



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117106806 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 24

(21) 申请号 202311053565.1

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2023.08.21

C12P 33/02 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 湖北共同笛体药物研究院有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道858号九龙生物产业基
地医药园研发区C6栋一、三、四、五层
(自贸区武汉片区)

(72) 发明人 赵沁沁 邹振东 邹成 系祖斌
李明磊 姚立成

(74) 专利代理机构 武汉红观专利代理事务所
(普通合伙) 42247

专利代理师 赵志汝

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

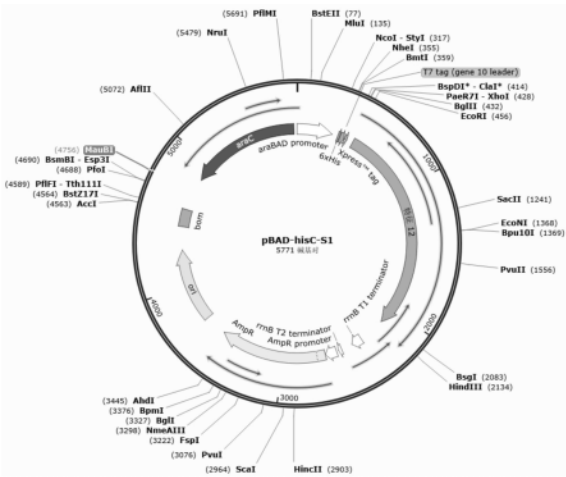
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制
备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,包括如下步骤:步骤1,构建S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶:构建含有S1基因的重组质粒pBAD-hisC-S1,S1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;将阳性克隆的重组质粒pBAD-hisC-S1转入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液转接于培养基中,诱导表达S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶;步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:将雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮溶于tris-HCl缓冲液和异丙醇中,加入5-甲基吩嗪硫酸甲酯和步骤1得到的含有S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶的菌泥,在20-30℃,200rpm条件下转化60-90h,得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。本发明构建的S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶可高效转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮生成雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮转化率可达98.1%。



1. 一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

步骤1,构建S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶:构建含有S1基因的重组质粒pBAD-hisC-S1, S1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;将阳性克隆的重组质粒pBAD-hisC-S1转入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液转接于培养基中,诱导表达S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶;

步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:将雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮溶于tris-HCl缓冲液和异丙醇中,加入5-甲基吩嗪硫酸甲酯和步骤1得到的含有S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶菌泥,在20-30℃,200-300rpm条件下转化60-90h,得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。

2. 如权利要求1所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:步骤1诱导表达方法为:将菌液划线于含有氨苄青霉素的LB培养基上筛选阳性转化子,然后将阳性转化子接入含有氨苄青霉素的试管培养基中,并于35-37℃,过夜培养,将阳性转化子菌液接种于发酵培养基中,在35-37℃、200-400r/min条件下扩大培养3-5h,然后添加L-阿拉伯糖诱导表达。

3. 如权利要求2所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:L-阿拉伯糖浓度为1-4mg/mL,溶剂为水,诱导表达条件为20-37℃、200-300r/min,诱导时间18-25h。

4. 如权利要求2所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:阳性转化子菌液的接种量为10%-13%。

5. 如权利要求2所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:每100mL培养基中添加100-150μL 100mg/ml的氨苄青霉素。

6. 如权利要求2所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:所述发酵培养基的组分为:甘油5-8g/L,酵母浸粉22-26g/L,蛋白胨15-20g/L,磷酸二氢钾1-4g/L,磷酸氢二钾15-20g/L,消泡剂0.3-1g/L,溶剂为水。

7. 如权利要求2所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:扩大培养结束后,检测OD值,当OD₆₀₀值为18-22时,降温至20℃继续培养至OD值至25时,开始诱导表达。

8. 如权利要求1所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:步骤1重组质粒pBAD-hisC-S1构建方法为:PCR扩增S1基因,用EcoRI内切酶将pBAD-hisC载体线性化,通过无缝克隆连接,构建得到pBAD-hisC-S1质粒。

9. 如权利要求8所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:PCR扩增引物包括上游引物和下游引物,上游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,下游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

10. 如权利要求1所述的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在于:步骤2中,转化反应体系中,雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮浓度为20-30g/L,5-甲基吩嗪硫酸甲酯浓度为0.2-0.4g/L,S1-pBAD-hisC-TOP10菌泥浓度为40-50g/L,异丙醇浓度为50-80mL/L,余量为pH8.0的tris-HCl缓冲液。

一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及脱氢酶技术领域,尤其涉及一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法。

