自安捷倫科技公司)。

實例 5

藉由使用回收 NADPH 用之醇脫氫酶和回收 NAD^+ 用之乳酸脫氫酶將葡萄糖經由木糖還原酶及山梨糖醇脫氫酶轉化成果糖

0.5 毫升反應物中含有 50 毫克/毫升之葡萄糖和 6 U/毫升之來自熱帶假絲酵母的重組木糖還原酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）及 0.1 mM NADP^+ 。添加 7% IPA 和來自高加索酸牛奶乳桿菌之重組醇脫氫酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）以再生輔因子。該酶係以細胞裂解物之形式使用。使反應在 40°C 和 $\text{pH} = 9$ （50mM Tris 鹽酸緩衝液）之開放系統中進行 24 小時，並一邊搖動（900rpm）。開放系統造成丙酮被移除，這驅動反應朝向形成山梨糖醇。在開放系統中，水和 IPA 亦被蒸發，因此在 6 小時和 21 小時後追加他們的劑量。於前述情況中，每次均需將總體積調整為 0.5 毫升並將 IPA 之濃度調整為 7%（體積/體積）。24 小時後，將反應容器在真空中溫育在 60°C 中，以使酶失活並蒸除有機溶劑。冷卻至室溫後，加入最終濃度為 5 U/毫升之來自枯草芽孢桿菌（*Bacillus subtilis*）的重組山梨醇脫氫酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）、最終濃度為 1mM 之氯化鋅和最終濃度為 0.1mM 之 NAD^+ 。使用 5U/毫升（最終濃度）之來自兔子肌肉乳酸脫氫酶（Sigma Aldrich 公司）和 300mM 丙酮酸以再生輔因子。以水將反應物補足為 0.5 毫

升。將反應在封閉系統中，於 40℃ 下進一步進行 24 小時，並一邊搖動（900rpm）。D-葡萄糖轉化成 D-果糖的轉化率可達到 > 90%。

實例 6

藉由使用回收 NADPH 用之醇脫氫酶和回收 NAD⁺用之 NADH 氧化酶將葡萄糖經由木糖還原酶及山梨糖醇脫氫酶轉化成果糖

0.5 毫升反應物中含有 50 毫克/毫升之葡萄糖、6 U/毫升之來自熱帶假絲酵母的重組木糖還原酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）及 0.1 mM NADP⁺。添加 7%（體積/體積）IPA 和來自高加索酸牛奶乳桿菌之重組醇脫氫酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）以再生輔因子。該酶係以細胞裂解物之形式使用。將反應於 40℃ 和 pH = 8（50mM Tris 鹽酸緩衝液）之開放系統中進行 24 小時並一邊搖動（900rpm）。開放系統造成丙酮被移除，這驅動反應朝向形成山梨糖醇。於開放系統中，水和 IPA 亦被蒸發，因此在 6 小時和 21 小時後追加他們的劑量。於前述情況中，每次均需將總體積調整為 0.5 毫升並將 IPA 之濃度調整為 7%（體積/體積）。24 小時後，將反應容器在真空下溫育在 60℃ 中以使酶失活並蒸發 IPA 以及任何已形成之丙酮。冷卻至室溫後，加入最終濃度為 5 U/毫升之來自枯草芽孢桿菌的重組 D-山梨醇脫氫酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）及最終濃度為 1mM 之氯

化鈣和最終濃度為 0.1mM 之 NAD^+ 和 NADH 的混合物。使用 10U/毫升（最終濃度）之來自腸膜明串珠菌之 NADH 氧化酶（過度表達於大腸桿菌 BL21（DE3）中）以再生輔因子。該酶係以細胞裂解物之形式使用。以水將反應物補足為 0.5 毫升。該反應係在開放系統中，於 40°C 下進一步進行 24 小時並一邊持續搖動（900rpm），以確保從空氣中供給足夠的氧氣給 NADH 氧化酶。因此，在 6 小時後和 21 小時後以水將體積填充至 0.5 毫升。D-葡萄糖轉化成 D-果糖的轉化率可達到約 98%。

實例 7

糖之再處理和分析

將反應物在 65°C 下溫育 10 分鐘以使酶失活，隨後進行離心。然後，將上清液在 $0.2\mu\text{M}$ PVDF 過濾器上過濾並藉由配體交換 HPLC（安捷倫科技公司）進行分析。這樣做時，經由 Showa Denko K.K.之鉛塔（Shodex[®]Sugar SP0810）以 80°C ，流速為 0.5 毫升/分鐘的水（VWR International GmbH 公司，HPLC 級）分離糖和多元醇。藉由光折射檢測器（RID，安捷倫 1260 Infinity[®]，安捷倫科技公司）之協助進行檢測。使用安捷倫科技公司之線內過濾器及作為前置柱之陰離子交換柱（Shodex[®]Axpak-WAG）、逆相柱（Shodex[®]Asahipak[®]ODP-50 6E）和 Showa Denko K.K.之糖前置柱（SUGAR SP-G）。

實例 8

藉由使用乳酸脫氫酶和醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統，將膽烷酸經由 12 α -羥基類固醇脫氫酶、7 α -羥基類固醇脫氫酶及 7 β -羥基類固醇脫氫酶生物轉化成 3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸

0.5 毫升之反應物中含有 25 毫克之膽烷酸、12.5 U 之來自遲緩埃格特菌 (*Eggertella lenta*) 或球形賴胺酸芽孢桿菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 之重組 12 α -羥基類固醇脫氫酶、16 U 之來自大腸桿菌的重組 7 α -羥基類固醇脫氫酶、6 U 之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7 β -羥基類固醇脫氫酶以及 1 mM NAD⁺和 1 mM NADPH。使用 12.5 U 之來自穴兔的重組乳酸脫氫酶 (肌肉異形體) 和 200 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD⁺。使用 5 U 之來自高加索酸奶乳桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2% 之 IPA (重量/體積) 以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液 (100mM, pH 值 = 7.8) 中進行反應並一邊持續搖動 (850rpm)。進一步使用開放系統以令丙酮蒸發並使反應轉移朝向 3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸。18 小時和 24 小時後追加 2% 之 IPA (重量/體積) 劑量。48 小時後，所使用之膽烷酸有 61% 被反應成 3 α ,7 α -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸。

實例 9

藉由使用乳酸脫氫酶、NADH 氧化酶和醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統，將膽烷酸經由 12 α -羥基類固醇脫氫酶、

7 α -羥基類固醇脫氫酶及 7 β -羥基類固醇脫氫酶生物轉化成 3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸

0.5 毫升之反應物中含有 25 毫克之膽烷酸、12.5 U 之來自遲緩埃格特菌或球形賴胺酸芽孢桿菌之重組 12 α -羥基類固醇脫氫酶、16 U 之來自大腸桿菌的重組 7 α -羥基類固醇脫氫酶、6 U 之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7 β -羥基類固醇脫氫酶以及 1 mM NAD⁺和 1 mM NADPH。使用 5 U 之來自腸膜明串珠菌的重組 NADH 氧化酶及 12.5 U 之來自穴兔的重組乳酸脫氫酶（肌肉異形體）和 200 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD⁺。使用 5 U 之來自高加索酸奶乳桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2% 之 IPA（重量/體積）以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液（100mM，pH 值 = 7.8）中進行反應並一邊持續搖動（850rpm）。進一步使用開放系統以將丙酮蒸發並使反應轉移朝向 3 α ,7 β -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸。18 小時和 24 小時後追加 2% 之 IPA（重量/體積）劑量。48 小時後所使用之膽烷酸有 70% 被反應成 3 α ,7 α -二羥基-12-側氧基-5 β -膽烷酸。

實例 10

藉由使用乳酸脫氫酶和醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統，將鵝去氧膽烷酸經由 7 α -羥基類固醇脫氫酶及 7 β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化化成熊去氧膽烷酸。添加氯化錳（MnCl₂）的優勢

