



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118185888 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 14

(21) 申请号 202311366941.2

C12R 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2023.10.20

(71) 申请人 黄冈人福药业有限责任公司

地址 438000 湖北省黄冈市黄州区火车站
经济开发区知青路一号

(72) 发明人 李琦欣 何鑫 汪声晨 刘林
赵静 陈海林

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 黄益澍

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 33/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备1,4-雄烯二酮中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备1,4-雄烯二酮中的应用。所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明还公开了一种核酸、重组表达载体、转化体、制备3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法、1,4-雄烯二酮的制备方法、和所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、核酸、重组表达载体或转化体在制备1,4-雄烯二酮中的应用。本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶在制备1,4-雄烯二酮中,具有生产流程简单、底物投料浓度高、转化率高、收率高、产物单一、产物纯度高、可催化多种底物和环境友好的优点,有着潜在的利用价值。

1. 一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 一种分离的核酸,其特征在于,所述核酸编码如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶;

较佳地,所述核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 一种重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含如权利要求2所述的核酸;
较佳地,所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b或pET28a。

4. 一种转化体,其特征在于,所述转化体包含如权利要求2所述的核酸或如权利要求3所述的重组表达载体;

较佳地,所述转化体的底盘菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*),例如为大肠杆菌BL21 (DE3)。

5. 一种制备3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法,其特征在于,所述方法包括将如权利要求4所述的转化体在适合的培养基中生长并表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的步骤;

较佳地,所述方法包括:

(1) 将含所述转化体的种子液接种于培养基中进行培养;

(2) 添加诱导剂后继续培养;

(3) 对经步骤(2)所得的菌体进行破碎,收集上清液;

更佳地,所述方法包括以下一种或多种条件:

(1) 中,所述的培养的温度为30-37°C,培养至培养基的OD_{600nm}达到0.5-1.0,所述种子液的接种量为1-5%,所述百分比为体积百分比,和/或所述培养基为LB培养基;

(2) 中,所述诱导剂为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,所述诱导剂的浓度为0.3-0.5mM例如0.4mM,所述继续培养的温度为20-25°C,和/或所述继续培养的时间为18-20h;

(3) 中,所述破碎为低温破碎。

6. 一种1,4-雄烯二酮的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括将如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如权利要求4所述的转化体或如权利要求5所述方法制备的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶与底物接触进行反应的步骤;所述底物为雄烯二酮或睾酮;

较佳地,所述制备方法包括向反应体系中通氧的步骤,优选反应体系处于纯氧气氛;和/或,

所述制备方法包括产物精制的步骤。

7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为液态酶、固态酶、固定化酶、湿菌体或菌粉;

较佳地,所述液态酶为粗酶液,所述固态酶为酶粉。

8. 如权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为粗酶液,反应体系中所述底物与粗酶液的质量/体积比为(20-10):1,所述质量/体积比的单位为g/mL;

和/或,所述底物的终浓度为10-100g/L,较佳地为40g/L;

和/或,所述制备方法包括加入电子受体,所述电子受体例如为甲萘醌;优选为0.1-1%甲萘醌,更优选为0.5-1%甲萘醌,所述百分比为甲萘醌与底物的质量百分比;

和/或,所述制备方法包括加入乳化剂,所述乳化剂选自聚乙二醇、异丙醇、DMSO、

Triton-X100和吐温80中的一种或多种;较佳地为聚乙二醇和/或异丙醇;更佳地为1-5%聚乙二醇和/或1%异丙醇,所述百分比为体积百分比。

9.如权利要求6-8任一项所述的制备方法,其特征在于,所述反应的pH为7.0-8.0;

和/或,所述反应的温度为30-37°C;

和/或,反应时间为18-24h;

和/或,所述反应结束后,还包括萃取的步骤。

10.如权利要求6-9任一项所述的制备方法,其特征在于,所述产物精制包括:助滤剂处理、过滤、加入溶剂、回流、浓缩和析出产物的步骤;

较佳地,所述助滤剂为硅藻土;和/或,

所述溶剂为甲醇;和/或,

所述回流的温度为65-70°C;和/或,

所述回流的时间为0.5-1h。

11.一种如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如权利要求2所述的核酸、如权利要求3所述的重组表达载体或如权利要求4所述的转化体在制备1,4-雄烯二酮中的应用。