背景技术

[0002] 甾体化合物即类固醇化合物,是一类结构特殊的天然产物,其分子母体结构中均含有环戊烷多氢菲碳骨架,其骨架被称为甾核,其由3个六元环和1个五元环组成,分别称为A、B、C、D环。甾核上取代基的种类和取代位点的不同决定了不同甾体化合物在性质和功能上的巨大差异。微生物转化甾体化合物的反应种类较多,目前较为重要的有甾体化合物的侧链降解、羟基化反应和脱氢反应等。其中,甾体化合物的脱氢反应是一些重要甾体药物中间体生产的关键反应。甾体化合物C1,2位双键的引入,使得药物的抗炎活性增强,以及水钠潴留等副作用降低。

[0003] 专利号为CN104328159A的发明专利公开了1,4,9(11)-三烯雄甾-3,17-二酮的制备方法,该反应以化合物I9 α -OH-4AD为起始原料经过消除反应、发酵转化得到,该方法以生物法结合化学法制得,步骤繁琐且转化率偏低。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提出了一种转化效率高,一步法制备雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的方法。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:本发明提供了一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法,包括如下步骤:

[0006] 步骤1,构建S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶:构建含有S1基因的重组质粒pBAD-hisC-S1,S1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;将阳性克隆的重组质粒pBAD-hisC-S1转入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液转接于培养基中,诱导表达S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶;

[0007] 步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:将雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮溶于tris-HCl缓冲液和异丙醇中,加入5-甲基吩嗪硫酸甲酯和步骤1得到的含有S1-pBAD-hisC-TOP10脱氢酶的菌泥,在20-30℃,200-300rpm条件下转化60-90h,得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。

[0008] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤1诱导表达方法为:将菌液划线于含有氨苄青霉素的LB培养基上筛选阳性转化子,然后将阳性转化子接入含有氨苄青霉素的试管培养基中,并于35-37℃,过夜培养,将阳性转化子菌液接种于发酵培养基中,在35-37℃、200-400r/min条件下扩大培养3-5h,然后添加L-阿拉伯糖诱导表达。

[0009] 在以上技术方案的基础上,优选的,L-阿拉伯糖浓度为1-4mg/mL,溶剂为水,诱导表达条件为20-37℃、200-300r/min,诱导时间18-25h。

[0010] 在以上技术方案的基础上,优选的,阳性转化子菌液的接种量为10%-13%。

[0011] 在以上技术方案的基础上,优选的,每100mL培养基中添加100-150 μ L100mg/ml的

氨苄青霉素。

[0012] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述发酵培养基的组分为:甘油5-8g/L,酵母浸粉22-26g/L,蛋白胨15-20g/L,磷酸二氢钾1-4g/L,磷酸氢二钾15-20g/L,消泡剂0.3-1g/L,溶剂为水。

[0013] 在以上技术方案的基础上,优选的,扩大培养结束后,检测OD值,当OD₆₀₀值为18-22时,降温至20℃继续培养至OD值至25时,开始诱导表达。

[0014] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤1重组质粒pBAD-hisC-S1构建方法为:PCR扩增S1基因,用EcoRI内切酶将pBAD-hisC载体线性化,通过无缝克隆连接,构建得到pBAD-hisC-S1质粒。

[0015] 在以上技术方案的基础上,优选的,PCR扩增引物包括上游引物和下游引物,上游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,下游引物核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0016] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤2中,转化反应体系中,雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮浓度为20-30g/L,5-甲基吩嗪硫酸甲酯浓度为0.2-0.4g/L,S1-pBAD-hisC-TOP10菌泥的浓度为40-50g/L,异丙醇浓度为50-80mL/L,余量为pH8.0的tris-HCl缓冲液。

[0017] 本发明的一种雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法相对于现有技术具有以下有益效果:

[0018] (1) 本发明通过PCR技术获得甾体C1,2脱氢酶基因,通过无缝克隆技术克隆入pBAD载体中,构建大肠杆菌工程菌株,该菌种可高效转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮生成雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮转化60-90h,转化率可达97.8%-99.1%。

[0019] (2) 本发明经L-阿拉伯糖诱导表达,经SDS-PAGE检测,表达产物全部存在于上清中,实现了该脱氢酶的可溶性表达。

[0020] (3) 本发明经表达条件诱导时间和L-阿拉伯糖浓度的优化,该菌株的酶活较原始菌株最高提高了16.22%,最佳诱导温度为24℃,最佳L-阿拉伯糖浓度为1mg/mL。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0022] 图1为实施例1构建的重组质粒pBAD-hisC-S1示意图;

[0023] 图2对比例1脱氢酶的琼脂糖凝胶电泳图;

[0024] 图3为实施例1脱氢酶的SDS-PAGE凝胶电泳图;图中M:Protein Marker;1:S1上清;2:S1沉淀;3:S1菌液;4:未诱导的S3上清;5:未诱导的S3沉淀;6:未诱导的S3菌液;7:S3上清;8:S3沉淀;9:S3菌液;

[0025] 图4为24℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白表达图;

