



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117844894 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202410045001.1

C12N 15/53 (2006.01)

(22) 申请日 2024.01.11

C12N 15/54 (2006.01)

(71) 申请人 湖北共同笛体药物研究院有限公司

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

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 宋龙祥 夏克江 邹振东 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.

C12P 33/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

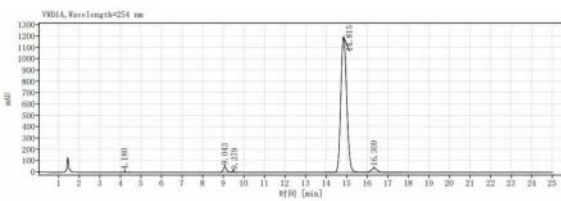
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种醋酸泼尼松的制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种醋酸泼尼松的制备方法,包括如下步骤:S1,扩增谷胱甘肽硫转移酶蛋白基因和3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶KstD基因得到核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的GTS-KSTD融合蛋白;S2,构建pET28a-GTS-KstD质粒,并将其转化至大肠杆菌BL21中,获得重组菌;重组菌发酵培养,离心后得到重组菌菌泥;S3,醋酸可的松乳化后,加入PMS和步骤S2的重组菌菌泥,转化16-24h得到醋酸泼尼松。本发明的重组脱氢酶可利用细胞本身的FAD辅酶再生体系,无需添加外源性的辅酶FAD;同时也提高了3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶KstD转化醋酸泼尼松的效率。



1. 一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

S1,扩增谷胱甘肽硫转移酶蛋白基因和3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶KstD基因,得到核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的GTS-KSTD融合蛋白;

S2,构建pET28a-GTS-KstD质粒,并将其转化至大肠杆菌BL21中,获得重组菌,重组菌发酵培养,离心后得到重组菌菌泥;

S3,醋酸可的松乳化后,加入PMS和步骤S2的重组菌菌泥,转化16-24h得到醋酸泼尼松。

2. 如权利要求1所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:步骤S3中所述醋酸可的松:重组菌菌体的质量比为(1-3):1。

3. 如权利要求1所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:步骤S3中转化反应条件为:25-35℃,200-400r/min,通气量0.3-0.8vvm,压力0.01-0.1MPa。

4. 如权利要求1所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:步骤S2中重组菌发酵培养方法为:重组菌二级培养后接种于含有卡那霉素的发酵培养基中,在35-37℃、600-800r/min、通气量2-3vvm条件下发酵培养,当D0值达到50%-60%时添加补料培养基、培养至菌液OD<sub>600</sub>值30-80时,加入IPTG诱导表达12-18h后离心,获得发酵重组菌;转化反应时加入发酵重组菌菌体。

5. 如权利要求4所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:所述IPTG的终浓度为0.5-1.0mmol/L。

6. 如权利要求4所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:加入IPTG和甘氨酸共同诱导12-18h。

7. 如权利要求6所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:甘氨酸的终浓度为0.3-0.5mmol/L。

8. 如权利要求1所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:步骤S3中,将醋酸可的松乳化时加入助溶剂,并在8000-12000r/min条件下匀浆10-15min得到乳化后醋酸可的松。

9. 如权利要求8所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:所述助溶剂为吐温80、甲醇、乙醇、丙酮和二甲基亚砜中的一种或多种组合。

10. 如权利要求8所述的一种醋酸泼尼松的制备方法,其特征在于:所述助溶剂的体积浓度为1%-10%。

## 一种醋酸泼尼松的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物制药及医药化工技术领域,尤其涉及一种醋酸泼尼松的制备方法。

### 背景技术

[0002] 甾体类药物是仅次于抗生素的世界第二大类药物,不同甾体药物均由甾体激素中间体衍生而来。甾体激素具有很强的抗感染、抗过敏、抗病毒和抗休克的药理作用,主要用于严重细菌感染、急性淋巴白血病、风湿病、红斑狼疮、细胞性脑炎、皮肤病、抗肿瘤和抢救危重病人的重要用药。

[0003] 醋酸泼尼松(分子式 $C_{23}H_{28}O_6$ ,化学名为:17 $\alpha$ ,21-二羟基孕甾-1,4-二烯-3,11,20-三酮-21-醋酸酯)白色或几乎白色结晶性粉末,无臭,味苦;不溶于水,微溶于甲醇、醋酸乙酯,略溶于丙酮,易溶于氯仿。醋酸泼尼松是一类重要的肾上腺皮质激素类药,适用于各种急性严重细菌感染,严重过敏性疾病,胶原性疾病(红斑狼疮、结节性动脉周围炎等),风湿病、类风湿性关节炎、肾病综合征,严重支气管哮喘、血小板减少性紫癜、粒细胞减少症、急性淋巴性白血病、各种肾上腺皮质功能不全症、剥脱性皮炎、天疱疮、神经性皮炎、湿疹等。

