

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07H 17/06 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03126111.6

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100362012C

[22] 申请日 2003.4.9 [21] 申请号 03126111.6

[73] 专利权人 河南宝隆生物技术有限公司

地址 450002 河南省郑州市红专路 58 号

[72] 发明人 赵天增 吴鸣建 董建军 傅经国
张海艳

[56] 参考文献

US6197308B1 2001.3.6

JP223880A 1990.1.26

JP2002128678A 2002.5.9

审查员 王 颖

[74] 专利代理机构 郑州联科专利事务所

代理人 田小伍

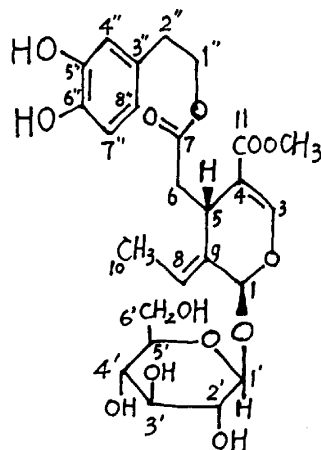
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法

[57] 摘要

一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，属于有机化合物的生物转化合成技术领域。包括培养基的制备、外植体的诱导及组织(细胞)培养和目标分子的提取四个步骤。可以只经过固体培养基培养并提取，也可以先经过固体培养基培养再经过液体培养基培养并提取。该方法工艺简单、易行、产品收率高、生产成本低，易于工业化应用。



1、一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，其特征在于，包括培养基的制备、外植体的诱导、组织培养和目标分子的提取四个步骤；在外植体诱导步骤，取木犀科丁香属、女贞属的植物叶片、叶芽或根茎消毒后接种于固体培养基上，于 15—32℃ 培养 15—108 天；在目标分子提取步骤，将收获的愈伤组织置于提取器中用有机溶剂回流提取 2—6 小时或冷浸 8—48 小时，除去有机溶剂得目标分子裂环环烯醚萜甙类化合物。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，固体培养基中含有硫酸镁 160—689mg/l，磷酸二氢钾或磷酸二氢钠或二者之和 70—350mg/l，硝酸钾 860—4200mg/l，硝酸铵 725—4600mg/l，氯化钙 180—980mg/l，硫胺 0.05—1.25 mg/l，肌醇 25—250mg/l，硼酸 1.6—26.8mg/l，硫酸锰 3.9—62.5mg/l，硫酸锌 2.1—32.2mg/l，钼酸钠 0.0125—0.0725mg/l，硫酸铜 0.0125—0.0725 mg/l，氯化钴 0.0125—0.0725mg/l，碘化钾 0.0215—2.65mg/l，硫酸亚铁 6.5—65.5mg/l，EDTA 钠盐 9.8—76.4mg/l 或 EDTA 铁盐 21.5—86mg/l，2，4-D、N⁶-呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、6-糠氨基腺嘌呤之一或二种以上的和 0.05—25mg/l，萘乙酸、萘甲酸、吲哚-3-乙酸、4-氨基-3，5，6-三氯吡啶甲酸之一或二种以上的和 0.1—50mg/l，蔗糖 12000—60000mg/l，琼脂 4500—32000 mg/l，逐一称取除蔗糖、琼脂外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖和琼脂，加入上述溶液中溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得固体培养基。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，固体培养基中还含有吡多醇 0.125—1.25mg/l、烟酸 0.025—0.25mg/l。

4、如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，其特征在于，有机溶剂包括醇类、酮类和醚类有机溶剂。

5、如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，有机溶剂为醇类中的甲醇或者乙醇，用量为愈伤组织重量的 10—20 倍。

6、一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，其特征在于，包括固体培养基和液体培养基的制备、外植体的诱导、组织培养和目标产物的提取四个步骤；在外植体诱导步骤，取木犀科丁香属、女贞属的植物叶片、叶芽或根茎消毒后接种于固体培养基上，于 15—32℃ 培养 14—49 天；再取出愈伤组织