[0026] 图5为20℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白表达图;

[0027] 图6为37℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白表达图;

[0028] 图4-6中,M:ProteinMarker;1-2:S1沉淀;3-4:S1上清;5-6:S3沉淀;7-8:S3上清。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施方式,对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施方式仅仅是本发明一部分实施方式,而不是全部的实施方式。基于本发明中的实施方式,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式,都属于本发明保护的范围。

[0030] 实施例1

[0031] 本实施例的雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法包括如下步骤:

[0032] 步骤1,甾体C1,2脱氢酶(S1-pBAD-hisC-TOP10)克隆与表达

[0033] 根据S1基因(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示)及pBAD-hisC载体序列设计无缝克隆引物,正向引物:5'-CAGATGGTACCATATGGGGTAACCGATCA GAAT-3'(如SEQ ID NO.2所示),反向引物:5'-CAAAACAGCCAAGCTTCGTTA TGTATGACCTGCT-3'(如SEQ ID NO.3所示)。PCR反应体系:5×PrimeSTAR GXL Buffer 10μL,dNTP Mixture(2.5mM each)4μL,正、反向引物(100 μmol/L)各0.1μL,模板1μL,PrimeSTAR GXL DNAPolymerase 1μL,灭菌水33.8μL。反应体系:进行扩增,PCR反应条件:98℃预变性30s;98℃变性5s,55℃退火15s,72℃延伸2min,30个循环;72℃延伸5min。

[0034] 通过PCR扩增得到S1基因,用EcoRI限制性内切酶将pBAD-hisC载体线性化,用无缝克隆试剂盒进行无缝克隆,然后将反应产物转化DH5α感受态细胞,涂布在含有100mg/L的氨苄抗性平板上,于37℃过夜培养。挑取阳性克隆测序验证并保存。

[0035] 提取阳性克隆中的质粒,转化入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液涂布于含有100mg/L氨苄青霉素的LB平板培养基上筛选阳性转化子,将阳性转化子接入试管中于37℃,过夜培养;将阳性转化子菌液按10%接种量转接在250mL锥形瓶中,装100mL发酵培养基扩大培养,在37℃、200r/min条件下扩大培养3h。发酵培养基的组分为:甘油5g/L,酵母浸粉22g/L,蛋白胨15g/L,磷酸二氢钾1g/L,磷酸氢二钾15g/L,消泡剂(201A)0.3g/L,溶剂为水。

[0036] 扩大培养结束后,检测OD值,当OD600值为20时,降温至20℃继续培养至OD值至25时,添加1mg/mL L-阿拉伯糖水溶液,在24℃、200r/min条件下,诱导表达20h。每100mL培养基中添加100μL 100mg/ml的氨苄青霉素。

[0037] 步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:先加1g雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮,用适量pH8.0 Tris-HCL混匀,再加2g S1-pBAD-hisC-TOP10菌泥,0.01g 5-甲基吩噻唑硫酸甲酯、2.5mL异丙醇,最后用Tris-HCL定容至50mL。然后在30℃,200rpm条件下转化60h得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。取样1mL,沸水浴10min检测HPLC。

[0038] 实施例2

[0039] 本实施例的雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法包括如下步骤:

[0040] 步骤1,甾体C1,2脱氢酶(S1-pBAD-hisC-TOP10)克隆与表达

[0041] 根据S1基因(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示)及pBAD-hisC载体序列设计无缝克隆引物,正向引物:5'-CAGATGGTACCATATGGGGTAACCGATCA GAAT-3'(如SEQ ID NO.2所示),反向引物:5'-CAAAACAGCCAAGCTTCGTTA TGTATGACCTGCT-3'(如SEQ ID NO.3所示)。PCR反应体系:5×PrimeSTAR GXL Buffer 10μL,dNTP Mixture(2.5mM each)4μL,正、反向引物(100 μmol/L)各0.1μL,模板1μL,PrimeSTAR GXL DNAPolymerase 1μL,灭菌水33.8μL。反应体系:进行扩增,PCR反应条件:98℃预变性30s;98℃变性5s,55℃退火15s,72℃延伸2min,30个循

环;72℃延伸5min。

[0042] 通过PCR扩增得到S1基因,用EcoRI限制性内切酶将pBAD-hisC载体线性化,用无缝克隆试剂盒进行无缝克隆,然后将反应产物转化DH5 α 感受态细胞,涂布在含有100mg/L的氨苄抗性平板上,于37℃过夜培养。挑取阳性克隆测序验证并保存。