[0004] 专利号为CN111485011A的发明专利公开了一种醋酸泼尼松的合成方法,该方法需要额外添加黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)外源性的辅酶作为氢受体,来破碎细胞,释放大量的蛋白,提高产物的收率;且该方法所用的酶转化率低,24h转化率仅为81.2%。为此需要一种无需额外添加FAD且转化醋酸泼尼松效率高的方法。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提出了一种无需FAD,且转化率高的制备醋酸泼尼松生产方法。

[0006] 本发明的技术方案是这样实现的:本发明提供了一种醋酸泼尼松的制备方法,包括如下步骤:

[0007] S1,扩增谷胱甘肽硫转移酶蛋白基因和3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶KstD基因,得到核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的GTS-KSTD融合蛋白;

[0008] S2,构建pET28a-GTS-KstD质粒,并将其转化至大肠杆菌BL21中,获得重组菌;重组菌发酵培养,离心后得到重组菌菌泥;

[0009] S3,醋酸可的松乳化后,加入PMS和步骤S2的重组菌菌泥,转化16-24h得到醋酸泼尼松。

[0010] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤S3中所述醋酸可的松:重组菌菌体的质量比为(1-3):1。

[0011] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤S3中转化反应条件为:25-35 $^{\circ}C$ ,200-400r/min,通气量0.3-0.8vvm,压力0.01-0.1MPa。

[0012] 在以上技术方案的基础上,优选的,重组菌发酵培养的方法为:重组菌二级培养后

接种于含有卡那霉素的发酵培养基中,在35-37℃、600-800r/min、通气量2-3vvm条件下发酵培养,当OD值达到50%-60%时添加补料培养基、培养至菌液OD<sub>600</sub>值30-80时,加入IPTG诱导表达12-18h后离心,获得发酵重组菌;转化反应时加入发酵重组菌菌体。

[0013] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述IPTG的终浓度为0.5-1.0mmol/L。

[0014] 在以上技术方案的基础上,优选的,加入IPTG和甘氨酸共同诱导12-18h。

[0015] 在以上技术方案的基础上,优选的,甘氨酸的终浓度为0.3-0.5mmol/L。

[0016] 在以上技术方案的基础上,优选的,步骤S3中,步骤S3中,将醋酸可的松乳化时加入助溶剂,并在8000-12000r/min条件下匀浆10-15min得到乳化后醋酸可的松。

[0017] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述助溶剂为吐温80、甲醇、乙醇、丙酮和二甲基亚砷中的一种或多种组合。

[0018] 在以上技术方案的基础上,优选的,所述助溶剂的体积浓度为1%-10%。

[0019] 本发明的一种醋酸泼尼松的制备方法相对于现有技术具有以下有益效果:

[0020] (1) 本发明将谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因与3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶KstD进行融合表达,得到的重组脱氢酶,可利用细胞本身的FAD辅酶再生体系,无需添加外源性的辅酶FAD;此外GTS蛋白提高了3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶在大肠杆菌BL21中的溶解性,以及3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶在大肠杆菌BL21中的蛋白表达量,同时也提高了3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶KstD转化醋酸泼尼松的效率。

[0021] (2) 本发明在诱导表达时添加甘氨酸,可有效提高3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶在大肠杆菌BL21中的蛋白表达量,提高3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶KstD转化醋酸泼尼松的效率。(3) 本发明在醋酸可的松乳化时加入助溶剂,可以提高醋酸泼尼松的转化效率,其中助溶剂对醋酸泼尼松转化率促进效果为甲醇>乙醇>丙酮>吐温80>DMSO。

## 附图说明

[0022] 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。

[0023] 图1为本发明实施例1得到的反应液的高效液相色谱法峰谱图。

## 具体实施方式

[0024] 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。

[0025] 本发明中用到的培养基均为自己配置,ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,培养基配方如下:

[0026] 一级种子培养基为:酵母浸粉5g/L、胰蛋白胨10g/L、氯化钠10g/L、琼脂粉20g/L。

[0027] 二级种子培养基为:酵母浸粉5g/L、胰蛋白胨10g/L、氯化钠10g/L。

[0028] 发酵培养基为:葡萄糖20g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g/L、10X无机盐溶液100ml/L、硫胺

素溶液1ml/L、微量元素溶液1ml/L,121℃灭菌20min。

[0029] 补料培养基:葡萄糖600g/L、微量元素2ml/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  43g/L、硫胺素溶液10ml/L、甘氨酸100g/L。

[0030] 10X无机盐溶液: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  2g/L、 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.5g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  24g/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3g/L、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  31.5g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  15g/L、 $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.6 ml/L。

[0031] 硫胺素溶液:硫胺素盐酸盐5g/L。

[0032] 微量元素溶液: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.15g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  120 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75g/L、二水柠檬酸三钠10g/L、乙二胺四乙酸0.8g/L。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0035] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0036] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0037] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0038] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0039] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v)比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0040] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v)比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度35℃、转速600r/min、通气量2vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为50%时开始添加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为30时,降温至16℃,加入终浓度为0.5mmol/L IPTG进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达12h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0041] S3,醋酸可的松底物预处理:称取20g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液,利用高速匀浆机在8000r/min条件下乳化10min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0042] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入0.10g/L的PMS,在25℃、200r/min、通气量0.3vvm、罐

压0.01MPa条件下,转化16h。

#### [0043] 实施例2

[0044] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0045] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0046] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0047] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0048] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0049] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v)比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0050] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v)比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度35℃、转速600r/min、通气量2vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为50% %时开始流加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为30时,降温至16℃,加入终浓度为0.5mmol/L IPTG和0.3mmol/L甘氨酸进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达12h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0051] S3,醋酸可的松底物预处理:称取20g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液,利用高速匀浆机在8000r/min条件下乳化10min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0052] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入0.10g/L的PMS,在25℃、200r/min、通气量0.3vvm、罐压0.01MPa条件下,转化16h。

#### [0053] 实施例3

[0054] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0055] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0056] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0057] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0058] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0059] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v) 比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0060] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v) 比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度35℃、转速600r/min、通气量2vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为50%时开始流加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为30时,降温至16℃,加入终浓度为0.5mmol/L IPTG和0.3mmol/L甘氨酸进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达12h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0061] S3,醋酸可的松底物预处理:称取20g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液和体积浓度为1%的吐温80,利用高速匀浆机在8000r/min条件下乳化10min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0062] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入0.10g/L的PMS,在25℃、200r/min、通气量0.3vvm、罐压0.01MPa条件下,转化16h。

[0063] 实施例4

[0064] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0065] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0066] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0067] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0068] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培

培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0069] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v) 比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0070] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v) 比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度36℃、转速700r/min、通气量2.5vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为55%时开始流加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为50时,降温至16℃,加入终浓度为0.8mmol/L IPTG和0.4mmol/L甘氨酸进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达15h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0071] S3,醋酸可的松底物预处理:称取40g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液和体积浓度为3%的甲醇,利用高速匀浆机在9000r/min条件下乳化12min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0072] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入0.4g/L的PMS,在28℃、300r/min、通气量0.5vvm、罐压0.04MPa条件下,转化20h。

[0073] 实施例5

[0074] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0075] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0076] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0077] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0078] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0079] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v) 比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0080] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-



脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v) 比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度37℃、转速800r/min、通气量3vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为60%时开始流加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为70时,降温至16℃,加入终浓度为1mmol/L IPTG和0.5mmol/L甘氨酸进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达18h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0081] S3,醋酸可的松底物预处理:称取60g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液和体积浓度为10%的丙酮,利用高速匀浆机在12000r/min条件下乳化15min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0082] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入1.0g/L的PMS,在35℃、400r/min、通气量0.8vvm、罐压0.1MPa条件下,转化24h。

[0083] 实施例6

[0084] 本实施例的醋酸泼尼松的制备方法,包括以下步骤:

[0085] S1,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌构建:PCR扩增谷胱甘肽硫转移酶(GTS)蛋白基因和KstD基因,然后将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切,并将获得的GTS基因、KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD;将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。所述GTS-KSTD融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0086] S2,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度培养,包括菌种活化、种子培养和补料分批发酵。

[0087] S21,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌活化:从-80℃冰箱中取出重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌,用接种环接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB固体培养基中,在37℃恒温培养箱中培养16h,放到4℃冰箱中备用。

