

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680034612.6

[51] Int. Cl.

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 3/04 (2006.01)

C07H 5/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月8日

[11] 公开号 CN 101282983A

[22] 申请日 2006.9.21

[21] 申请号 200680034612.6

[30] 优先权

[32] 2005.9.22 [33] IN [31] 1175/MUM/2005

[86] 国际申请 PCT/IN2006/000385 2006.9.21

[87] 国际公布 WO2007/054973 英 2007.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.20

[71] 申请人 法马德医疗保险私人有限公司

地址 印度马哈拉施特拉邦

[72] 发明人 拉克什·拉南 森迪普·奥萝拉

阿尔文·M·拉莉

P·萨布拉曼亚姆

马尼施·瓦德哈拉杰·佩特卡

阿查纳·阿维纳斯·科蒂雅

[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司

代理人 徐金国 梁 挥

权利要求书 2 页 说明书 6 页 按照条约第 19 条的修改
2 页

[54] 发明名称

氯化糖衍生物的酶促去乙酰化反应

[57] 摘要

本发明描述了生产三氯半乳糖的方法，其中通过将氯化后的反应混合物进行中和并调节 pH 至 6.5~7 以利用游离或固定化形式的酯酶或蛋白酶去乙酰化，完成蔗糖-6-酯的去乙酰化。

1、一种生产氯化蔗糖化合物的方法，其中利用能够除去保护基团的酶的作用使在溶液中的 6-O-保护的蔗糖去保护。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中：

a、所述 6-O-保护的蔗糖包括蔗糖-6-乙酸酯、蔗糖-6-苯甲酸酯、蔗糖-6-丙酸酯、蔗糖-6-月桂酸酯、蔗糖-6-戊二酸酯、蔗糖-6-棕榈酸酯等的一种或多种，

b、所述溶液包括一纯的 6-O-保护的蔗糖溶液，或 (ii) 一在生产氯化蔗糖化合物的方法中获得的工艺液流。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其中：

a、所述工艺液流包括一种或多种生产氯化蔗糖的方法，包括氯化蔗糖或蔗糖衍生物的方法，和

b、所述氯化蔗糖化合物包括一种或多种的氯化蔗糖，包括三氯半乳糖、二氯半乳糖、四氯半乳糖等。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其中所述氯化的方法包括将蔗糖或蔗糖衍生物与一种或多种氯化试剂利用下述一种或多种方法反应，包括：

a、溶解在吡啶中的蔗糖与磺酰氯的反应，或

b、在三苯基膦和 1,1,2-三氯乙烷存在下，蔗糖与亚硫酸氯的反应，或

c、蔗糖-6-酯与通式为 $[\text{HCIC}=\text{N}^+\text{R}_2]\text{Cl}^-$ 或 $[\text{HPOCl}_2\text{OC}^+=\text{N}^+\text{R}_2]\text{Cl}^-$ 的 Vilsmeier 试剂反应，其中 R 表示烷基，优选甲基或乙基。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其中能够除去保护基团的酶的作用是获得自酯酶或蛋白酶。

6、根据权利要求 5 所述方法，其中所述酯酶或蛋白酶是自由的或固定化的酶。

7、根据权利要求 6 所述的方法，包括步骤：

a、将在 (i) 一溶液或 (ii) 一生产氯化蔗糖的反应中获得的工艺液流中含有的蔗糖-6-乙酸酯用氯化试剂氯化，所述氯化试剂选自由 Vilsmeier 试剂、磺酰氯或亚硫酸氯组成的组，

b、调节本权利要求步骤 (a) 的工艺液流的 pH 至大约 6.5~7，

-
- c、将步骤（a）的工艺液流中形成的 6-O-保护的 TGS 去乙酰化，其（i）通过将其与自由的或固定化的酯酶、或者自由的或固定化的蛋白酶接触，优选伴随着在反应容器中震荡或者利用通过填充到柱中的酶床再循环，优选在大约 25~30℃的环境温度足够时间以完成最大可能大约 95%的去乙酰化，
- d、从本权利要求步骤（c）的工艺液流的一种不想要的组分中分离 TGS。