[0043] 提取阳性克隆中的质粒,转化入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液涂布于含有100mg/L氨苄青霉素的LB平板培养基上筛选阳性转化子,将阳性转化子接入试管中于37℃,过夜培养;将阳性转化子菌液按12%接种量转接在250mL锥形瓶中,装100mL发酵培养基扩大培养,在35℃、300r/min条件下扩大培养4h。发酵培养基的组分为:甘油6g/L,酵母浸粉24g/L,蛋白胨18g/L,磷酸二氢钾2g/L,磷酸氢二钾18g/L,消泡剂(201A)0.5g/L,溶剂为水。

[0044] 扩大培养结束后,检测OD值,当OD₆₀₀值为18时,降温至20℃继续培养至OD值至25时,添加2mg/mL L-阿拉伯糖水溶液,在26℃、200-300r/min条件下,诱导表达18h。每100mL培养基中添加120 μ L 100mg/ml的氨苄青霉素。

[0045] 步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:先加1.2g雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮,用适量pH8.0 Tris-HCL混匀,再加2.2g S1-pBAD-hisC-TOP10菌泥,0.015g 5-甲基吩嗪硫酸甲酯、3mL异丙醇,最后用Tris-HCL定容至50mL。然后在20℃,200rpm条件下转化75h得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。取样1mL,沸水浴10min检测HPLC。

[0046] 实施例3

[0047] 本实施例的雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮的制备方法包括如下步骤:

[0048] 步骤1,甾体C1,2脱氢酶(S1-pBAD-hisC-TOP10)克隆与表达

[0049] 根据S1基因(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示)及pBAD-hisC载体序列设计无缝克隆引物,正向引物:5'-CAGATGGTACCATATGGGGTAACCGATCA GAAT-3'(如SEQ ID NO.2所示),反向引物:5'-CAAAACAGCCAAGCTTCGTTA TGTATGACCTGCT-3'(如SEQ ID NO.3所示)。PCR反应体系:5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 10 μ L,dNTP Mixture(2.5mM each)4 μ L,正、反向引物(100 μ mol/L)各0.1 μ L,模板1 μ L,PrimeSTAR GXL DNAPolymerase 1 μ L,灭菌水33.8 μ L。反应体系:进行扩增,PCR反应条件:98℃预变性30s;98℃变性5s,55℃退火15s,72℃延伸2min,30个循环;72℃延伸5min。

[0050] 通过PCR扩增得到S1基因,用EcoRI限制性内切酶将pBAD-hisC载体线性化,用无缝克隆试剂盒进行无缝克隆,然后将反应产物转化DH5 α 感受态细胞,涂布在含有100mg/L的氨苄抗性平板上,于37℃过夜培养。挑取阳性克隆测序验证并保存。

[0051] 提取阳性克隆中的质粒,转化入大肠杆菌TOP10中,获得菌种;将菌液涂布于含有100mg/L氨苄青霉素的LB平板培养基上筛选阳性转化子,将阳性转化子接入试管中于37℃,过夜培养;将阳性转化子菌液按13%接种量转接在250mL锥形瓶中,装100mL发酵培养基扩大培养,在36℃、400r/min条件下扩大培养5h。发酵培养基的组分为:甘油8g/L,酵母浸粉26g/L,蛋白胨20g/L,磷酸二氢钾4g/L,磷酸氢二钾20g/L,消泡剂(201A)1g/L,溶剂为水。

[0052] 扩大培养结束后,检测OD值,当OD₆₀₀值为22时,降温至20℃继续培养至OD值至25时,添加4mg/mL L-阿拉伯糖水溶液,在22℃、300r/min条件下,诱导表达25h。每100mL培养基中添加150 μ L 100mg/ml的氨苄青霉素。

[0053] 步骤2,转化雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮:先加1.5g雄甾-4,19(11)-二烯-3,17-二酮,用适量pH8.0 Tris-HCL混匀,再加2.5g S1-pBAD-hisC-TOP10菌泥,0.02g 5-甲基

吩嗪硫酸甲酯、4mL异丙醇,最后用Tris-HCl定容至50mL。然后在25℃,200rpm条件下转化90h得到雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮。取样1mL,沸水浴10min检测HPLC。

[0054] 对比例1

[0055] 对比例1与实施例1的区别是载体为pet28a,其他内容相同。

[0056] 对比例2

[0057] 对比例2与实施例1的区别是诱导剂为IPTG,其他内容相同。

[0058] 检测载体不同对酶的表达量的影响:经诱导表达获得的菌液于8000r/min离心5min取下层沉淀,加入30mL浓度为50mmol/L的Tris-HCl (pH 8.0) 重悬。超声波处理酶液的参考系数为:每次处理的菌悬液为30mL,输出功率552.5W,间歇时间5s,工作时间5s,全部时间30min。用Bradford ProteinAssay Kit测定上清和沉淀中的蛋白,SDS-PAGE分析全菌、上清和沉淀中蛋白表达情况。对比例1脱氢酶的SDS-PAGE琼脂糖凝胶电泳图见图2,图2可知:以pet28a-S1为载体模板,PCR扩增得到目的片段,通过琼脂糖凝胶电泳检测,其片段全长为1671bp。图1为实施例1的重组质粒pBAD-hisC-S1示意图,全长5771bp,分子量大。