3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备1,4-雄烯二酮中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备1,4-雄烯二酮中的应用。

背景技术

[0002] 甾体激素类药物是临床上一类重要药物,被广泛用于预防及治疗各种疾病。当甾体母核结构发生变化时,可能会变化成更为有效的甾体药物;如醋酸可的松C1,2位上引入双键后变成醋酸泼尼松,抗炎作用能够提高3-4倍。利用化学法进行C1,2脱氢反应一般使用二氧化硒法,该方法一般在产物中会残留部分对人体有害的硒,且化学法具有毒性大、收率低、环境污染大等缺点;相比较而言使用酶法转化进行C1,2位脱氢反应就成了较好的选择。随着生物发酵以及酶催化技术得到发展,发酵以及酶催化法制备部分甾体化合物逐渐替代了化学合成的方法,酶法相较于化学法存在着转化效率高、环境污染小、副产物少等优点。

[0003] 雄烯二酮(4AD)进行C1,2位脱氢反应生成1,4-雄烯二酮(ADD),ADD是合成一些高端甾体药物如雌激素、孕激素的重要前体物质。尽管使用发酵技术转化4AD、ADD等技术已日趋成熟,但是在发酵过程中还是出现一些其他副反应及杂质,且转化效率有待进一步提高。专利CN102703494A中公开了一种利用重组枯草芽孢杆菌全细胞转化4-AD生成ADD的方法,将新金分支杆菌的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶(3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase,KstD)外源表达达到枯草芽孢杆菌中,与对照菌株相比,显著提高了菌株的酶活力,但是以0.1% (w/v) 4-AD为底物时,底物的转化率仅为65.7%。专利CN106636160A公开了一种来源于新金分支杆菌的KstD,将该基因在大肠杆菌BL21中过量表达,所获得的基因工程菌株在投料浓度仅为0.1% (w/v)时,转化4-AD为ADD的底物转化率仅为76.5%。

[0004] 综上所述,现有技术中将不同来源的KstD酶基因外源表达达到不同宿主中,利用重组菌株进行生物转化4-AD制备ADD仍有底物投料浓度小、转化率低等不足。因此,获得一种转化效率高、收率高、产物单一、不产生其他副产物的ADD制备方法具有重要意义。

发明内容

[0005] 为解决现有技术中缺乏底物投料量高、转化率高的1,4-雄烯二酮生产方法的问题,本发明提供一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备1,4-雄烯二酮中的应用。本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶(3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase,KstD)在制备1,4-雄烯二酮中,具有底物投料量高、转化率高、收率高、产物单一、产物纯度高和环境友好的优点。

[0006] 本发明通过以下技术方案解决上述技术问题:

[0007] 本发明第一方面提供一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 本发明第二方面提供一种分离的核酸,其特征在于,所述核酸编码如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶;