0.5 毫升之反應物中含有 50 毫克鵝去氧膽烷酸、12 U

之來自大腸桿菌的重組 7α -羥基類固醇脫氫酶、6 U 之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7β -羥基類固醇脫氫酶以及 0.5 mM NAD^+ 和 0.3 mM NADPH 。使用 6 U 之重組乳酸脫氫酶和 350 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD^+ 。使用 6 U 之來自高加索酸牛奶桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2.4% 之 IPA（重量/體積）以用於再生 NADPH 。在 25°C ，帶有 5 mM MnCl_2 之水性磷酸鉀緩衝液（100mM，pH 值 = 7.8）中進行反應並一邊持續搖動（850rpm）。進一步使用開放系統以將丙酮蒸發並使反應轉移朝向熊去氧膽烷酸。6 小時後追加 1.6%（重量/體積）之 IPA 劑量，16 小時後追加 2.4%（重量/體積）之 IPA，且 24 小時後追加 3.9%（重量/體積）之 IPA。36 小時後加入 200 微升之 2-戊醇及 3%（重量/體積）之 IPA，48 小時後追加 100 微升之 2-戊醇及 4%（重量/體積）之 IPA。64 小時後，在反應混合物中之所有膽汁酸中的熊去氧膽烷酸部分 >99%。尤其是，鵝去氧膽烷酸的部分為約 0.3%。於未加入氯化錳的對照反應物中，鵝去氧膽烷酸的部分為約 2% 且熊去氧膽烷酸的部分為約 97.5%（從每組 5 次實驗獲得之平均值）。

實例 11

藉由使用醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統以及組合之乳酸脫氫酶和 NADH 氧化酶依賴性輔因子再生系統，將鵝去氧膽烷酸經由 7α -羥基類固醇脫氫酶及 7β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化成熊去氧膽烷酸

0.5 毫升之反應物中含有 50 毫克鵝去氧膽烷酸、12 U 之來自大腸桿菌的重組 7 α -羥基類固醇脫氫酶、6 U 之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7 β -羥基類固醇脫氫酶以及 0.5 mM NAD⁺和 0.3 mM NADPH。使用 6 U 之重組乳酸脫氫酶和 350 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD⁺。此外，使用 9U 之來自腸膜明串珠菌的重組 NADH 氧化酶以及 6 U 之來自胺基戊酸梭狀芽孢桿菌的重組 NADH 氧化酶以用於再生 NAD⁺。使用 6U 之來自高加索酸奶乳桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 2.4 % (重量/體積) 之 IPA 以用於再生 NADPH。在 25°C 之水性磷酸鉀緩衝液 (100mM, pH 值 = 7.8) 中進行反應並一邊持續搖動 (850rpm)。進一步使用開放系統以將丙酮蒸發並使反應轉移朝向熊去氧膽烷酸。6 小時後追加 1.6 % (重量/體積) 之 IPA, 16 小時後追加 2.4 % (重量/體積) 之 IPA 且 24 小時後追加 3.9 % (重量/體積) 之 IPA 劑量。36 小時後加入 200 微升之 2-戊醇及 3 % (重量/體積) 之 IPA, 48 小時後追加 100 微升之 2-戊醇及 4 % (重量/體積) 之 IPA 劑量。64 小時後，在反應混合物中之所有膽汁酸中的熊去氧膽烷酸部分 >99 %。尤其是，鵝去氧膽烷酸的部分約 0.2 %。於未加入 NADH 氧化酶的對照反應物中，鵝去氧膽烷酸的部分為約 2 % 且熊去氧膽烷酸的部分為約 97.5 % (與實例 11 之對照反應物相同；從每組 5 次實驗獲得之平均值)。

實例 12

藉由使用醇脫氫酶依賴性輔因子再生系統以及組合之乳酸脫氫酶和 NADH 氧化酶依賴性輔因子再生系統，將鵝去氧膽烷酸經由 7α -羥基類固醇脫氫酶及 7β -羥基類固醇脫氫酶差向異構化成熊去氧膽烷酸。2-戊醇和 2-丙醇之加成作用

50 毫升之反應物中含有 5 克鵝去氧膽烷酸、24 U/毫升之來自大腸桿菌的重組 7α -羥基類固醇脫氫酶、12 U/毫升之來自扭鏈瘤胃球菌的重組 7β -羥基類固醇脫氫酶以及 0.55 mM NAD^+ 和 0.3 mM NADPH。使用 12 U/毫升之重組乳酸脫氫酶和 350 mM 之丙酮酸鈉以用於再生 NAD^+ 。此外，使用 18 U/毫升之來自腸膜明串珠菌的重組 NADH 氧化酶，以及 12 U/毫升之來自胺基戊酸梭狀芽孢桿菌的重組 NADH 氧化酶以用於再生 NAD^+ 。使用 12U/毫升之來自高加索酸牛奶乳桿菌的重組醇脫氫酶和最初為 1.5%（重量/體積）之 IPA 以用於再生 NADPH。在 25°C ，帶有 5 mM MnCl_2 之水性磷酸鉀緩衝液（100mM，pH 值=7.8）中進行反應。在 3 頸反應容器中以 KPG-攪拌器在約 100rpm 下攪拌。藉由使空氣流（約 400-600 毫升/分鐘）通過反應容器來有效移除源自反應物之丙酮。由於 2-丙醇亦被同時蒸發，必須額外添加，例如 0.75 毫升（1.5 小時）、0.75 毫升（3 小時）、0.5 毫升（4 小時）、0.75 毫升（6 小時）、0.75 毫升（8 小時）、0.5 毫升（11 小時）、0.5 毫升（14 小時）、0.5 毫升（17 小時）、0.5 毫升（21 小時）、1 毫升（23 小時）、2.5 毫升（25 小時）、4 毫升

(29 小時) 之劑量。約 30 小時後，加入 20 毫升之 2-戊醇及 2 毫升之 2-丙醇。經過 46 小時之總反應時間後，7-酮基石膽酸部分為約 1% (相關於鵝去氧膽烷酸、熊去氧膽烷酸及 7-酮基石膽酸之總和)。進一步加入 2-丙醇：3 毫升 (46 小時)、4 毫升 (52 小時)、4 毫升 (54 小時)，以及額外之 10 毫升 2-戊醇。經過 72 小時總反應時間後，7-酮基石膽酸的部分可降低至少於 0.2%。熊去氧膽烷酸之部分 >99%。

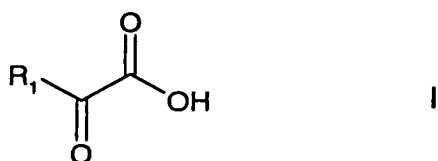
實例 13

膽汁酸之檢查和分析

終止如實例 8 至 12 中所描述之反應後，存在於本試驗中之膽汁酸可經由如實例 4 中描述之方法分析。

申請專利範圍

1. 一種使氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及/或尤其是 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應 (one-pot reaction) 中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次 (產物形成反應) 中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，該方法之特徵在於：a) 在經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，氧或通式 I 之化合物被還原，



其中 R_1 代表直鏈或支鏈 ($\text{C}_1\text{-C}_4$) 烷基或 ($\text{C}_1\text{-C}_4$) 羧基烷基，及

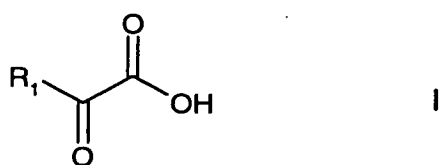
b) 在經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，($\text{C}_4\text{-C}_8$) 環烷醇或通式 II 之化合物被氧化，



其中 R_2 和 R_3 獨立地選自下列群組： H 、($\text{C}_1\text{-C}_6$) 烷基 (其中烷基為直鏈或支鏈)、($\text{C}_1\text{-C}_6$) 烯基 (其中烯基為直鏈或支鏈且包含一至三個雙鍵)、芳基 (尤其是 $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ 芳基)、羧基及 ($\text{C}_1\text{-C}_4$) 羧基烷基，尤其是亦選自環烷基，例如 $\text{C}_3\text{-C}_8$ 環烷基。