[0059] 表1实施例1和对比例1中S1及S3的蛋白分布

样品	目的蛋白含量 (mg/g菌泥)
S1上清 (对比例1)	0.6525
S1沉淀 (对比例1)	1.5975
S2上清 (对比例2)	0.4875
S2沉淀 (对比例2)	0.1304
S3上清 (未诱导)	0
S3沉淀 (未诱导)	0
S3上清 (实施例1)	0.5325
S3沉淀 (实施例1)	0

[0061] 表1和图3所示,S1的目的蛋白分布于上清和沉淀中,S2的目的蛋白主要分布于上清液中,少量分布于沉淀中;S3的目的蛋白基本在上清中,沉淀中没有,结果同图1。表明pBAD-hisC载体制得的脱氢酶的蛋白均存在于上清中,实现了该脱氢酶的可溶性表达,有利于后期转化。

[0062] 对比例3

[0063] 对比例3与实施例1的区别是转化时间不同,转化时间分别设为24h、48h。对比结果见表2。

[0064] HPLC检测:样品前处理,称取样品约2-4mg,置于10mL的容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀即得。对照品的配制:同上法制得。采用高效液相色谱(现行中国药典)进行测定转化量,并计算转化率。

[0065] 表2转化率

转化时间 (h)	转化率 (%)
实施例1 (60)	97.8
实施例2 (75)	98.5
实施例3 (90)	99.1
对比例1 (60)	85.3

对比例2(24)	62.2
对比例2(48)	90.3

[0067] 表2可知,本发明的脱氢酶转化60h时可以达到97.3%的转化率,现有技术接种量20%的基础上,转化率仅为92%。由此证明,本申请具有接种量少、转化率高,生产成本低优点。

[0068] 对比例4

[0069] 对比例4与实施例1的区别是诱导温度和L-阿拉伯糖的浓度不同,对比结果见表3。S1表示对照,以对比例1为对照,培养条件为37℃下培养3h后,在37℃下诱导20h。S3:20℃-1表示实施例1,诱导温度为20℃,L-阿拉伯糖浓度为1mg/ml。

[0070] 表3不同诱导条件下的催化酶的酶活

样品	酶活U	样品	酶活U
S1	4.87	S1	4.87
S3:20℃-1	2.71	S3:28℃-1	2.41
S3:20℃-2	3.95	S3:28℃-2	3.97
S3:20℃-3	2.56	S3:28℃-3	4.59
S3:20℃-4	3.47	S3:28℃-4	3.48
实施例1(24℃-1)	5.66	S3:37℃-1	0
S3:24℃-2	4.95	S3:37℃-2	0
S3:24℃-3	5.21	S3:37℃-3	0
S3:24℃-4	4.91	S3:37℃-4	0
实施例2(26℃-2)	5.12	实施例3(22℃-4)	5.45

[0072] 表3可知,实施例1-3诱导条件下的酶活均高于对比例和对照,其中L-阿拉伯糖浓度为1mg/ml,诱导温度24℃的酶活最高,较原始菌株最高提高了16.22%。诱导温度低于22℃或高于26℃,酶活均有所降低,影响后期转化效率。

[0073] 图4可知,24℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白主要表达在上清中;S1蛋白分布于上清和沉淀中。图5可知,20℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白表达在上清中,S1蛋白分布于上清和沉淀中。图6可知,37℃下1mg/ml L-阿拉伯糖诱导后的S3蛋白主要表达在沉淀中,上清中有部分,跟S1情况差不多。由此表面,诱导温度和L-阿拉伯糖共同影响酶活以及酶的可溶性表达。