- [0009] 本发明一些具体的实施方案中,所述核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
- [0010] 本发明第三方面提供一种重组表达载体,所述重组表达载体包含如第二方面所述的核酸。
- [0011] 本发明一些实施方案中,所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b或pET28a。
- [0012] 本发明第四方面提供一种转化体,所述转化体包含如第二方面所述的核酸或如第三方面所述的重组表达载体。
- [0013] 本发明一些实施方案中,所述转化体的底盘菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*),例如为大肠杆菌BL21 (DE3)。
- [0014] 本发明第五方面提供一种制备3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法,所述方法包括将如第四方面所述的转化体在适合的培养基中生长并表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的步骤。
- [0015] 本发明一些较佳的实施方案中,所述方法包括:
- [0016] (1) 将含所述转化体的种子液接种于培养基中进行培养;
- [0017] (2) 添加诱导剂后继续培养;
- [0018] (3) 对经步骤(2)所得的菌体进行破碎,收集上清液。
- [0019] 本发明一些更佳的实施方案中,所述方法包括以下一种或多种条件:
- [0020] (1) 中,所述的培养的温度为30-37℃,例如为30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃或37℃,培养基的OD_{600nm}达到0.5-1.0,所述种子液的接种量为1-5%例如为1%、2%、3%、4%或5%,和/或所述培养基为LB培养基,所述百分比为体积百分比;
- [0021] (2) 中,所述诱导剂为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,所述诱导剂的浓度为0.3-0.5mM例如0.4mM,所述继续培养的温度为20-25℃,例如为20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃,和/或所述继续培养的时间为18-20h,例如为18h、19h或20h;
- [0022] (3) 中,所述破碎为低温破碎。
- [0023] 本发明第六方面提供一种1,4-雄烯二酮的制备方法,所述制备方法包括将如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如第四方面所述的转化体或如第五方面所述方法制备的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶与底物接触进行反应的步骤;所述底物为雄烯二酮或睾酮;
- [0024] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括向反应体系中通氧的步骤。
- [0025] 本发明一些优选实施方案中,反应体系处于纯氧气氛。
- [0026] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括产物精制的步骤。
- [0027] 本发明一些实施方案中,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为液态酶、固态酶、固定化酶、湿菌体或菌粉。
- [0028] 本发明相关实施方案中,固定化酶指的是将上述液体酶中的酶组分固定在固定化载体上而得。固定化载体为树脂,优选地为环氧树脂、氨基树脂或吸附树脂。湿菌体指的是表达了所述酶的菌体的发酵培养液经离心后所得到的沉淀物。菌粉指的是对上述湿菌体经干燥以脱掉溶剂水并且经粉碎后得到的粉状物。
- [0029] 本发明一些实施方案中,所述液态酶为粗酶液,所述固态酶为酶粉。
- [0030] 本发明相关实施方案中,所述粗酶液是采用溶剂(例如水或缓冲液)对湿菌体进行重悬和均质后得到的均质酶液。酶粉指的是将上述液态酶经干燥和粉碎后得到的粉末物,所述干燥例如冷冻干燥。
- [0031] 本发明中,所述粗酶液的一个制备示例为将表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的菌体

使用缓冲液按菌体:缓冲液=1:4 (g/mL)的比例进行重悬,高压均质机以1000bar低温破碎10-20min破碎2-3次,12000-13000r/min离心10-15min后,取上清液即得。所述缓冲液为磷酸盐缓冲液,pH为7-7.5。

[0032] 本发明中,所述酶粉的一个制备示例为将上述粗酶液进行冻干处理即得。

[0033] 本发明一些实施方案中,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为粗酶液,反应体系中所述底物与粗酶液的质量/体积比为(20-10):1,例如为20:1、18:1、16:1、14:1、12:1或10:1,所述体积/质量比的单位为g/mL。

[0034] 本发明一些实施方案中,所述底物的终浓度为10-100g/L,例如为10g/L、20g/L、30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L或100g/L。

[0035] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括加入电子受体例如为甲萘醌。

[0036] 本发明一些较佳的实施方案中,所述电子受体为0.1%-1%甲萘醌,所述百分比为甲萘醌与底物的质量百分比。

[0037] 本发明一些更佳的实施方案中,所述电子受体为0.5%-1%甲萘醌,所述百分比为甲萘醌与底物的质量百分比。

[0038] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括加入乳化剂,所述乳化剂选自聚乙二醇、异丙醇、DMSO、Triton-X100和吐温80中的一种或多种。

[0039] 本发明一些较佳的实施方案中,所述乳化剂为聚乙二醇和/或异丙醇。

[0040] 本发明一些更佳的实施方案中,乳化剂为1-5%聚乙二醇,例如为1%、2%、3%、4%或5%聚乙二醇,和/或1%异丙醇,所述百分比为体积百分比。

[0041] 本发明一些实施方案中,所述反应的pH为7.0-8.0,例如为7.0、7.5或8.0。

[0042] 本发明一些实施方案中,所述反应的温度为30-37°C,例如为30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C或37°C。

[0043] 本发明一些实施方案中,反应时间为18-24h,例如为18h、20h、22h或24h。

[0044] 本发明一些实施方案中,所述反应结束后,还包括萃取的步骤。

[0045] 本发明一些实施方案中,所述产物精制包括:助滤剂处理、过滤、加入溶剂、回流、浓缩和析出产物的步骤。

[0046] 本发明一些较佳的实施方案中,所述助滤剂为硅藻土;和/或,所述溶剂为甲醇;和/或,所述回流的温度为65-70°C,例如为65°C、66°C、67°C、68°C、69°C或70°C;和/或,所述回流的时间为0.5-1h,例如为0.5或1h。