氯化糖衍生物的酶促去乙酰化反应

技术领域

本发明涉及用于生产 1-6-二氯-1-6-二脱氧-β-呋喃果糖-4-氯-4-脱氧-吡喃半乳糖苷 (TBS) 的新方法和新策略, 包括在氯化反应后获得的 6-O-保护的 TGS 的酶促去乙酰化反应。

背景技术

现有技术方法生产 4,1',6'-三氯半乳糖 (TGS) 的策略主要包括通过使用来自形成氯化的蔗糖-6-酯的 Vilsmeier-Haack 试剂来氯化蔗糖-6-酯以形成 6-乙酰基-4, 1',6'-三氯半乳糖, 所述 Vilsmeier-Haack 试剂使用诸如三氯氧磷、草酰氯、五氯化磷等的不同氯化试剂和诸如二甲基甲酰胺 (DMF) 的三级酰胺 (tertiary amide)。所述氯化反应后, 使用适宜的钙、钠等的碱性氢氧化物中和反应物料至 pH 7.0~7.5。然后使用钙、钠、钾等的碱性氢氧化物进一步使已中和物料的 pH 升至 9.5 或更高以使 6-乙酰基-4, 1',6'-三氯半乳糖去酯化/去乙酰化形成 4,1',6'-三氯半乳糖。这一碱去酯化反应/去乙酰化反应包括将反应物暴露于碱性范围内的苛刻 pH 中, 这导致了大量 DMF 被破坏, 这是昂贵的投入, 不利地影响其在反应后的回收。

在现有技术方法中, 该反应混合物在去乙酰化反应时也暴露于苛刻温度中, 这导致了产物 TGS 自身的破坏。

因此, 需要一种不暴露 DMF 至破坏的去乙酰化的方法。

已经发展了一种方法, 其在不暴露 DMF 至破坏的 pH 下完成酶促去乙酰化。

发明内容

Palmer 等(1995)在美国专利 no. 5445951 已经报道了酶促去乙酰化反应以制备蔗糖的部分乙酰化的衍生物, 其利用蔗糖酯的酶促去乙酰化反应, 从无有机介质中的蔗糖酯, 用能催化所述蔗糖酯去乙酰化的一种酶或酶的组合

以产生在预选位置具有自由羟基的部分去乙酰化的蔗糖衍生物，并且回收所获得的部分去乙酰化的蔗糖衍生物，所述的蔗糖酯选自蔗糖八酰酯（sucrose octaacrylate）、蔗糖七酰酯和蔗糖六酰酯组成的组。

关于蔗糖酯或其衍生物/前体的酶促去乙酰化反应没有其它已知的报道。

本发明涉及在制备人工甜味剂TGS期间氯化反应后获得的6-O-保护的TGS的酶促去乙酰化。可以进行本发明所述过程的氯化反应混合物的实施方式包括但不限于，蔗糖-6-酯与一种氯化试剂混合后所获得的工艺液流，所述氯化试剂描述于Mufti等(1983)美国专利no. 4380476、Walkup等(1990 No.4980463)、Jenner等(1982)美国专利no. 4,362,869、Tulley等(1989)美国专利no. 4,801,700、Rathbone等(1989)美国专利no. 4,826,962、Bornemann等(1992)美国专利no. 5,141,860、Navia等(1996)美国专利no. 5,498,709、Simpson (1989)美国专利no. 4,889,928、Navia (1990)美国专利no. 4,950,746、Neiditch等(1991)美国专利no. 5,023,329、Walkup等(1992) 5,089,608、Dordick等(1992)美国专利no. 5,128,248、Khan等(1995)美国专利no. 5,440,026、Palmer等(1995)美国专利no. 5,445,951、Sankey等(1995)美国专利no. 5,449,772、Sankey等(1995)美国专利no. 5,470,969、Navia等(1996)美国专利no. 5,498,709、Navia等(1996)美国专利no. 5,530,106。