[0074] 以上所述仅为本发明的较佳实施方式而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

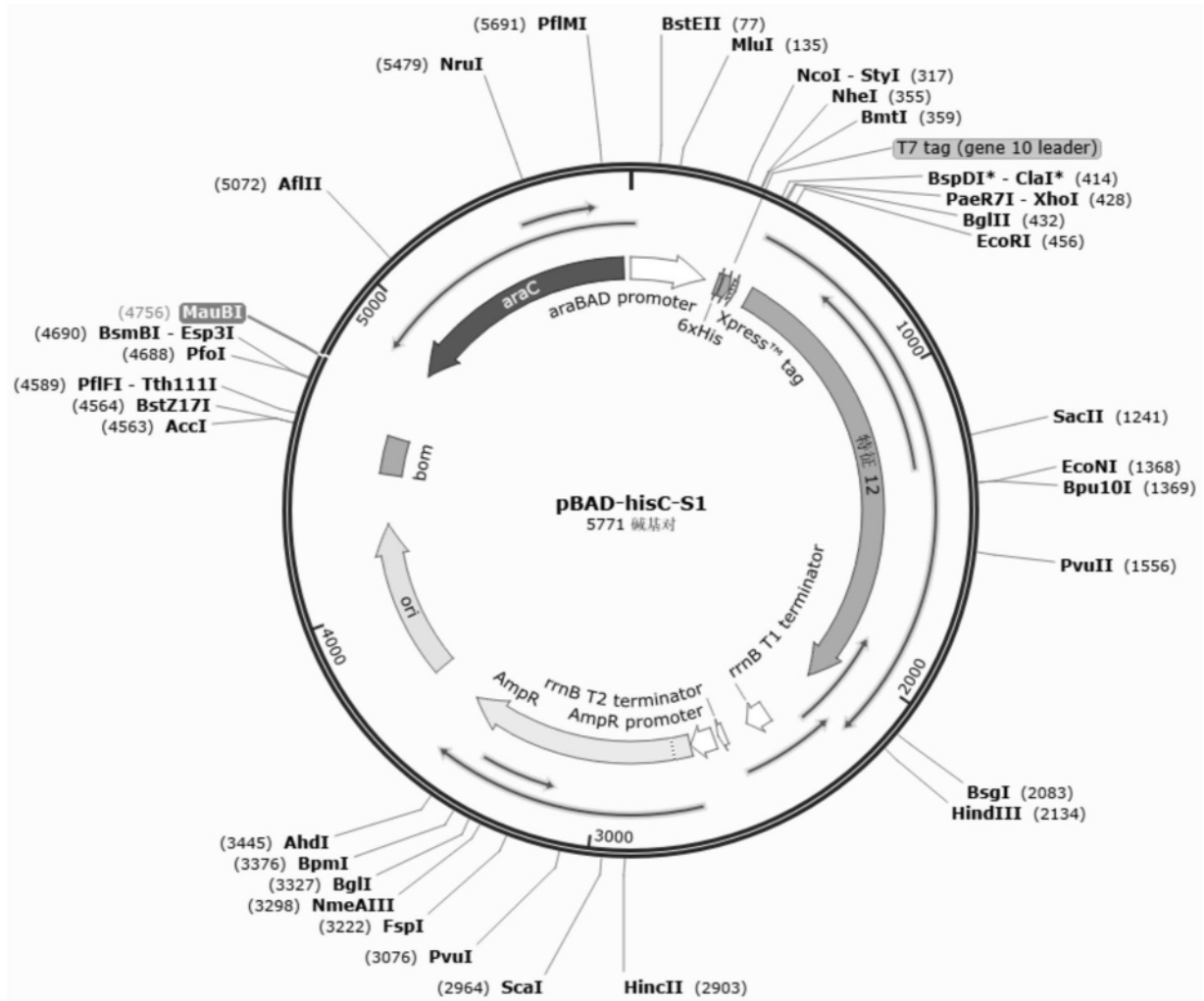