2. 如申請專利範圍第 1 項之使氧化還原輔因子 NAD^+/NADH 及/或尤其是 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在一鍋反應中經酶催化再生之方法，其中由於至少兩個其他經酶催化之氧化還原反應在相同反應批次（產物形成反應）中進行，該兩種氧化還原輔因子之一係以其還原形式積聚，且另一者係分別地以其氧化形式積聚，其中：

a) 在該經氧化之輔因子再生期間，通式 I 之化合物被還原，



其中 R_1 代表經取代或未經取代之 C_1 - C_4 烷基，且

b) 在該經還原之輔因子再生期間，通式 II 之化合物被氧化，



其中 R_2 和 R_3 彼此獨立地選自下列群組：

- 1) -H，
- 2) - (C_1 - C_6) 烷基，其中烷基為直鏈或支鏈，
- 3) - (C_1 - C_6) 烯基，其中烯基為直鏈或支鏈且選擇性地包含達三個雙鍵，
- 4) -環烷基，尤其是 C_3 - C_8 環烷基，
- 5) -芳基，尤其是 C_6 - C_{12} 芳基，
- 6) - (C_1 - C_4) 羧基烷基，若該通式 I 之化合物為丙酮酸，亦選擇性地為羧基。

3.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中 R_2 和 R_3 彼此獨立地選自下列群組：H、 (C_1-C_6) 烷基（其中烷基為直鏈或支鏈）、 (C_1-C_6) 烯基（其中烯基為直鏈或支鏈且包含一至三個雙鍵）、芳基（尤其是 C_6-C_{12} 芳基）、羧基及 (C_1-C_4) 羧基烷基。

4.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中氧化反應和還原反應係在同一受質（分子骨架）上發生。

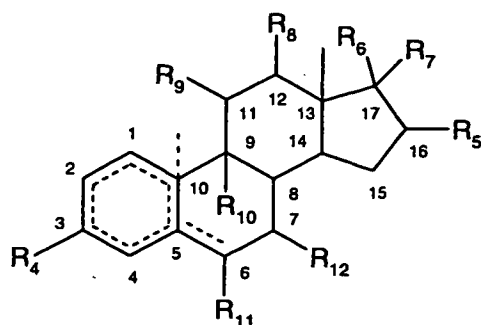
5.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中氧化反應和還原反應同時進行。

6.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中在該經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，2-丙醇係藉由醇脫氫酶經氧化成丙酮。

7.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中在該經還原之輔因子再被轉化為其原始之氧化形式的再生反應中，丙酮酸係藉由乳酸脫氫酶經還原成乳酸。

8.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中在該經氧化之輔因子再被轉化為其原始之還原形式的再生反應中，蘋果酸係藉由蘋果酸脫氫酶經氧化成丙酮酸及 CO_2 。

9.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中該方法係用於在相同之反應批次中對通式 III 之化合物分別進行至少一種氧化反應及至少一種還原反應，



III

其中

R_4 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_5 代表氫、羥基、側氧基或甲基，

R_6 代表氫或羥基，

R_7 代表氫、 $-\text{COR}_{13}$ ，其中 R_{13} 為未經取代或經羥基取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基，或經取代（尤其是經羥基取代）或未經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 羧基烷基，

或者 R_6 和 R_7 一起表示側氧基，

R_8 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_9 代表氫、甲基、羥基或側氧基，

R_{10} 代表氫、甲基或鹵素，

R_{11} 代表氫、甲基、羥基、側氧基或鹵素，且

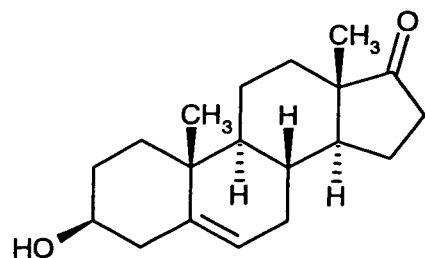
R_{12} 代表氫、羥基、側氧基或甲基，其中該結構單元



代表苯環或包含 6 個碳原子及 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的環；尤其是其中在該涉及形成產物之還原反應的反應批次中，該受質之濃度 $< 5\%$ （重量/體積）。

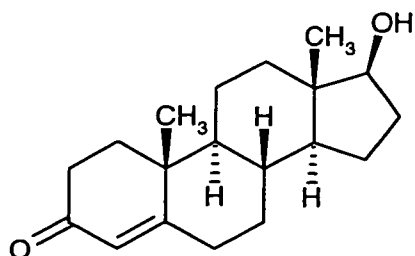
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該方法係用於轉化式 VII 之脫氫表雄固酮（dehydroepiandrosterone）

(DHEA)



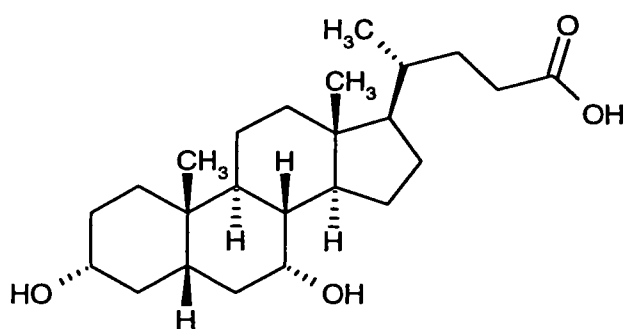
VII

成式 VIII 之睪酮 (testosterone)



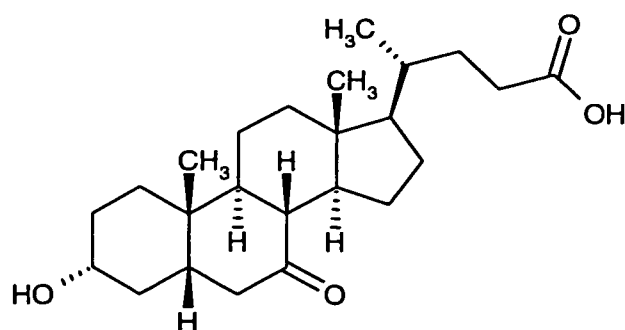
VIII

11.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該方法使用兩種相反立體特異性之羥化類固醇脫氫酶使式 IV 之 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基- 5β -膽烷酸（鵝去氧膽酸）經酶催化差向異構化



IV

藉由氧化反應轉化成式 V 之酮基石膽酸

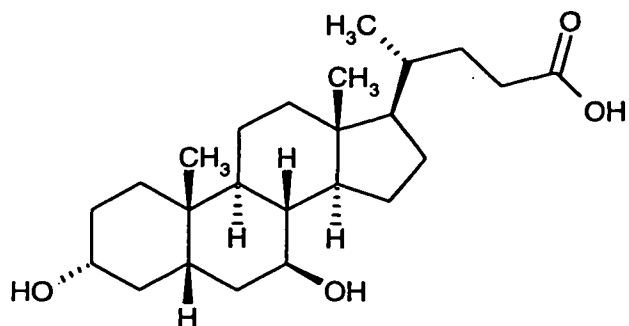


V

且隨後藉由還原反應轉化成式 VI 之立體異構性羥基化

S

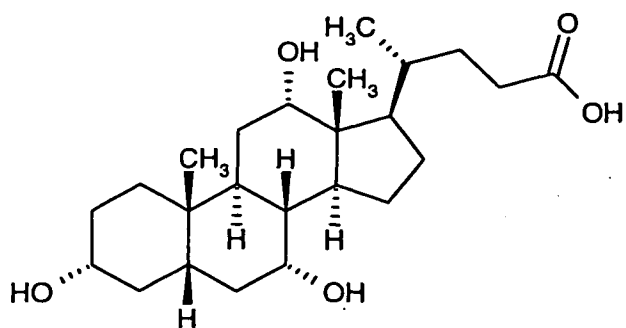
合物 $3\alpha,7\beta$ -二羥基- 5β -膽烷酸（熊去氧膽酸）



VI

尤其是該氧化反應係經大腸桿菌之 7α -羥基類固醇脫氫酶催化；和 / 或該還原反應係經扭鏈瘤胃球菌（*Ruminococcus torques*）之 7β -羥基類固醇脫氫酶催化。