转移到液体培养基中于震荡培养箱或摇床或生物反应器或反应釜中在 18—32℃培养 10—60 天；在目标产物提取步骤，将培养物和培养基先过滤分开再分别置于提取器中用有机溶剂提取，除去有机溶剂得目标产物裂环环烯醚萜甙类化合物。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，液体培养基中含有硫酸镁 160—689mg/l，磷酸二氢钾或磷酸二氢钠或二者之和 70—350mg/l，硝酸钾 860—4200mg/l，硝酸铵 725—4600mg/l，氯化钙 180—980mg/l，硫胺 0.05—1.25mg/l，肌醇 25—250mg/l，硼酸 1.6—26.8mg/l，硫酸锰 3.9—62.5mg/l，硫酸锌 2.1—32.2mg/l，钼酸钠 0.0125—0.0725mg/l，硫酸铜 0.0125—0.0725mg/l，氯化钴 0.0125—0.0725mg/l，碘化钾 0.0215—2.65mg/l，硫酸亚铁 6.5—65.5mg/l，EDTA 钠盐 9.8—76.4mg/l 或 EDTA 铁盐 21.5—86mg/l，2,4-D、N⁶-呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、6-糠氨基腺嘌呤之一或二种以上的和 0.05—25mg/l，萘乙酸、萘甲酸、吲哚-3-乙酸、4-氨基-3,5,6-三氯吡啶甲酸之一或二种以上的和 0.1—50mg/l，蔗糖 12000—60000mg/l，逐一称取除蔗糖外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖，加入上述溶液中溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得液体培养基；固体培养基比液体培养基配方中增加琼脂成分，含量为 4500—19500mg/l，其制法为：称取除蔗糖、琼脂外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖和琼脂，加入上述溶液中溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得固体培养基。

8、如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，固体培养基和液体培养基中各含有吡多醇 0.125—1.25mg/l、烟酸 0.025—0.25mg/l。

9、如权利要求 6、7 或 8 所述的方法，其特征在于，有机溶剂包括醇类、酮类和醚类有机溶剂。

10、如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，有机溶剂为醇类中的甲醇或者乙醇，用量为愈伤组织的 10—20 倍。

一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法

技术领域

本发明属于有机化合物的生物转化合成技术领域，特别涉及一种利用组织（细胞）培养法合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法。

背景技术

裂环环烯醚萜甙类化合物是一类具有抗菌、消炎、抗病毒、抗氧化、抗癌、降血糖等作用的物质，且毒性很低，可用于医疗和保健功能方面。但是，这类化合物在天然植物中含量很低，且化学结构复杂，利用化学方法进行全合成非常困难，且不经济，严重地限制了对其进一步的开发和利用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种适于工业化生产的合成裂环环烯醚萜甙类化合物的生物转化合成方法即组织（细胞）培养方法。

为了达到上述目的，本发明采用如下技术方案：一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，包括培养基的制备、外植体的诱导、组织（细胞）培养和目标分子的提取四个步骤：在外植体诱导步骤，取木犀科丁香属、女贞属、木犀属、木犀榄属、茉莉属、雪柳属和梣属的植物叶片、叶芽或根茎消毒后接种于固体培养基上，于 15—32℃ 培养 15—108 天；在目标分子提取步骤，将收获的愈伤组织置于提取器中用有机溶剂回流提取 2—6 小时或冷浸 8—48 小时，除去有机溶剂得目标分子裂环环烯醚萜甙类化合物。

固体培养基中含有硫酸镁 160—689 mg/l，磷酸二氢钾或磷酸二氢钠或二者之和 70—350 mg/l，硝酸钾 860—4200 mg/l，硝酸铵 725—4600 mg/l，氯化钙 180—980 mg/l，硫胺 0.05—1.25 mg/l，肌醇 25—250 mg/l，硼酸 1.6—26.8 mg/l，硫酸锰 3.9—62.5 mg/l，硫酸锌 2.1—32.2 mg/l，钼酸钠 0.0125—0.0725 mg/l，硫酸铜 0.0125—0.0725 mg/l，氯化钴 0.0125—0.0725 mg/l，碘化钾 0.0215—2.65 mg/l，硫酸亚铁 6.5—65.5 mg/l，EDTA 钠盐 9.8—76.4 mg/l 或 EDTA 铁盐 21.5—86 mg/l，2, 4-D、N⁶-呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、6-糠氨基腺嘌呤之一或二种以上的和 0.05—25 mg/l，萘乙酸、萘甲酸、吲哚-3-乙酸、4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶甲酸之一或二种以上的和 0.1—50 mg/l，蔗糖 12000—60000 mg/l，琼脂 4500—32000 mg/l，逐一称取除蔗糖、琼脂外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖和琼脂，加入上述溶液中

溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得固体培养基。

固体培养基中还含有吡多醇 0.125—1.25mg/l、烟酸 0.025—0.25 mg/l。

有机溶剂包括醇类、酮类和醚类有机溶剂。

有机溶剂为醇类中的甲醇或者乙醇，用量为愈伤组织重量的 10—20 倍。

一种合成裂环烯醚萜甙类化合物的方法，包括固体培养基和液体培养基的制备、外植体的诱导、组织（细胞）培养和目标产物的提取四个步骤：在外植体诱导步骤，取木犀科丁香属、女贞属、木犀榄属、茉莉属和木犀属的植物叶片、叶芽或根茎消毒后接种于固体培养基上，于 15—32℃ 培养 14—49 天；再取出愈伤组织转移到液体培养基中于震荡培养箱或摇床或生物反应器或反应釜中在 18—32℃ 培养 10—60 天；在目标产物提取步骤，将培养物和培养基先过滤分开再分别置于提取器中用有机溶剂提取，除去有机溶剂得目标产物裂环烯醚萜甙类化合物。

液体培养基中含有硫酸镁 160—689 mg/l，磷酸二氢钾或磷酸二氢钠或二者之和 70—350 mg/l，硝酸钾 860—4200 mg/l，硝酸铵 725—4600 mg/l，氯化钙 180—980 mg/l，硫胺 0.05—1.25 mg/l，肌醇 25—250 mg/l，硼酸 1.6—26.8 mg/l，硫酸锰 3.9—62.5 mg/l，硫酸锌 2.1—32.2 mg/l，钼酸钠 0.0125—0.0725 mg/l，硫酸铜 0.0125—0.0725 mg/l，氯化钴 0.0125—0.0725 mg/l，碘化钾 0.0215—2.65 mg/l，硫酸亚铁 6.5—65.5 mg/l，EDTA 钠盐 9.8—76.4 mg/l 或 EDTA 铁盐 21.5—86 mg/l，2，4-D、N⁶-呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、6-糠氨基腺嘌呤之一或二种以上的和 0.05—25 mg/l，萘乙酸、萘甲酸、吲哚-3-乙酸、4-氨基-3，5，6-三氯吡啶甲酸之一或二种以上的和 0.1—50 mg/l，蔗糖 12000—60000 mg/l，逐一称取除蔗糖外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖，加入上述溶液中溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得液体培养基；固体培养基比液体培养基配方中增加琼脂成分，含量为 4500—19500 mg/l，其制法为：称取除蔗糖、琼脂外的培养基成分，用水溶解、混合并加水稀释到所需浓度，然后称取配方量蔗糖和琼脂，加入上述溶液中溶化，调 PH=4.5—7.0，经灭菌后得固体培养基。

固体培养基和液体培养基中各含有吡多醇 0.125—1.25mg/l、烟酸 0.025—0.25mg/l。

有机溶剂包括醇类、酮类和醚类有机溶剂。

有机溶剂为醇类中的甲醇或者乙醇，用量为愈伤组织的 10—20 倍。

本发明采用生物学和细胞工程中的组织（细胞）培养方法合成裂环烯

醚萜甙类化合物，不受自然资源限制，并且有利于保护生态环境，方法中培养基为组织（细胞）培养中广泛采用的植物细胞培养基，成分易得，培养基中含有氮、磷、钾等大量元素，硼、锌、锰、钼、铜、钴、钠、碘、铁等微量元素，硫胺、吡多醇、烟酸、肌醇等维生素和 2, 4-D、N⁶-呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、6-糠氨基腺嘌呤、萘乙酸、萘甲酸、吲哚-3-乙酸、4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶甲酸等植物生长调节物质，能够提供组织（细胞）培养所需的各种营养成分，培养条件温和，提取方法简便易行。整个方法易于工业化生产。本发明两种方法中，第一种方法仅采用固体培养基进行培养；第二种方法先采用固体培养基培养然后转入液体培养基进行培养，更易于工业化大规模生产，且缩短培养时间，产物收率大大提高，生产成本得以大大降低。

附图说明

图 1 为本发明中目标产物裂环环烯醚萜甙类化合物代表物橄榄苦甙的化学结构式。

具体实施方式

实施例 1，一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，取硫酸镁 370 mg，磷酸二氢钾 170 mg，硝酸钾 1900 mg，硝酸铵 1650 mg，氯化钙 440 mg，硫胺 1.0 mg，肌醇 100 mg，硼酸 6.2 mg，硫酸锰 15.6 mg，硫酸锌 8.6 mg，钼酸钠 0.025 mg，硫酸铜 0.025 mg，氯化钴 0.025 mg，碘化钾 0.085 mg，硫酸亚铁 27.8 mg，EDTA 钠盐 37.3 mg，2, 4-D 1.0 mg, 6-糠氨基腺嘌呤 2.0 mg，萘乙酸 3.0 mg，蔗糖 30000 mg，琼脂 12000 mg，逐一称取除蔗糖、琼脂外的培养基成分，用去离子水溶解、混合，然后称取配方量蔗糖和琼脂，加入上述溶液中溶化并加去离子水稀释到 1000ml，调 PH=5.8，经 121℃灭菌 25 分钟后得固体培养基。