在6-O-保护的TGS中间产物分离后或未分离，中和氯化反应物料后，在以如上所提及的方式获得的工艺液流上进行酶促去乙酰化反应。由于该酶促反应，存在于已中和的反应物料中的溶剂三级酰胺不会分解并因此导致所述溶剂的回收率提高。在本发明中，用适宜的碱中和氯化反应后的氯化反应物料。中和时，pH被控制为低于6.0，形成的化合物TGS在6位仍旧具有完整的被保护基团。在带有或不带有分离所述化合物下进行该6位的去保护（deblocking）。另外的一些参考文献也指出可在有或没有三级酰胺和其它溶剂和水溶液条件下进行该去保护。

本发明描述了使用酶促方法在6位去乙酰化反应，其中，在三级酰胺（包括用于氯化反应的DMF）存在或不存在时，酶选择性地除去被保护的基团。本发明的方法对不是氯化反应结果的实施方式（例如纯TGS-6-酯的单一溶液）的去乙酰化效果也很好。

催化去乙酰化反应的酶是众所周知的，酯酶和蛋白水解酶在温和的反应条件下进行去乙酰化和乙酰化反应并且已经被 Soedjak HS, Spradlin JE (1994). *Biocatalysis* 11: 241–248; Therisod M, Klibanov AM (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5638 – 5640; B. Cambou and A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 106,2687(1984); Kirpal S Bisht, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 68, No. 3, pp. 749-752, 1996; F.J. Plouf; M.A. Cruces, *Biotechnology Letters* 21: 635–639, 1999 广泛地报道。

在本发明中，反应物料中和后，使用适宜的碱调节 pH 至 6.5。然后在室温搅拌下，将酯酶缓慢地加入到反应物料中。取决于酶活性和反应条件，加入到反应物料中的酶量在 10%~40% w/v 变化。在已中和的反应物料中三级酰胺含量大约 10%~40%。将反应混合物持续搅拌 10~60h 的时间，优选 16~20h。通过 TLC 监测 6-O-保护的 TGS 到 TGS 的转变。彻底去乙酰化以后，反应混合物利用亲和色谱层析进行 TGS 分离。然后利用适宜的方法结晶该分离的 TGS。

6-O-保护的 TGS 去乙酰化为 TGS 所使用的酯酶或蛋白水解酶可以是其天然形式或固定化形式。当使用固定化酶时，该酶在完成去乙酰化反应后被过滤掉。该回收的酶还可以再利用。该固定化酶也可以填充到柱中并且反应物料可以通过该柱以及可以进行 6-O-保护的 TGS 原位去乙酰化。这些酶可以固定在合成的聚合物载体中或其上，所述载体例如但不限于聚丙烯酸、或聚苯乙烯或聚丙烯酰胺、尼龙基的载体；或半合成或天然有机载体，例如基于多糖（例如但不限于纤维素、淀粉、葡聚糖、琼脂糖、壳聚糖、几丁质等）的那些载体；或者无机载体，例如基于碳、二氧化硅、氧化锆、氧化铝、磷酸锆等的那些载体。

酯酶的来源可以是动物、植物或微生物源，优选微生物或细菌源的，例如 *Bacillus thermocatenulatusis*, *Pseudomonas aeruginosa* 等；真菌源的，例如 *Penicillium Roquefortii*, *Asperigillus niger*, *Asperigillus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miheii*, *Candida antartctica* 等。

在所述发明的过程期间，TGS 产物没有暴露于如在使用酸、碱的常规去乙酰化过程的情况下的任何苛刻的 pH 或温度条件中。相比于任何其它形式的去乙酰化过程该产物损失最小化。

在所述发明的过程期间，三级酰胺没有暴露于如在使用酸、碱的常规去乙酰化过程的情况下的任何苛刻的 pH 或温度条件。因此根本没有发生三级酰胺的分解。从而三级酰胺的回收效率很大程度地得以提高。