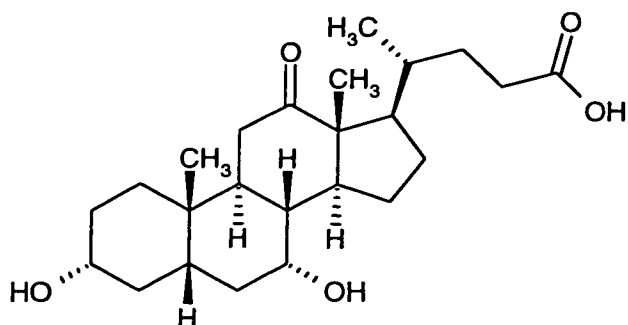
12.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該方法使用 3 種立體特異性之羥化類固醇脫氫酶（其中 2 種具有相反之立體特異性）使式 IX 之 $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -三羥基- 5β -膽烷酸（膽烷酸）經酶催化差向異構化



IX

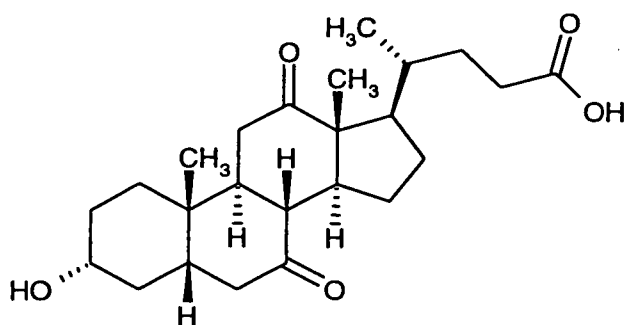
，由：

A) 氧化反應以獲得式 X 之 $3\alpha,7\alpha$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸（12-側氧基-CDC）



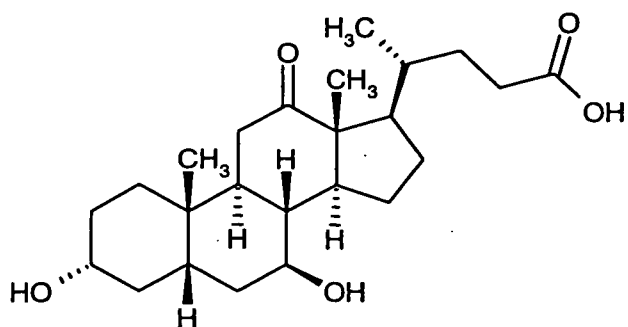
X

其進一步經反應以獲得式 XI 之 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸 (12 側氧基-KLC)



XI

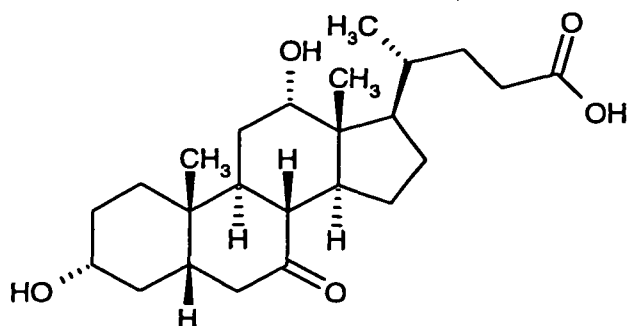
隨後經還原成式 XII 之立體異構性羥基化合物 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-酮基-熊去氧膽烷酸)



XII

或

B) 氧化反應以獲得式 XIII 之 $3\alpha,12\alpha$ -二羥基-7-側氧基- 5β -膽烷酸

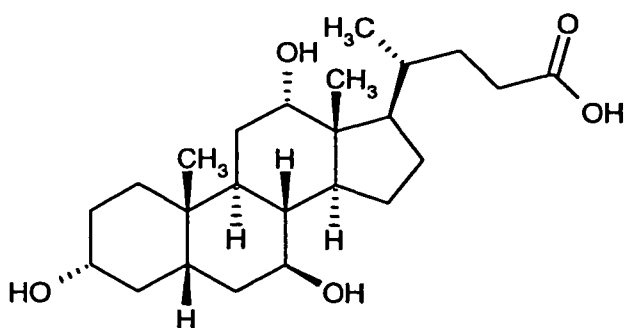


XIII

隨後經酶催化之氧化反應以獲得式 XI 之 3α -羥基-7,12-二側氧基- 5β -膽烷酸 (12 側氧基-KLC)，且再隨後經還原反應以獲得式 XII 之立體異構性羥基化合物 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-酮基-熊去氧膽烷酸)，

或

C) 氧化反應以獲得式 XIII 之 $3\alpha,12\alpha$ -二羥基-7-側氧基- 5β -膽烷酸，隨後經酶催化之還原反應以獲得式 XIV 之 $3\alpha,7\beta,12\alpha$ -三羥基- 5β -膽烷酸



XIV

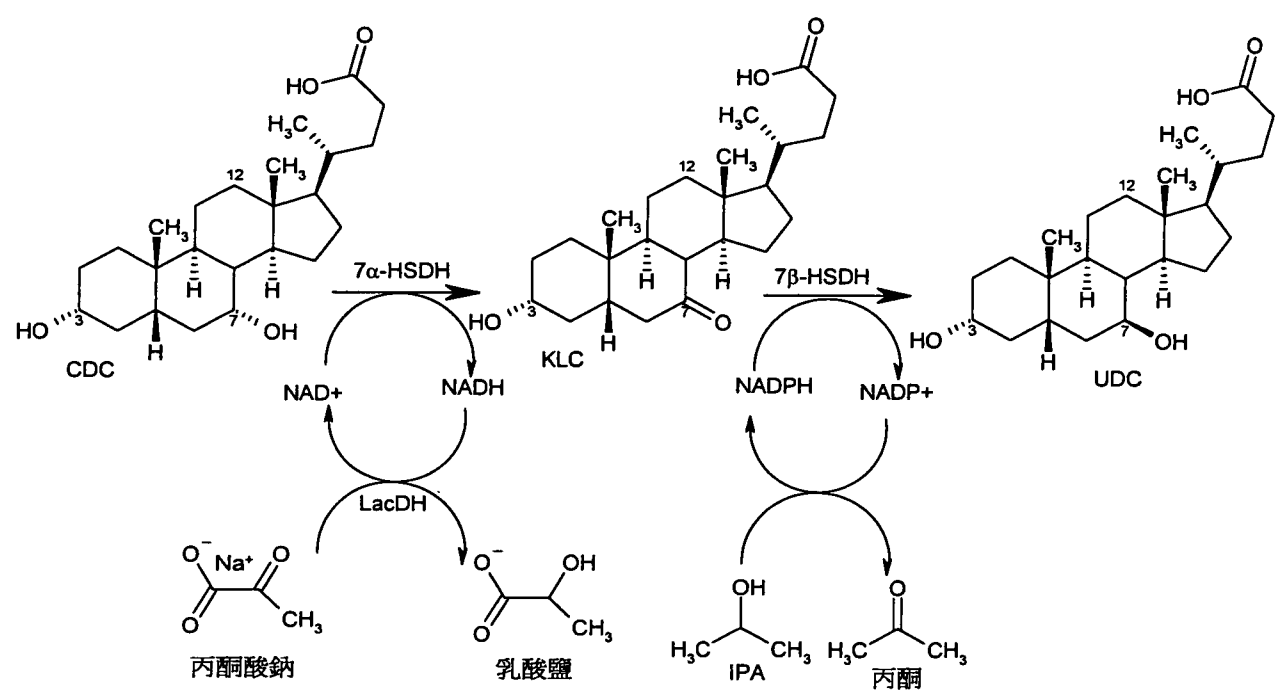
且再隨後經氧化反應以獲得式 XII 之立體異構性羥基化合物 $3\alpha,7\beta$ -二羥基-12-側氧基- 5β -膽烷酸 (12-酮基-熊去氧膽烷酸)。

13. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中該方法係用於使 C_5 或 C_6 糖異構化，尤其是經由還原成山梨醇且隨後氧化成果糖使葡萄糖異構化。

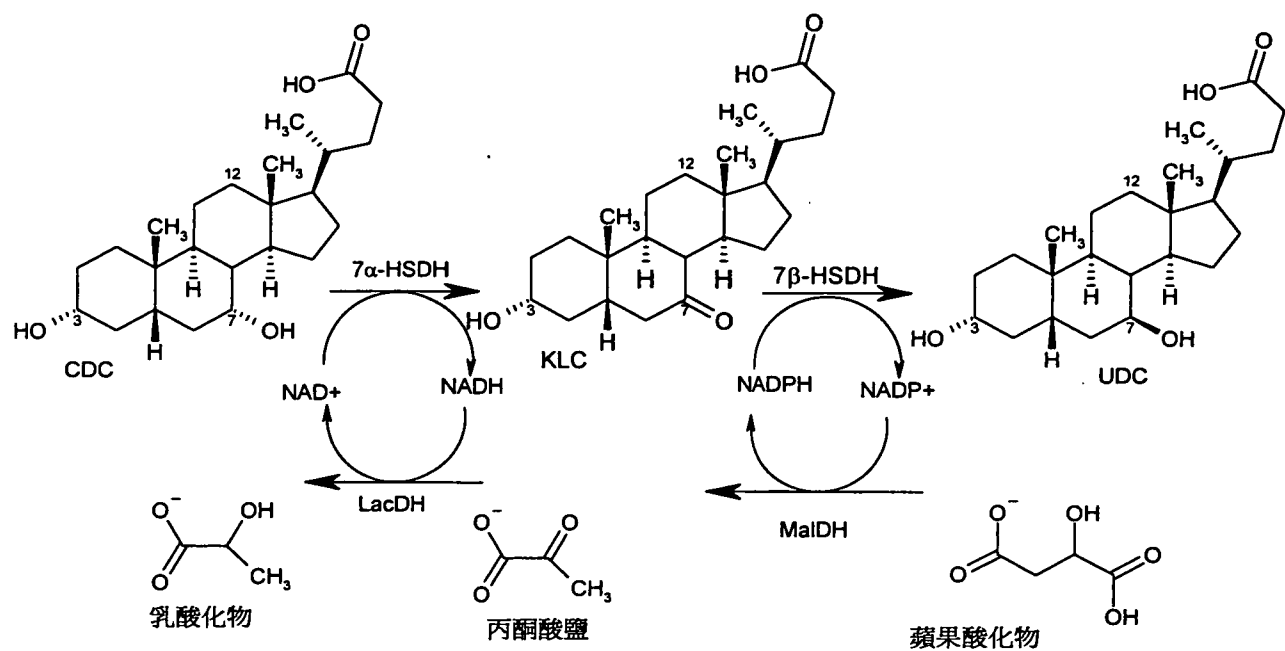
14.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中在該反應批次中，該用於涉及形成產物之氧化反應中的受質之濃度為至少 5% 或高於 5%（重量/體積），尤其是 7% 或高於 7%（重量/體積），尤其是 9% 或高於 9%（重量/體積）。

15.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中該產物形成反應所達到之整體更替率為 $\geq 70\%$ ，尤其是 $\geq 90\%$ 。