图1

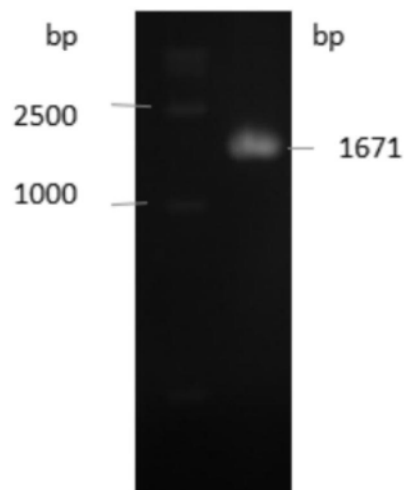


图2

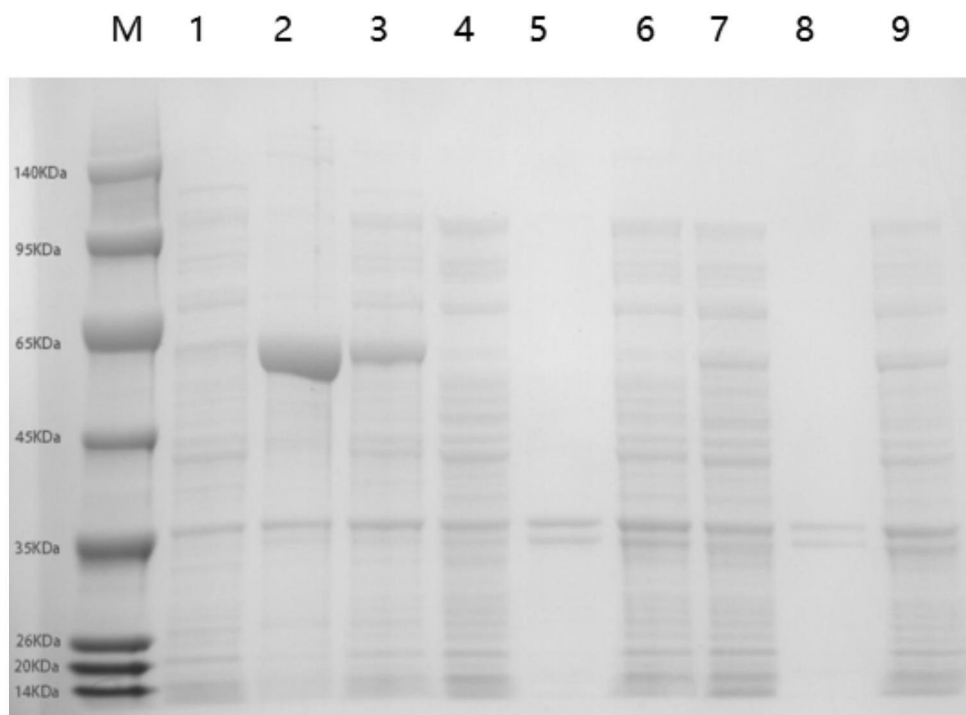


图3