下面描述的是实施例，其说明了本发明的工作而不以任何方式限制本发明的范围。反应物、使用的反应物的比例、描述的反应条件的范围、使用的酶等仅仅是说明性的并且范围延伸至其类似的反应物、反应条件和类似通性的反应。通常，对氯化蔗糖生产领域技术人员显而易见的任何等效替代被包括在本说明书的范围内。因此，提及乙酸酯包括了可以进行本发明讨论的相同功能的任何等效的酯基团，而使用酶将包括能够在类似反应条件下，提供本文所描述的酶作用或类似作用的任何替代。实施方式的许多其它改变将被本领域技术人员很容易地预想并且它们也被包括在本说明书的范围内。除非文中不允许，所提及的单数也被认为包括其复数形式，即，使用用于提取的“一种有机溶剂”包括使用一种有机溶剂或连续使用多种有机溶剂或作为混合物组合使用多种有机溶剂。

具体实施方式

实施例 1、蔗糖-6-乙酸酯的氯化反应

在 5L 反应烧瓶中加入 1280ml 二甲基甲酰胺并冷却至 0~5°C。然后在搅拌下缓慢加入 635g 五氯化磷 (5.4mol)，保持反应物料的温度低于 30°C。将该物料进一步冷却至低于 0°C 并且在 -5°C 缓慢加入蔗糖-6-乙酸酯的 DMF 溶液。然后将反应物料加热至 80°C 并保持 1h，进一步加热至 100°C 并保持 6h，最终达到 110~115°C 并保持 2~3h。利用 HPLC 分析监测该反应的进程。

然后，将反应混合物冷却到 -5~-8°C 并且缓慢加入 20% 氢氧化钠溶液以便将物料的 pH 升到 5.5~6.5。利用此方法获得的产率是 55.4% 的蔗糖输入。

实施例 2、利用酯酶进行 6-O-乙酰基 TGS 的酶促去乙酰化反应

使用 50% 的氢氧化钙浆液将 1.5L 按照实施例 1 描述所制备的、含有 15g 6-O-乙酰化 TGS 的反应物料中和至 pH 7.5。用水将已中和的反应物料稀释至 6L。在该已中和的物料中的 DMF 含量是 33%。在环境温度下，将 84g 分离

自 *Aspergillus oryzae* ATCC 26850; NCIM 1212 的酯酶持续搅拌地加入到反应混合物中。反应持续几小时并且由 TLC 监测 TGS 的生成以及 6-O-乙酰化 TGS 的消失。在 42h 最后，完成高至 98.4% 的去乙酰化。

去乙酰化后，利用适宜的方法将该物料进行 TGS 分离。

实施例 3、利用在 Eudragit RL100 上的固定化酯酶进行 6-O-乙酰基 TGS 的酶促去乙酰化反应

在一个实验中，使用 50% 氢氧化钙浆液将 2.5L 含有 80g 6-O-乙酰化 TGS 的反应物料中和至 pH 5.5。用水将已中和的反应物料稀释至 6L。在该已中和的物料中 DMF 的含量是 33%。在 25°C~30°C 的温度（通常是环境温度），120g 在 Eudragit RL100 上的固定化酯酶持续搅拌地加入到反应混合物中。反应持续几小时并且由 TLC 监测 TGS 的生成以及 6-O-乙酰化 TGS 的消失。在 24h 最后，完成高至 98.3% 的去乙酰化。

然后过滤该物料并进行 TGS 分离。从过滤器滤饼中获得的酶用水冲洗并储存以再次使用。

实施例 4、利用填充到柱中、在 Eudragit RL100 上的固定化酯酶进行 6-O-乙酰基 TGS 的酶促去乙酰化反应

在一个实验中，将 12g 固定化酶填充到直径 2cm 且高 8cm 的玻璃柱。柱的入口连接到蠕动泵的输出端（delivery）且出口连接到含有 500ml 已中和的物料（具有 5g 6-O-乙酰基-）的烧瓶。蠕动泵的入口也连接到该已中和的物料。已中和的物料以 5ml/min 的流速通过固定化的酯酶床循环 6 小时。