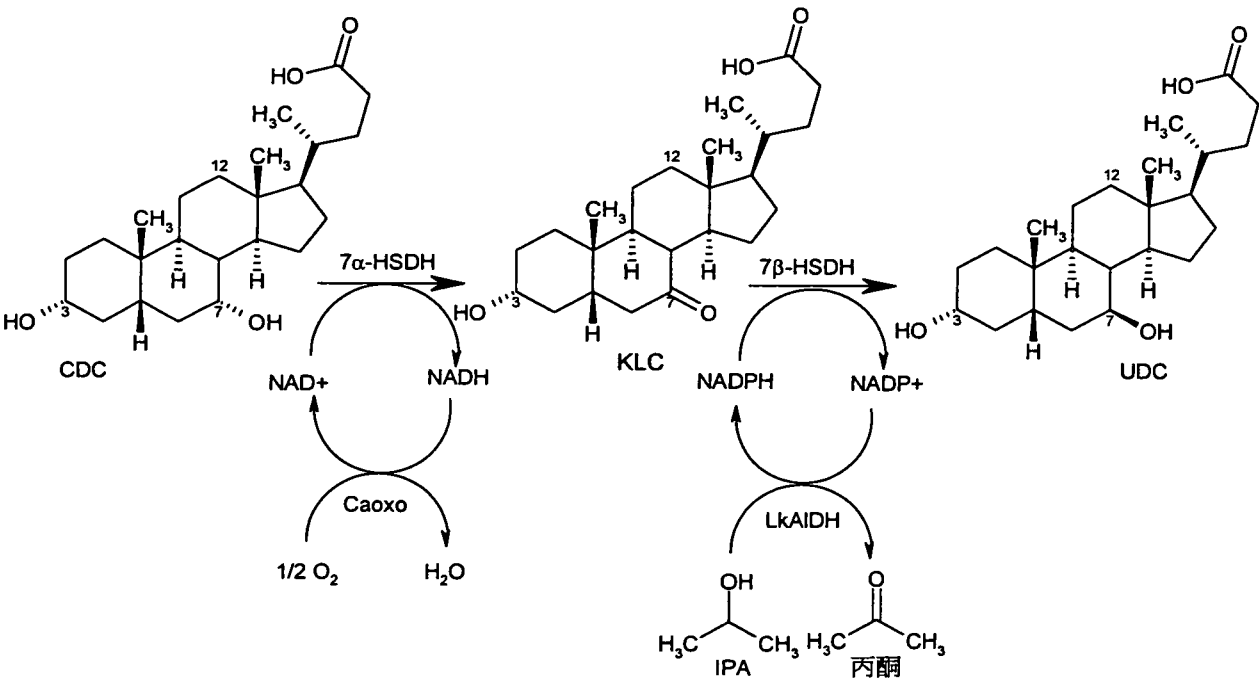
圖式



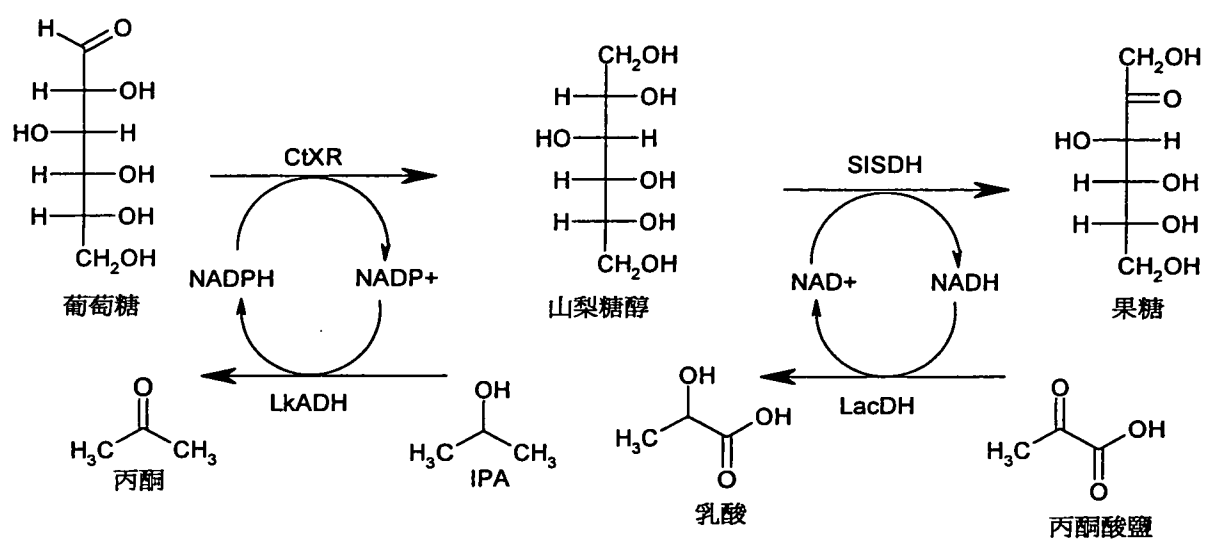
第 1 圖



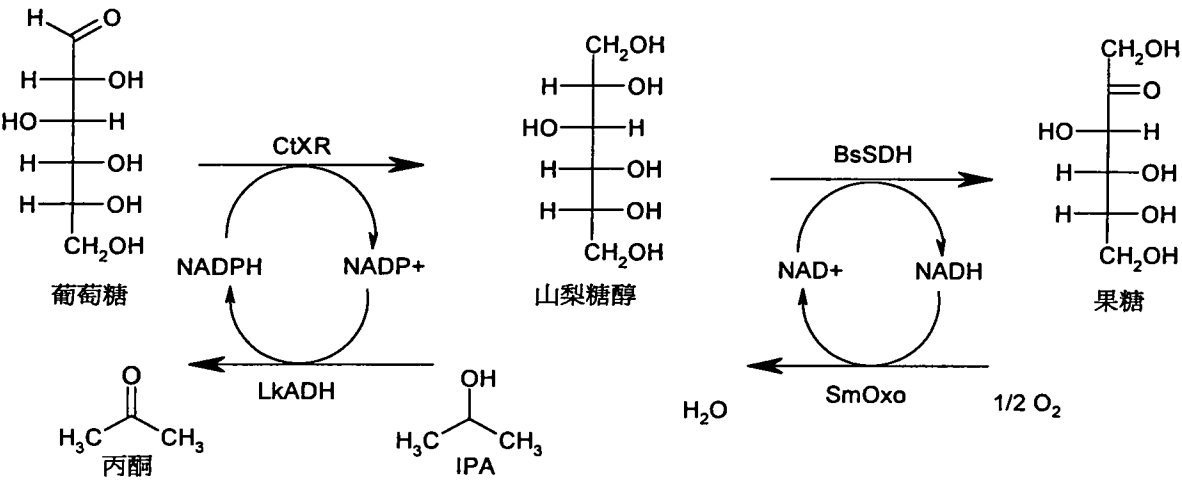
第 2 圖