[0047] 本发明第七方面提供一种如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如第二方面所述的核酸、如第三方面所述的重组表达载体或如第四方面所述的转化体在制备1,4-雄烯二酮中的应用。

[0048] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0049] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0050] 本发明的积极进步效果在于:本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶在制备1,4-雄烯二酮中,具有生产流程简单、底物投料浓度高(高至40g/L)、转化率高(高至97%以上)、收率高(90%以上)、产物单一、产物纯度高(高至99%以上)、可催化多种底物(例如底物可为1,4-雄烯二酮和甾酮)和环境友好的优点。

附图说明

[0051] 图1为KstD酶的SDS-PAGE检测结果图。

[0052] 图2为KstD酶粗酶液和表达KstD酶的菌体应用于制备1,4-雄烯二酮中的TLC点板检测结果图。

具体实施方式

[0053] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0054] 实施例中,未说明时,百分比均指的是按反应体系的体积百分比加入该物质。

[0055] HPLC检测方法:

[0056] 色谱柱:Y-RA-2019-03YMC-pack ODS-AC18 (250mm×4.6mm, 5 μ m);

[0057] 样品浓度:0.8mg/mL;样品溶剂:甲醇;

[0058] 流动相:60%乙腈;

[0059] 检测波长:280nm;流速:1mL/min;进样量:20 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C;洗脱方式:等度洗脱。

[0060] TLC检测方法:

[0061] 取500 μ L反应液,加入1mL的乙酸乙酯,充分混合均匀,离心;取上清液,点板,TLC展层条件如下:

[0062] 石油醚:乙酸乙酯=3:1,外加5滴甲醇

[0063] 展层后吹干,在254nm紫外下观察酸脱物,在磷钼酸喷涂后,高温显色,观察底物转化情况和产物合成情况。

[0064] 实施例1制备KstD酶

[0065] 将如SEQ ID NO:2所示的目的基因构入表达载体pET26b中构建质粒,将含有重组质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞在含40 μ g/mL含卡那霉素的LB培养基中培养,并在37 $^{\circ}$ C以200rpm培养。当OD_{600nm}达到0.8时,加入0.4mM(终浓度) 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷,培养温度降至20 $^{\circ}$ C,继续培养18-20小时。通过SDS-PAGE检测(见图1)发现,可溶性的目标酶蛋白正常表达。

[0066] KstD酶的序列信息如表1所示。

[0067] 表1序列信息

[0068]