[0088] S22,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子制备:挑取活化后的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌单菌落,接种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB(Luria-Bertani)液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养12h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子液。

[0089] S23,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子制备:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌一级种子按照1% (v/v) 比例种于含有40ug/ml的卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃、240r/min恒温振荡培养箱中培养6h,获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子液。

[0090] S24,重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌高密度发酵:将制备好的重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌二级种子按照5% (v/v) 比例接种于卡那霉素的发酵培养基中,控制温度37℃、转速800r/min、通气量3vvm。当溶氧DO值降到最小值后反弹,DO值反弹为60%时开始流加补料培养基,同时用25%的氨水控制pH为7.2。培养至OD600值为80时,降温至16℃,加入终浓度为0.5mmol/L IPTG和0.3mmol/L甘氨酸进行诱导菌体表达蛋白,诱导表达16h结束发酵,离心后获得重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌。

[0091] S3,醋酸可的松底物预处理:称取50g/L的醋酸可的松,加入40mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液和体积浓度为8%的吐温80、甲醇、乙醇、丙酮和二甲基亚砜,利用高速匀浆机在

11000r/min条件下乳化13min,将底物乳化形成微小的颗粒。

[0092] S4,醋酸泼尼松静息细胞转化:在酶转罐中加入乳化后的底物,加入20g/L重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥,加入0.7g/L的PMS,在34℃、300r/min、通气量0.5vvm、罐压0.08MPa条件下,转化22h。

[0093] 实施例7

[0094] 实施例7与实施例3的区别是:步骤S3的助溶剂选择甲醇,其余步骤相同。

[0095] 实施例8

[0096] 实施例8与实施例3的区别是:步骤S3的助溶剂选择乙醇,其余步骤相同。

[0097] 实施例9

[0098] 实施例9与实施例3的区别是:步骤S3的助溶剂选择丙酮。

[0099] 实施例10

[0100] 实施例10与实施例3的区别是:步骤S3的助溶剂选择二甲基亚砜。

[0101] 对比例1

[0102] 对比例1与实施例1的区别是:对比例1只表达KstD基因,不融合表达蛋白GTS。PCR扩增KstD基因,将pET28a质粒用NcoI、XhoI限制性核酸内切酶进行双酶切。将获得的KstD基因、双酶切pET28a质粒利用ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit进行无缝连接,构建获得重组质粒pET28a-GTS-KstD。将重组质粒pET28a-GTS-KstD进入大肠杆菌BL21中获得重组菌。步骤S2-S4同实施例1。

[0103] 对比例2

[0104] 对比例2与实施例3的区别是:将步骤S24获得的发酵液4℃、8000r/min离心10min,将离心获得的菌泥用pH 8.0、40mM的磷酸盐缓冲液重悬,用高压匀浆机1000bar循环3次进行细胞破碎,即获得细胞破碎液;然后采用细胞破碎液替换重组3-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶大肠杆菌菌泥。其余步骤同实施例1。

[0105] 对比例3

[0106] 对比例3与实施例3的区别是:步骤S3中,称取40g/L的醋酸可的松,加入pH 8.0、40mM的磷酸盐缓冲液,底物不经过乳化处理。根据步骤S4方法进行醋酸泼尼松转化,同时添加1ppm FAD。

[0107] 醋酸泼尼松制备:

[0108] 将实施例和对比例获得的转化液进行抽滤,获得醋酸泼尼松滤饼。在醋酸泼尼松滤饼中加入10倍体积(v/w)的三氯甲烷,45℃回流搅拌3h进行萃取。过滤获得三氯甲烷萃取液,加入6g活性炭回流搅拌1h进行脱色。过滤获得脱色后的三氯甲烷萃取液,45℃负压蒸馏,去除三氯甲烷获得醋酸泼尼松粗品。将获得的醋酸泼尼松粗品加入到100ml乙酸乙酯中,60℃回流搅拌2h,降温到0℃进行结晶,过滤获得醋酸泼尼松精品。使用高效液相色谱(HPLC)检测醋酸泼尼松纯度。

[0109] 醋酸泼尼松浓度方法如下:

[0110] 测定过程中采ChromCore 120C183 $\mu$ m,4.6 $\times$ 140mm色谱柱,柱温为25℃,流动相采用乙腈与水的混合溶液,二者体积比为33:67,流速为1mL/min,检测器为UV 245nm;检测时间为25min。