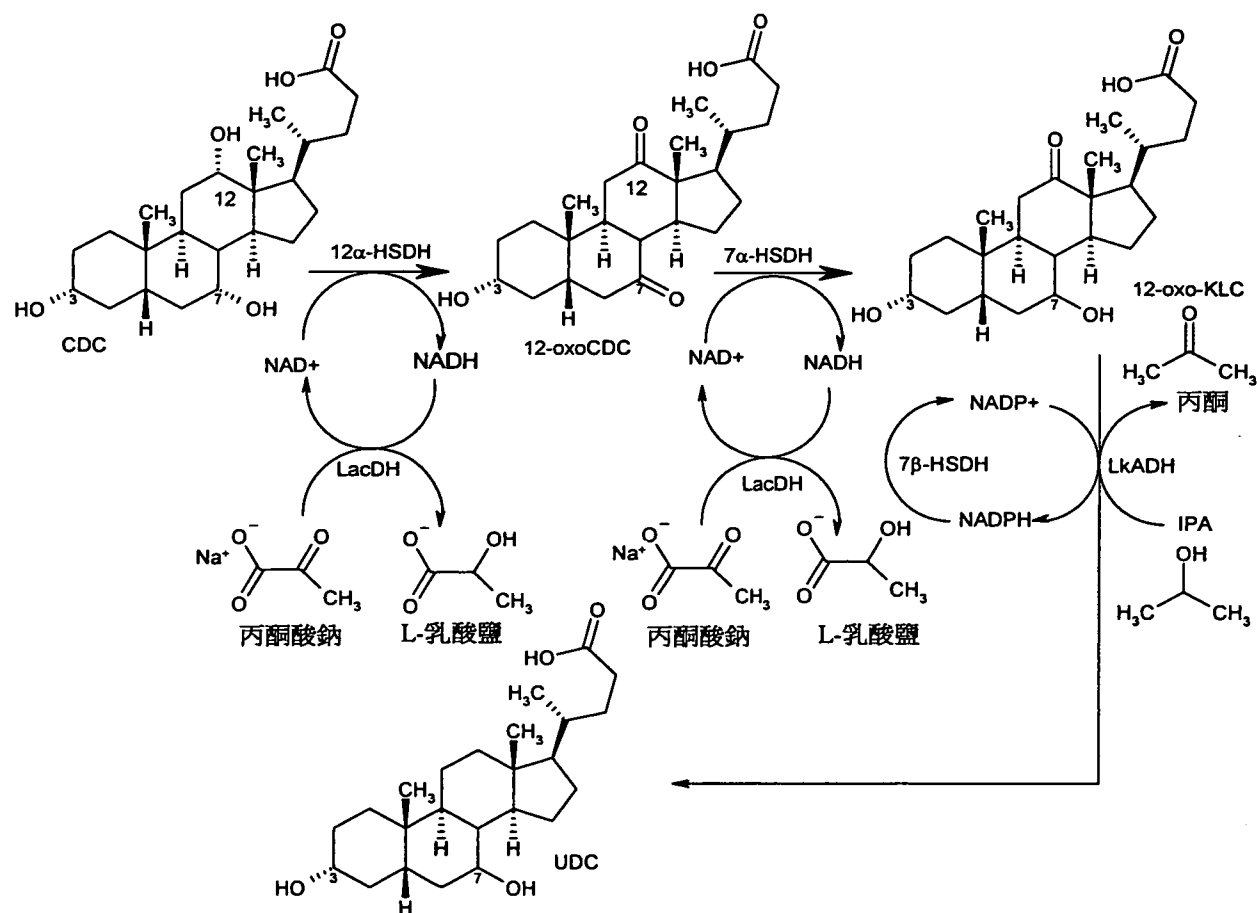
第 3 圖



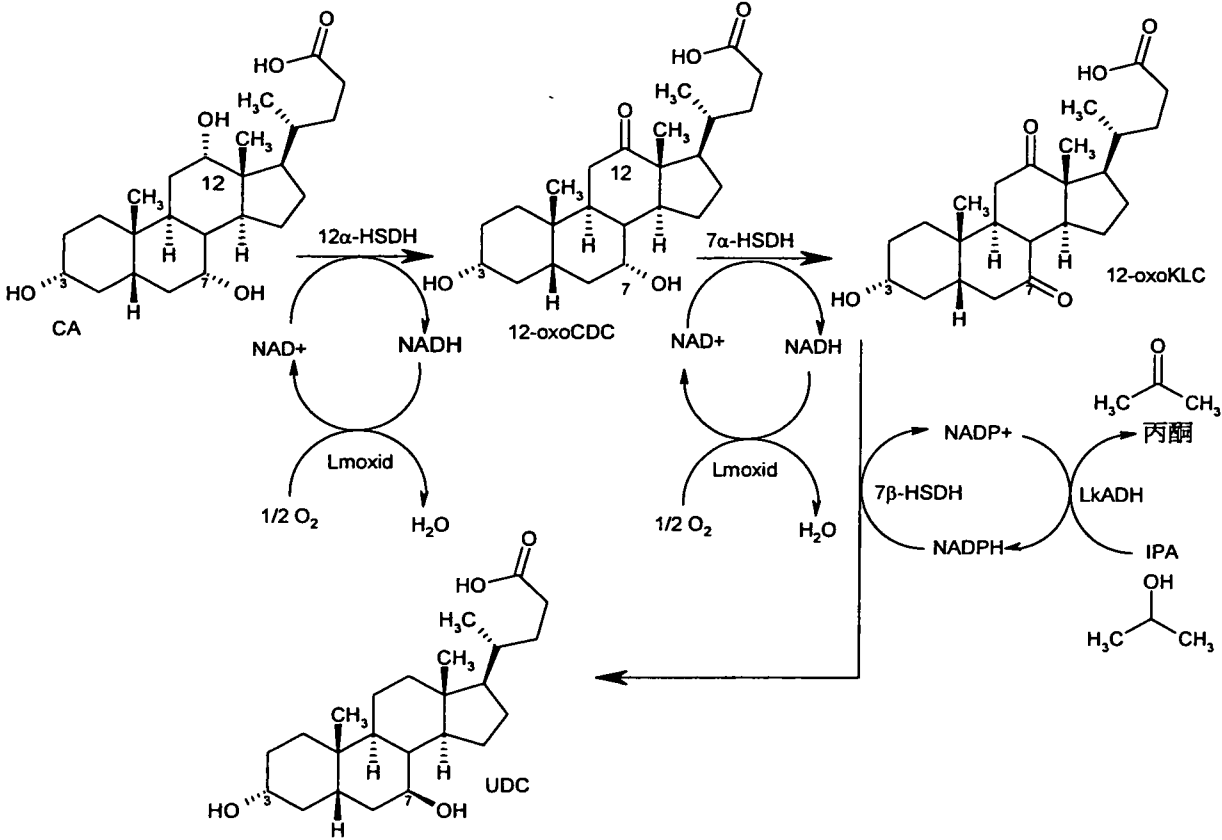
第4圖



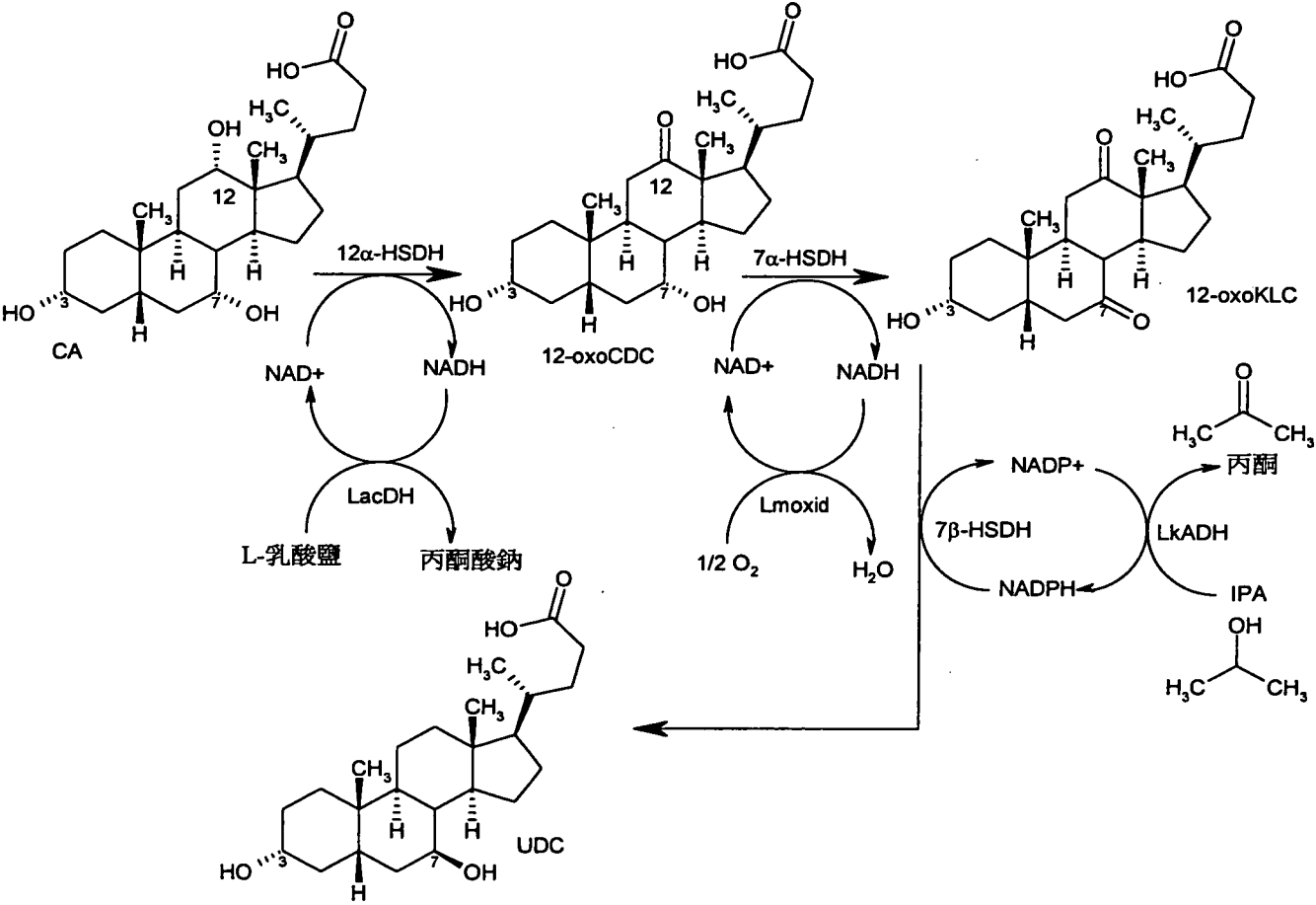
第 5 圖



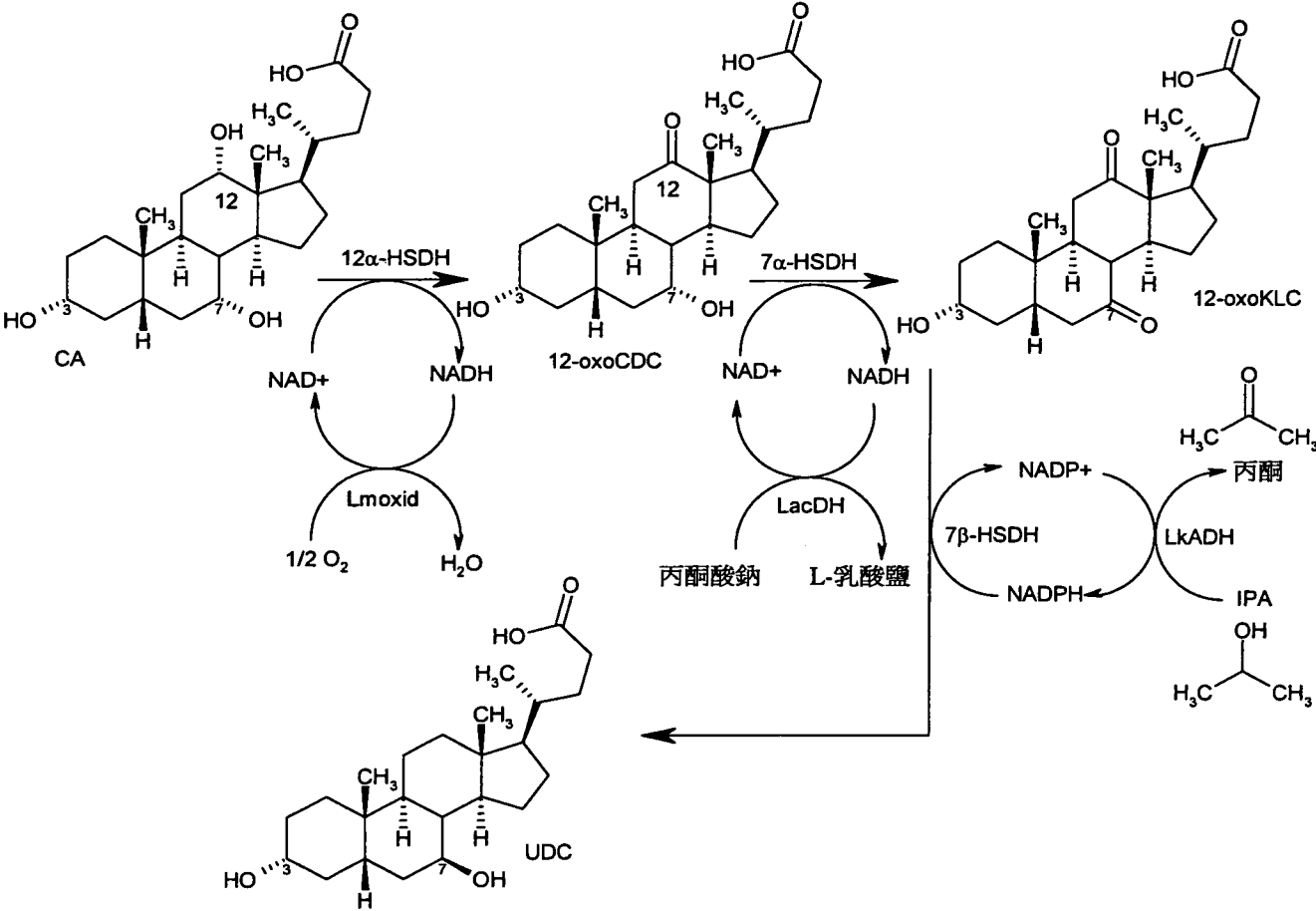