名称	氨基酸序列	核酸序列
3- 甾酮- Δ^1 - 脱氢酶	MEGKITTGWDHETDVLVV GSGAGALTA AIVAADNHAD VLVIEKGELFGGTSATSGG VLWIPNSHLAKAAGQQDS REEAIEYISALAGDVPKRI EAFVDMAPAMLQYVEREA NVLYNSIPYTDYHAELPGG KLGWRSHDPVPLDGRLG DDL RWMRPTHASAMLF GK ISWTAAEAAPMITRWPWF KS LYKVLWRYYS DIGQRLK SDRARFLTAGNALVARLKL ALDKRHVPLWRKAPAADLI VEDGKVVGATAVKDGRVQ RIRARKGVILAAGGFERNA ELRGANLRRSPDPDVSGGQ PDNTGDTLLAAERAGAAV ERLDSAWWAPTIKVPGEDR ARPSFFERSLPGSIIVNQAG KRFTNEAASYHIVGKEMFE KNLPGAETTPAYVIFDATFR SKYPMGPVMPVFPDFTMR GEVKQIVTKANSIAELA EK LGLPADALVATVERFNENS RRGEDPDFGRGHQPYDRY YGDPKVQPNPNLLPLEKAP FYALPVNPGDVG TNGGLVT DSHGAVLDKQGKRIPGLYA IGNTAASVMGRSYPGAGAT IGPAMTFGYAAARDLTGAN QPVG (SEQ ID NO: 1)	atggaaggtaaaatcaccacgggttgggatcatgaaacgga tgtgctgggtgggtggcagcggtgcaggtgcattaacagcag caattgtggcggccgataacatgcggatgttcttggtgattg aaaaaggcgaactgtttggtgtacaagcgcaacctctggt ggtgttcttggtattccgaatagtcattctggcaaaagcagca ggtcagcaggatagccgtgaagaagcaattgaatatatcag cgcactggccgggtgatgtgatcctaaacgtattgaagcattt gtggatatggcggcgcaatgctgcaatatgtagaacgcga agcgaatgttctgtataatagcattccgtataccgattatcatg cggaactgccgggtggcaactgggtggcgtagccatgat cctgttccgctggatggctgtctgtggtgatgatctgcgtt ggatgcgccaacacatgcctcagctatgctgttggtataaat tagctggacagctcggaagcagcaccgatgattaccggt ggccgggtggtttaaaagtctgtataaagtctgtggcgttat tattcagatatcggtcagcgtctgaaagcgatcgtgcgcgtt ttctgaccgcaggtaacgcactgggtgctgctgaaactgg ccctggataaacgtcatgttctctgtggcgtaaagcgccgg ctgcagatctgattgtggaagatggtaaagtgtgggtgcaa ccgcagtgaaagatggctgtgtgcagcgtattcgtgctcgt aagggttattctggctgccggtggcttgaacgtaatgcaga actgcgtgggtgcaaatctgcgtcgtagtcggaccctgatgt agcgggtggtcagcctgataataccggtgataccctgctggc agctgaacgtgcaggtgcagcagtagaacgtctggatagc gcgtgggtgggtcctaccattaaagtctggtgaagatcgt gcaagaccgagtttttgaacgtagcctgcctggttagtattat tgttaatcaggcaggtaaactgtttaccaacgaagcgccgag ttatcatattgttgtaaagaaatgtttgaaaaaatctgccgg gtgcagaaaccacccggcatacgttattttgatgcaacctt cgtagcaaatatccgatgggtccggttatgccggttttccgg attttaccatgcgtggtgaagttaaacagattgttaccaaagc aaatagcattgcagaactggcagaaaaactgggtctgccgg cagatgcactgggtgcaaccgttgacgttttaatgaaaatag ccgtcgtgggtgaagatccggattttgtgctggtcatcagcc gtatgatcgttattatggtgatccgaaagtcagccgaatccg aatctgctgccgtggaaaaagcaccgttttatgcactgccg gttaatccgggtgatgttggtacaaatggtggtctggttaccg atagccacgggtgcagttctggataaacagggtaaacgtattc cgggtctgtatgcaattggtataaccgcagcaagcgttatgg gtcgtagctatccgggtgcaggtgcaaccattggtccggca atgacctttggttatgcagcagcagcgatctgaccggtgca aatcagccggttgg (SEQ ID NO: 2)

[0069] 1.1 高密度发酵KstD酶的粗酶液

[0070] 在200L发酵罐中采用连续补料方式进行大肠杆菌高密度发酵。装液量为110L培养基,对其进行25min,121℃高温灭菌。待温度降至37℃,以1%接种量进行接种,开始发酵。在接种后的3-5h溶氧降至联动范围,此后转速上升,溶氧开始维持恒定,并开始补料。补料过程中维持溶氧在一定的波动范围(25%-30%)。待菌浓生长至OD₂₀左右开始降低温度,低温下补加诱导剂。在整个发酵过程中控制pH稳定在7.0左右。整个补料过程采取连续补料工艺,即根据菌株生长速度增加补料速度。本发明所用补料液pH调整至培养基pH,即7.0左右。诱导前补料速率的调节:当转速无法维持溶氧波动时开始补料,维持溶氧在一定的波动范

围(25%-30%),此过程中的pH变化为:补料时,pH开始降低,pH自控自动补碱,维持此阶段的pH在7.0左右波动。诱导后补料速率调节:低温下菌体生长缓慢,补料速率应适当提高,此阶段过程中氧气的消耗减慢,溶氧会适当回升(30%-40%),待菌体适应低温环境,生长便会加快,此时根据菌浓增加补料速度,维持溶氧在30%左右波动直至发酵结束。

[0071] 待发酵结束后,使用大型离心机对发酵液离心,收菌后使用pH 7.5的磷酸盐缓冲液按菌体:磷酸盐缓冲液=1:4(g/mL)进行重悬,使用高压均质机破碎菌体得到KstD粗酶液,破碎条件为4℃、1000bar、破碎2-3次。