将小叶丁香叶片或幼芽或嫩茎消毒后接种于灭菌后的固体培养基上，于 25℃培养箱内诱导产生愈伤组织并且培养 49 天，取出产物，置于索氏提取器中每次加 10 倍重量的无水乙醇提取 2 次，然后蒸出乙醇，得目标分子。其代表物橄榄苦甙结构式见图 1，其 NMR 数据列于表 1 中。

实施例 2，本实施例中将消毒后的女贞叶片置于灭菌后的固体培养基上，于 28℃培养箱内诱导并培养 49 天，取出产物，置于索氏提取器中每次加 15 倍重量的无水乙醇提取 2 次，然后蒸出乙醇，得目标分子。其它同实施例 1。

实施例 3，一种合成裂环环烯醚萜甙类化合物的方法，本实施例中，固体培养基及制法同实施例 1。液体培养基配方为硫酸镁 370 mg，磷酸二氢钾 170 mg，硝酸钾 1900 mg，硝酸铵 1650 mg，氯化钙 440 mg，硫胺 1.0 mg，肌醇 100

mg, 硼酸 6.2 mg, 硫酸锰 15.6 mg, 硫酸锌 8.6 mg, 钼酸钠 0.025 mg, 硫酸铜 0.025 mg, 氯化钴 0.025 mg, 碘化钾 0.085 mg, 硫酸亚铁 27.8 mg, EDTA 钠盐 37.3 mg, 2, 4-D 1.0 mg, 6-糠氨基腺嘌呤 2.0 mg, 萘乙酸 3.0 mg, 蔗糖 30000 mg, 逐一称取上述培养基成分, 用去离子水溶解、混合, 并加去离子水稀释到 1000ml, 调 PH=5.6, 经 121℃ 灭菌分钟后得液体培养基。

取小叶丁香叶片消毒后置入固体培养基上, 28℃ 培养 42 天, 将得到的愈伤组织转入液体培养基中, 于振荡培养箱内 25℃ 培养 21 天, 过滤分开培养物和培养液。培养物用甲醇提取 2 次, 每次加 10 倍重量的甲醇; 培养液用甲醇提取 2 次, 每次加 3 倍重量的甲醇。合并提取物即目标产物。其代表物橄榄苦甙结构式见图 1, 其 NMR 数据列于表 1 中。

实施例 4, 本实施例中, 将固体培养基培养所得愈伤组织转入盛有液体培养基的 50 升反应釜中, 25℃ 培养 18 天, 过滤分开培养物和培养液, 分别用甲醇提取。提取物即目标产物。其他同实施例 3。

表 1 橄榄苦甙的 NMR 数据 (CD₃COCD₃)

H	$\delta_H(\text{ppm})$	J(Hz)	C	$\delta_C(\text{ppm})$
1	5.91s		1	94.3
3	7.47s		3	154.1
5	3.94dd	9.6,4.0	4	108.7
6a	2.39dd	14.0,9.6	5	31.1
6b	2.70dd	14.0,4.0	6	40.4
8	6.01q	6.8	7	171.6
10	1.64d	6.8	8	124.0
			9	129.8
			10	13.3
			11	167.1
OMe	3.67s		OMe	51.4

1'	4.87d	8.0	1'	100.1
2',4',5'	3.41~3.45m		2'	74.1
3'	3.55t	8.8	3'	77.2
6'a	3.66dd	11.6,6.0	4'	70.9
6'b	3.87d	11.6	5'	77.4
			6'	62.3
1"a	4.07dt	10.8,7.2	1"	65.9
1"b	4.18dt	10.8,7.2	2"	34.6
2"	2.74t	7.2	3"	130.0
4"	6.73d	1.6	4"	116.5
7"	6.74d	8.0	5"	145.4
8"	6.56dd	8.0,1.6	6"	144.1
			7"	115.8
			8"	120.7

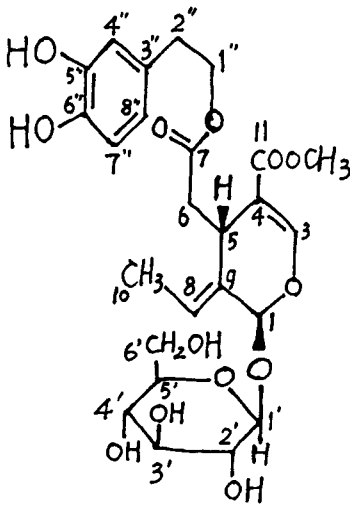


图 1