每隔一小时进行 TLC 以观察烧瓶中发生的去乙酰化反应的程度。6 小时后，观察到高于 98% 的去乙酰化。

6-O-乙酰基-TGS 去乙酰化为 TGS 完成后，固定化酶的床用去离子水冲洗并在 10% 丙酮水溶液下储存直到再次使用。

实施例 5、利用 Alcalase –一种蛋白水解酶进行 6-O-乙酰基 TGS 的酶促去乙酰化反应

将 1.0L 含有 10g 6-O-乙酰化 TGS 的、氯化后的已中和物料进行酶促反应。用水将该已中和的反应物料稀释至 3.0L。在 25~30°C 温度下，将从 Novozymes 市售获得的衍生自 *B. lichenformis* 的 200ml Alcalase 2.4L 酶加入到反应物中。反应持续几小时并且由 TLC 监测 TGS 的生成以及 6-O-乙酰化 TGS 的消失。在 36h 最后，完成高至 96.4%的去乙酰化。去乙酰化后，使用适宜的方法将该物料进行 TGS 分离。

1、一种生产氯化蔗糖化合物的方法，其中利用能够除去保护基团的酶的作用使在溶液中的 6-O-保护的蔗糖的氯化衍生物去保护。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中：

a、所述 6-O-保护的蔗糖包括蔗糖-6-乙酸酯、蔗糖-6-苯甲酸酯、蔗糖-6-丙酸酯、蔗糖-6-月桂酸酯、蔗糖-6-戊二酸酯、蔗糖-6-棕榈酸酯等的一种或多种，

b、所述溶液包括一纯的氯化的 6-O-保护的蔗糖溶液，或 (ii) 一在生产氯化蔗糖化合物的方法中获得的工艺液流。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其中：

a、所述工艺液流包括一种或多种生产氯化蔗糖的方法，包括氯化蔗糖的方法或氯化 6-O-保护的蔗糖衍生物的方法，和

b、所述氯化蔗糖化合物包括一种或多种的氯化蔗糖，包括三氯半乳蔗糖、二氯半乳蔗糖、四氯半乳蔗糖等。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其中所述氯化的方法包括将蔗糖衍生物与一种或多种氯化试剂利用下述一种或多种方法反应，包括：

a、溶解在吡啶中的 6-O-保护的蔗糖与磺酰氯的反应，或

b、在三苯基膦和 1,1,2-三氯乙烷存在下，6-O-保护的蔗糖与亚硫酸氯的反应，或

c、包括蔗糖-6-酯分 6-O-保护的蔗糖-6-酯与通式为 $[\text{HCIC}=\text{N}^+\text{R}_2]\text{Cl}^-$ 或 $[\text{HPOCl}_2\text{OC}^+=\text{N}^+\text{R}_2]\text{Cl}^-$ 的 Vilsmeier 试剂反应，其中 R 表示烷基，优选甲基或乙基。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其中能够除去保护基团的酶的作用是获得自酯酶或蛋白酶。

6、根据权利要求 5 所述方法，其中所述酯酶或蛋白酶是自由的或固定化的酶。

7、根据权利要求 6 所述的方法，包括步骤：

a、将在 (i) 一溶液或 (ii) 一生产氯化蔗糖的反应中获得的工艺液流中含有的蔗糖-6-乙酸酯用氯化试剂氯化，所述氯化试剂选自由 Vilsmeier 试剂、

磺酰氯或亚硫酸氯组成的组，

b、调节本权利要求步骤(a)的工艺液流的pH至大约6.5~7，

c、将步骤(a)的工艺液流中形成的6-O-保护的TGS去乙酰化，其
(i) 通过将其与自由的或固定化的酯酶、或者自由的或固定化的蛋白酶接触，优选伴随着在反应容器中震荡或者利用通过填充到柱中的酶床再循环，优选在大约25~30℃的环境温度足够时间以完成最大可能大约95%的去乙酰化，

d、从本权利要求步骤(c)的工艺液流的一种或多种不想要的组分中分离TGS。