[0072] 1.2KstD酶粉的制备

[0073] 将粗酶液在-20℃冷冻2-3天后,使用冻干机处理冷冻后的酶液,从而得到KstD酶粉。

[0074] 实施例2

[0075] 将雄烯二酮粉末投入pH 7.5的磷酸盐缓冲溶液中,按40g/L的投料量,向100mL体系中加入乳化剂聚乙二醇1%、异丙醇1%,加入电子受体甲萘醌1%(甲萘醌与底物的质量百分比),搅拌0.5h使其充分乳化;按底物量的10%投入KstD酶粗酶液或未破碎菌体,搅拌均匀,使用真空泵将体系抽至真空,并使用氧气球保持体系氧气氛围,35℃保温搅拌反应。反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。点板检测结果如图2所示,使用KstD酶粗酶液进行催化的效果优于使用表达KstD酶的菌体(全细胞)进行催化的效果。

[0076] 实施例3小试KstD酶转化雄烯二酮工艺

[0077] 将雄烯二酮粉末投入pH 7.5的0.1mol磷酸盐缓冲溶液中,按40g/L的投料量,向50mL体系中加入乳化剂聚乙二醇1%、异丙醇1%,加入电子受体甲萘醌1%(甲萘醌与底物的质量百分比),搅拌0.5h使其充分乳化;按底物量的10%投入KstD酶粗酶液,35℃保温搅拌反应。反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,结果如表2所示,转化率达到97%以上。

[0078] 表2HPLC检测50mL反应体系转化结果

[0079]

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%
1	4.646	0.613	41699	0.338
2	7.577	1.000	12006051	97.327
3	8.484	1.12	259818	2.106

[0080] 使用上述反应体系,将体系放大至300mL,反应条件不改变,反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,转化率为53%。结果见表3。

[0081] 表3HPLC检测300mL反应体系18h转化结果

[0082]

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%
1	4.644	0.612	75018	0.196
2	7.594	1.000	20630877	53.998
3	8.504	1.120	16831000	44.053

[0083] 实施例4在300mL反应体系中通入氧气反应

[0084] 将雄烯二酮粉末投入pH 7.5的磷酸盐缓冲溶液中,按40g/L的投料量,向300mL体系中加入乳化剂聚乙二醇1%和异丙醇1%,加入电子受体甲萘醌1%(甲萘醌与底物的质量百分比),搅拌0.5h使其充分乳化;按底物量的10%投入KstD酶粗酶液,使用真空泵将体系

抽至真空,并使用氧气球保持体系氧气氛围(持续通入空气或者保持体系纯氧氛围),35℃保温搅拌反应。反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,转化率超过97%。结果见表4。

[0085] 表4HPLC检测通入氧气的300mL体系转化结果

峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%
1	4.395	0.606	48804	0.318
2	7.250	1.000	14958146	97.460
3	8.155	1.125	3.9572	2.017

[0087] 反应体系及反应条件不改变的情况下,将KstD酶粗酶液制成KstD酶粉进行反应。反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,转化率同样超过97%。

[0088] 实施例5反应体系的优化

[0089] 将雄烯二酮粉末投入pH 7.5的磷酸盐缓冲溶液中,按40g/L的投料量,在100mL体系中对反应体系的优化进行探索,加入乳化剂聚乙二醇1-5%、异丙醇1%,电子受体甲萘醌0.1%-1%(甲萘醌与底物的质量百分比),搅拌0.5h使其充分乳化;按底物量的10%投入KstD粗酶液,使用真空泵将体系抽至真空,并使用氧气球保持体系氧气氛围,35℃保温搅拌反应。反应18h后取样,进行HPLC检测。

[0090] 各组的反应体系及转化结果如表5所示。

[0091] 表5反应体系的优化

体系	甲萘醌浓度	氧气氛围	聚乙二醇	异丙醇	转化率
1	1%	-	5%	-	55%
2	1%	-	5%	1%	54%
3	1%	有	5%	1%	97%
4	0.5%	有	5%	1%	97%
5	0.1%	有	5%	1%	75%
6	0.5%	有	3%	1%	97%
7	0.5%	有	1%	1%	97%

[0094] 实施例6 1,4-雄烯二酮甲醇精制

[0095] 第一步:向含有12g 1,4-雄烯二酮的300mL酶催化转化液中加入6g硅藻土搅拌,过滤,收集1,4-雄烯二酮粗品,向其中加入96mL甲醇溶液,搅拌下升温至70℃回流1h,直至物料完全溶解并出现絮状变性蛋白沉淀。