[0111] 表13-甾酮- $\Delta$ 1-脱氢酶在大肠杆菌BL21中的表达量和蛋白分布

	实验组名称	3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶总蛋白 (g/L)	破碎细胞离心后上清液中 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶总 蛋白占比 (%)
[0112]	实施例 1	1.1	91.2
	对比例 2	1.4	94.3
	对比例 1	0.9	63.2

[0113] 表1可知,从实施例1和对比例1结果可看出:通过谷胱甘肽硫转移酶 (GTS) 蛋白和 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶KstD融合表达,有效提高3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的蛋白表达量,同时更有助于3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在水中的溶解。从实施例1和实施例2可知,诱导表达时添加甘氨酸,可有效提高3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在大肠杆菌BL21中的蛋白表达量以及3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在水中的溶解。

[0114] 表2醋酸泼尼松回收率和纯度

	实验组名称	转化率 (%)	醋酸泼尼松回收率 (%)	醋酸泼尼松纯度 (%)
[0115]	实施例1	90.8	85.9	96.3
	实施例2	93.4	87.6	97.0
	实施例3	96.9	88.7	97.5
	实施例4	97.3	88.3	98.5
	实施例5	97.5	88.1	98.1
	实施例6	98.3	88.8	98.5
	实施例7	98.1	87.4	96.5
	实施例8	97.4	85.9	96.3
	实施例9	97.1	86.8	95.6
	实施例10	95.1	85.6	95.9
	对比例1	53.6	75.6	90.7
	对比例2	86.3	83.1	96.6
	对比例3	73.1	81.6	95.2

[0116] 表2可知,静息细胞(实施例5)和破碎液(对比例2)相比:静息细胞转化醋酸泼尼松的转化率高干破碎液工艺。底物处理方式:实施例3对底物进行乳化处理,使底物形成微小的颗粒,同时添加甲醇作为助溶剂。与对比例3底物不经过乳化处理相比,实施例1底物经过乳化处理后醋酸泼尼松转化率大幅提升。通过对溶剂的种类进行对比,助溶剂对醋酸泼尼松转化率促进效果为甲醇>乙醇>丙酮>吐温80>DMSO(实施例7>实施例8>实施例9>实施例3>实施例10>对比例3)。

[0117] 通过醋酸泼尼松回收率和醋酸泼尼松纯度分析,实施例5使用静息细胞转化与对比例2破碎液进行转化制备醋酸泼尼松相比,静息细胞制备醋酸泼尼松的回收率和纯度高于破碎液工艺。静息细胞工艺不仅可以减少细胞破碎的能耗,并且能有效解决产物提取时破碎细胞中大量蛋白与产物包裹的问题,醋酸泼尼松回收率更高,同时无需额外添加3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的辅酶FAD,降低生产成本。

[0118] 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。

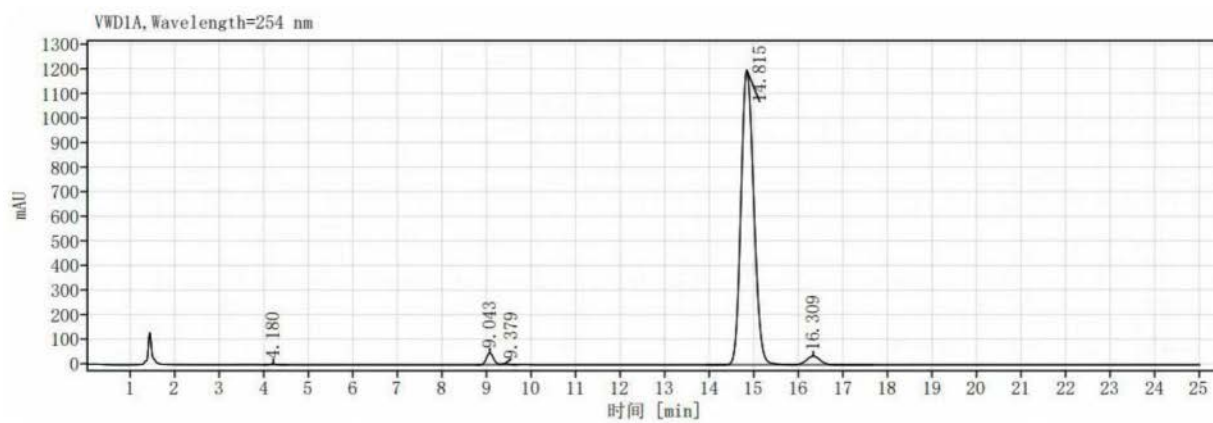


图1