第 6 圖



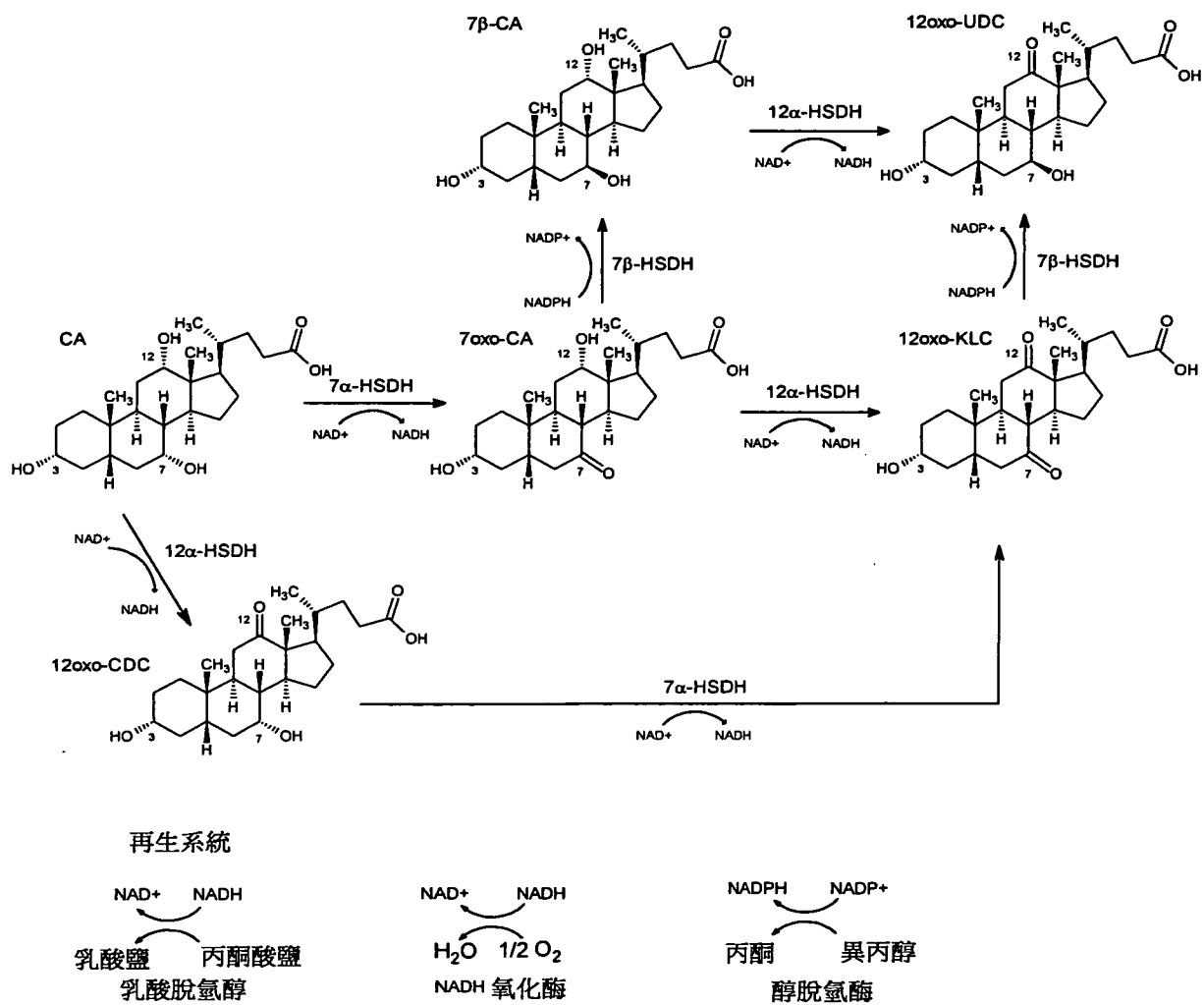
第 7 圖



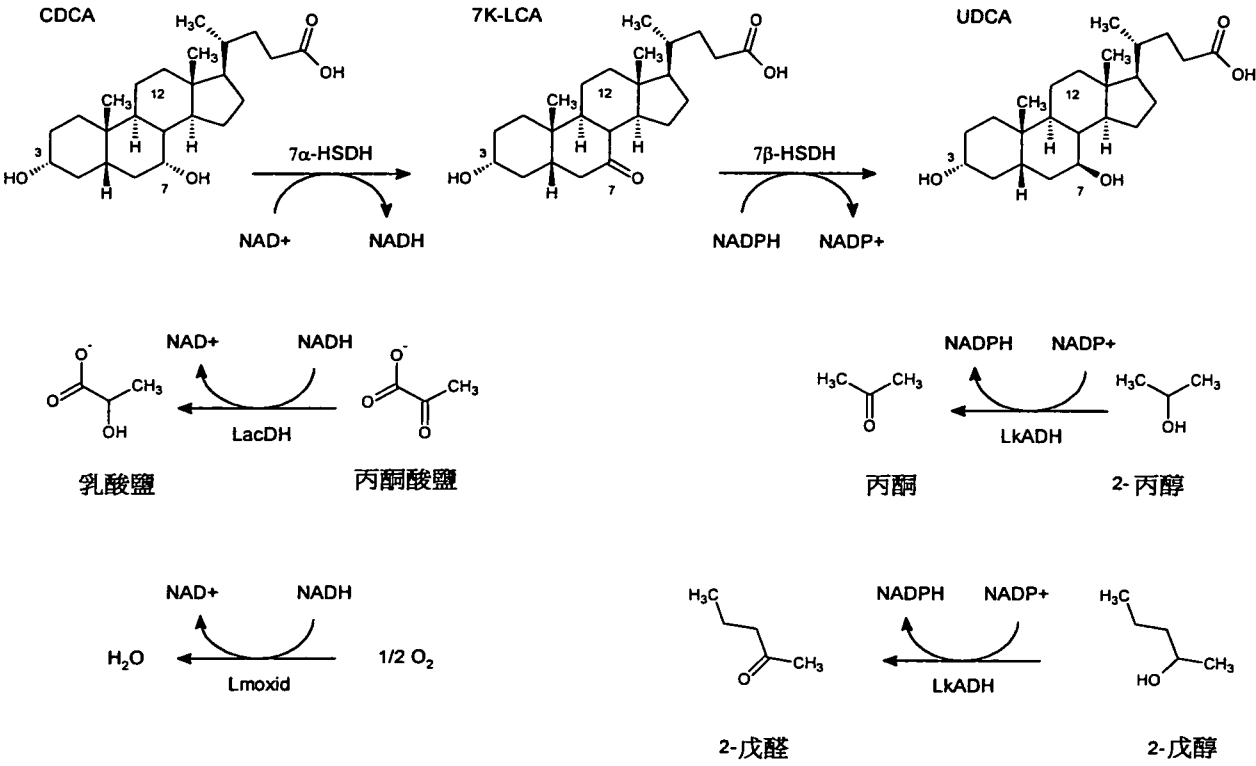
第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖



第 11 圖