[0096] 第二步:将上述溶液过滤,收集滤液,滤饼上残留的少量的1,4-雄烯二酮使用24mL甲醇淋洗。

[0097] 第三步:将上述溶液负压浓缩,浓缩至剩余2-3v,向其中缓慢添加纯净水,并缓慢降温,直至物料全部析出,添加纯净水的体积在96-120mL,降温至10℃以下持续1h过滤,收集滤饼烘干。

[0098] 第四步:向上述烘干物料中加入84mL 50%甲醇水溶液,搅拌下升温至70℃回流1h,当物料全部溶解,将体系缓慢降温至10℃以下,有大量晶体析出,抽滤收集滤饼,烘干得1,4-雄烯二酮精品,收率大于90%,HPLC送检纯度高于99.4%,单杂小于0.5%。结果见表6。

[0099] 表6 HPLC检测精制结果

[0100]	峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%
	1	4.608	0.615	15977	0.100
	2	7.594	1.000	15837922	99.428
	3	8.504	1.120	75193	0.472

[0101] 实施例7使用KstD酶转化睾酮

[0102] 将睾酮粉末投入pH 7.5的磷酸盐缓冲溶液中,按40g/L的投料量,向50mL体系中加入乳化剂聚乙二醇1%、异丙醇1%,加入电子受体甲萘醌0.5% (甲萘醌与底物的质量百分比),搅拌0.5h使其充分乳化;按底物量的5-10%投入KstD酶粗酶液,35℃保温搅拌反应18-24h。反应18h后取样,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,转化率达到97%以上。结果见表7。

[0103] 表7 HPLC检测在300mL体系中转化的结果

[0104]	峰号	保留时间	相对保留时间	面积	面积%
	1	18.962	0.822	459135	2.268
	2	20.566	0.892	48522	0.240
	3	23.066	1.000	19715323	97.408

[0105] 使用上述反应体系,将体系放大至300mL,反应18h后取样,反应条件不改变,使用乙酸乙酯萃取,离心。将乙酸乙酯挥干后经HPLC检测,转化率为50%,延长反应时间至24h,转化率不到60%。

[0106] 将上述300mL体系使用真空泵将体系抽至真空,并使用氧气球保持体系氧气氛围,按上述反应条件反应,使用TLC检测,转化率超过95%。

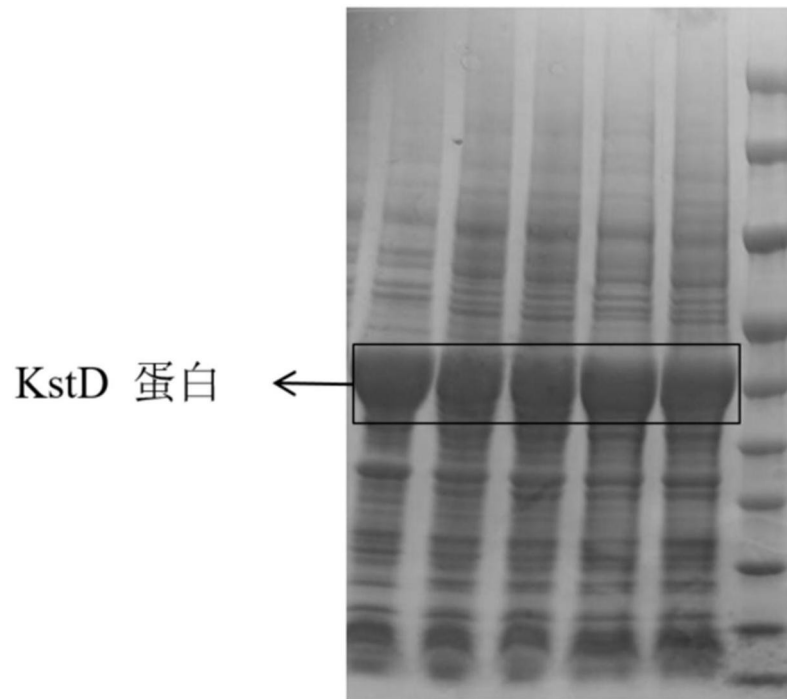


图1



图2