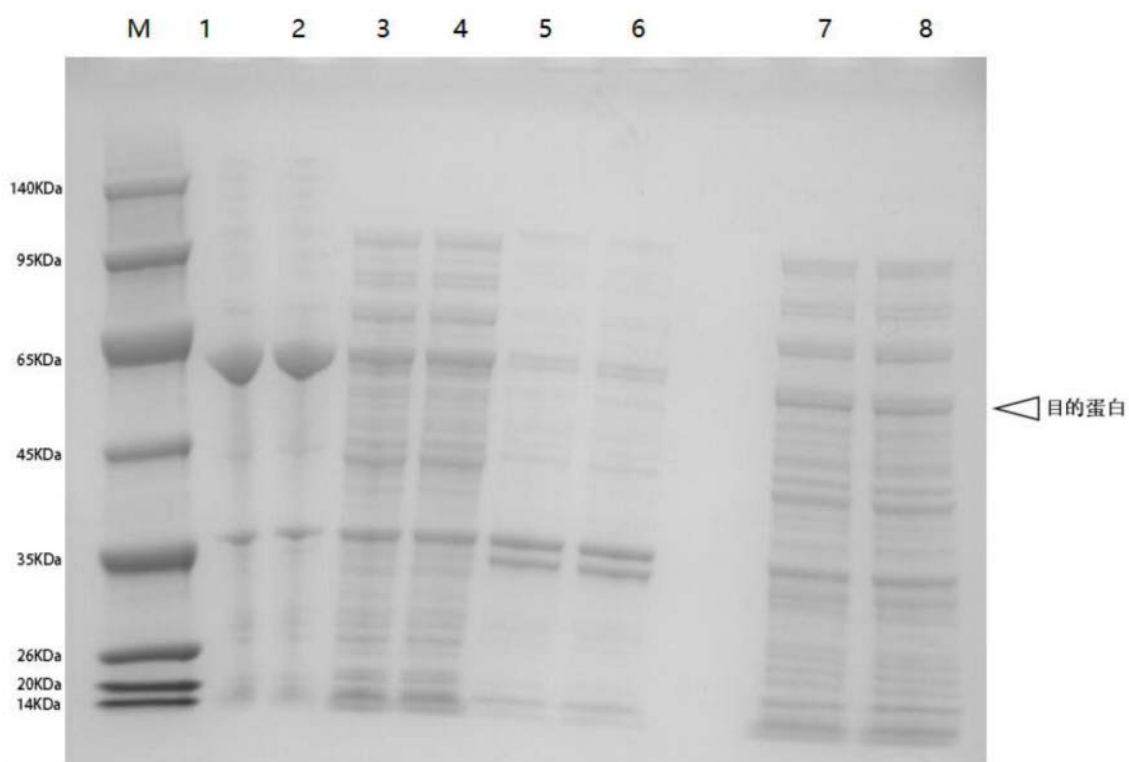


图4

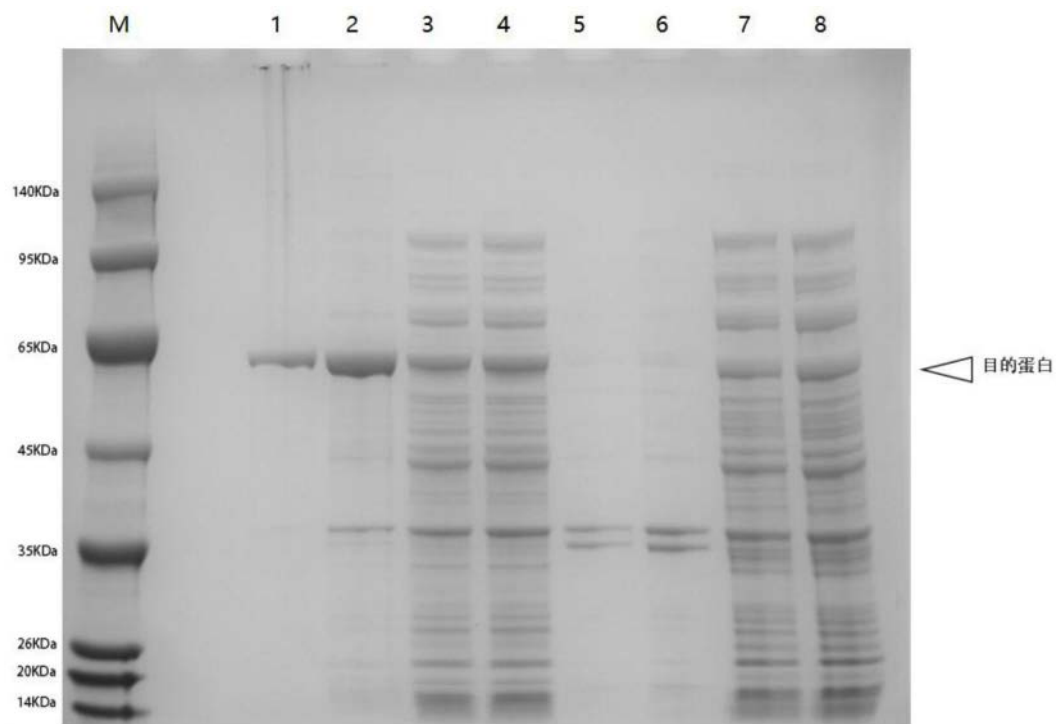


图5

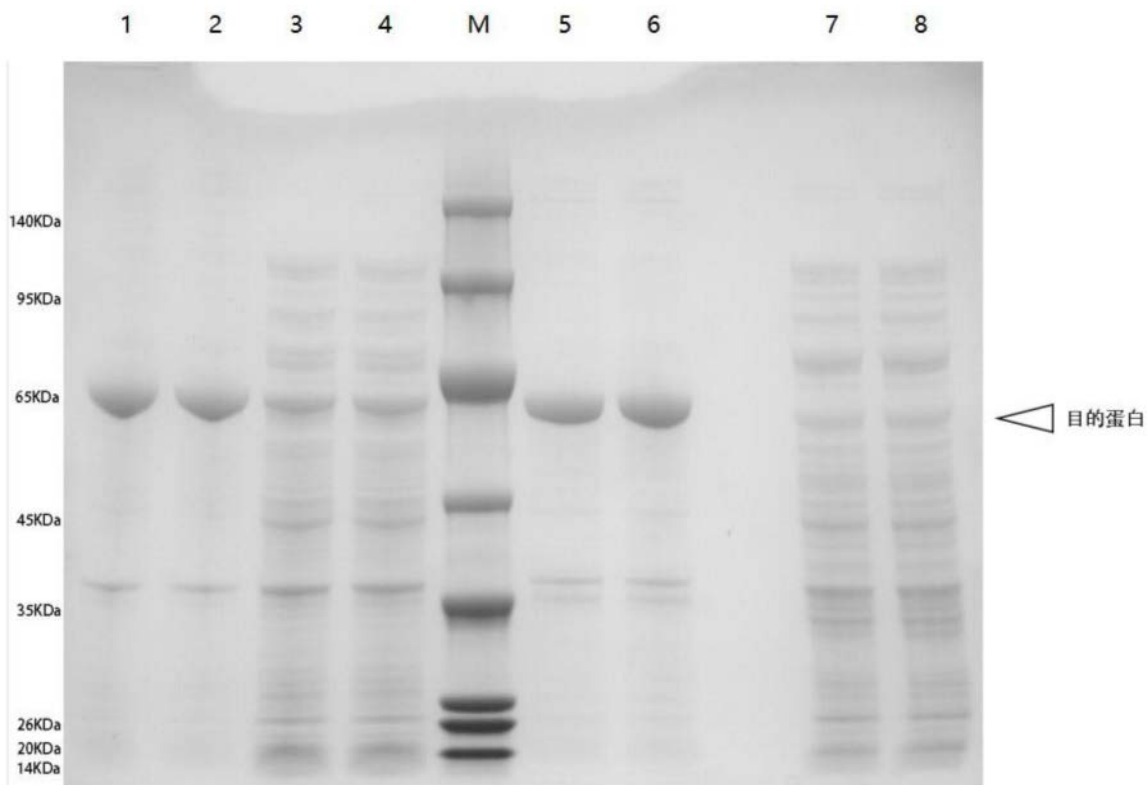


图6