



(10) 授权公告号 CN 119144635 B

(45) 授权公告日 2025. 06. 27

(21) 申请号 202411616728.7

(22) 申请日 2024.11.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 119144635 A

(43) 申请公布日 2024.12.17

(73) 专利权人 浙江熙正霖生物科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市钱塘区下沙街
道银海科创中心3幢401室

(72) 发明人 罗茂行 董洪钢 刘迎宾 李舜
王甜忆

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

专利代理师 郑海峰

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 115896199 A, 2023.04.04

CN 118028257 A, 2024.05.14

Silvia Àvila Cabré et al.,

.Engineering the synthetic β -alanine
pathway in Komagataella phafi for
conversion of methanol into 3-
hydroxyprop.Microbial Cell

Factories.2023,第22卷(第237期),第6页左栏
第2段.

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据,但该数
据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 张怡文

权利要求书2页 说明书7页

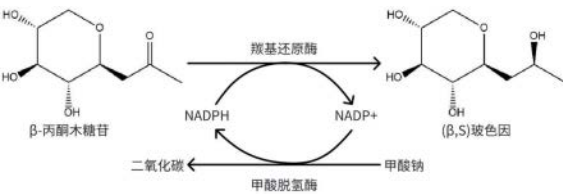
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

通过酶催化制备(β ,S)构型玻色因的方法
及工程菌

(57) 摘要

本发明提供了一种通过酶催化制备(β ,S)构型玻色因的方法及工程菌,属于生物合成领域,本发明的工程菌以大肠杆菌BL21(DE3)为出发菌株,引入了SEQ ID No.1所示的改进羧基还原酶编码基因和SEQ ID No.2所示的改进甲酸脱氢酶编码基因。本发明利用该菌株生产的酶制备羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶进行(β ,S)构型玻色因的酶催化合成,催化反应选择性高,可在常温常压中性环境中进行,共固定化酶可重复使用,有利于连续化生产和降低成本。本发明所采用的催化反应转化率>99%,使用的底物 β -丙酮木糖苷和甲酸钠安全性高,显著的提高了产物(β ,S)玻色因的合成效率。



1. 一种酶催化制备 (β , S) 构型玻色因的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 对工程菌进行培养, 对培养后菌体进行破碎, 分离纯化得到羧基还原酶 *LsADH* 和甲酸脱氢酶 *PsFDH_{mut}*;

所述工程菌采用如下方法构建:

S1: 设计序列如 SEQ ID No. 1 所示的改进羧基还原酶编码基因; 设计序列如 SEQ ID No. 2 所示的改进甲酸脱氢酶编码基因; 将改进羧基还原酶编码基因和改进甲酸脱氢酶编码基因插入载体 pET-28a (+) 的第 5070 位和第 5234 位之间, 且改进羧基还原酶编码基因位于改进甲酸脱氢酶编码基因的上游, 获得重组载体 pET-28a (+) -*Lsadh*-*Psfdh_{mut}*;

S2: 将重组载体 pET-28a (+) -*Lsadh*-*Psfdh_{mut}* 热激转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 得到共表达羧基还原酶 *Lsadh* 和甲酸脱氢酶 *Psfdh_{mut}* 的重组菌株 BL21 (DE3) /pET-28a (+) -*Lsadh*-*Psfdh_{mut}*, 即所述工程菌;

2) 配制海藻酸钠溶液, 加入所得羧基还原酶 *LsADH* 和甲酸脱氢酶 *PsFDH_{mut}* 酶液, 其中羧基还原酶与甲酸脱氢酶的酶活之比为 1:1~1:2, 双酶终浓度之和为 2~5mg/mL;

将上述混合酶液滴加到与混合酶液等体积的壳聚糖和氯化钙混合溶液中, 进行搅拌形成凝胶小球, 再将凝胶小球静置固化, 制得羧基还原酶 *LsADH* 和甲酸脱氢酶 *PsFDH_{mut}* 共固定化酶;

3) 利用包含所述共固定化酶的反应体系进行 (β , S) 构型玻色因的制备, 反应条件为搅拌转速 300~500rpm, 反应温度 35~40°C, 反应时间 6~8h;

反应体系包含磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液 10~50mM、15~30g/L 共固定化酶、800~1000mM β -丙酮木糖苷、1.5~2.5mM 甲酸钠、0.5~1mM 辅酶 NADP⁺。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述改进羧基还原酶编码基因采用方法设计: 对 *Leifsonia* sp. S749 来源的羧基还原酶编码基因 *Lsadh* 进行大肠杆菌密码子优化, 并在其对应的氨基酸序列的 N 端和 C 端加上组氨酸标签序列, *Lsadh* 基因的 GenBank 登录号: AB213459。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述改进甲酸脱氢酶编码基因采用方法设计: 对 *Pseudomonas* sp. 101 来源的甲酸脱氢酶编码基因 *Psfdh* 进行 5 个位点的突变设计以及大肠杆菌密码子优化, 并在其对应的氨基酸序列的 N 端加上 Strep 标签, 在其对应的氨基酸序列的起始密码子前面加上 RBS 序列和间隔序列; 其中, 所述 5 个位点的突变设计分别为 A207G、D230Q、C264A、H388K、S389V, *Psfdh* 基因 GenBank 登录号: P33160。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中, 对工程菌进行培养, 包括:

将工程菌 BL21 (DE3) /pET-28a (+) -*Lsadh*-*Psfdh_{mut}* 在添加了 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基平板进行划线, 37°C 倒置培养 12~16h; 挑取生长良好的单菌落, 接种添加了 50 μ g/mL 卡那霉素的 5mL LB 液体培养基, 在 37°C、200rpm 条件下培养 7~8h, 制备种子液;

将种子液按照 1~2% 的体积转接量转接至 TB 液体培养基中, 培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8, 添加终浓度为 0.1~0.2mM 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 改变培养温度为 25~30°C, 继续培养 12~16h, 获得共表达羧基还原酶 *LsADH* 和甲酸脱氢酶 *PsFDH_{mut}* 的细胞。

5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 中, 羧基还原酶 *LsADH* 通过 Ni-NTA 亲和层析柱进行纯化, 甲酸脱氢酶 *PsFDH_{mut}* 通过 StrepTrap HP 亲和层析柱进行纯化。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 2) 具体包括: 配制 1.0~4.0% 浓度

的海藻酸钠溶液,在50~60℃下加热达到完全溶解状态;冷却至室温后,加入所得羰基还原酶*Ls*ADH和甲酸脱氢酶*Ps*FDH_{mut}酶液;将上述混合酶液用滴加到与混合酶液等体积的2wt%壳聚糖和2 wt %氯化钙混合溶液中,在20~30℃下进行搅拌形成凝胶小球,再将凝胶小球在2 wt %氯化钙溶液中静置30~40min进行固化;固化后使用超纯水洗涤去除表面的氯化钙溶液,制得羰基还原酶*Ls*ADH和甲酸脱氢酶*Ps*FDH_{mut}共固定化酶。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤3)中,共固定化酶重复使用进行(β ,S)构型玻色因的合成反应。

通过酶催化制备 (β , S) 构型玻色因的方法及工程菌

技术领域

[0001] 本发明属于生物合成领域,具体涉及一种通过酶催化制备 (β , S) 构型玻色因的方法及工程菌。

背景技术

[0002] 玻色因是一种常用于化妆品的功能性原料,INCI名称为羟丙基四氢吡喃三醇。它可以促进人体真皮层糖胺聚糖的合成,促进蛋白聚糖的产生以及胶原蛋白的再生。糖胺聚糖、蛋白聚糖和胶原蛋白都是细胞外基质的重要结构成分,对于维持皮肤的紧致度、均匀度、光滑度、弹性,保持皮肤健康状态非常关键。皮肤衰老的外在表现为皮肤变薄、皮肤松弛、失去弹性、皱纹加深,在对于皮肤衰老的研究中,发现自然衰老的皮肤与光老化的皮肤均存在糖胺聚糖和蛋白聚糖的不同水平下降。使用添加玻色因的化妆品可以促进表皮更新,强韧皮肤结构,紧致肌肤,改善皱纹,增加皮肤光泽和弹性,因此玻色因被誉为护肤界的“抗老三巨头”之一,也被广泛应用于大牌产品的面霜、精华液等产品中。

[0003] 玻色因是一种 β -木糖衍生物,最初是由欧莱雅公司开发的。它的分子结构中含有多个手性碳原子,其母核上的手性碳原子的空间排列相对固定,而糖苷配基(羟基丙烷)中的7号位碳原子产生了两种不同构型,分别是(β , S)和(β , R)这两种非对映异构体(如图1所示)。研究表明, (β , S) 构型的生物活性要好于 (β , R) 构型,而且 (β , S) 构型的细胞毒性要比 (β , R) 构型更弱。玻色因的常规生产工艺为化学合成,采用木糖为原料,与乙酰丙酮在碱性水溶液中发生缩合反应,再经硼氢化钠作用还原酮羰基,获得玻色因。通过化学合成工艺生产的玻色因是两种构型的混合物, (β , S) 构型和 (β , R) 构型的比例通常在3:7~5:5,并且所使用的乙酰丙酮具有中等毒性,其蒸气与空气混合,能形成爆炸性混合物。CN 117510446 A公开了一种玻色因的制备方法,以D-木糖为起始原料,首先与乙酰丙酮反应得到丙酮基四氢吡喃三醇,然后在廉价催化剂的存在下进行羰基还原反应,得到S构型:R构型=50:50~55:45的羟丙基吡喃三醇,其催化反应过程需要使用氢气和高温高压条件。现有技术中也有利用酶法合成 (β , S) 构型玻色因的报道,但所使用的酶无法回收重复使用,不利于连续化生产。因此,开发一种安全环保、可连续化进行的 (β , S) 构型玻色因生产工艺,对于玻色因的大规模生产和市场应用具有重要意义。

发明内容

[0004] 为解决现有技术中的问题,本发明提出了一种通过酶催化制备 (β , S) 构型玻色因的方法及工程菌。

[0005] 本发明首先提供了一种用于酶催化制备 (β , S) 构型玻色因的工程菌的构建方法,其包括:

[0006] S1:设计序列如SEQ ID No.1所示的改进羰基还原酶编码基因;设计序列如SEQ ID No.2所示的改进甲酸脱氢酶编码基因;将改进羰基还原酶编码基因和改进甲酸脱氢酶编码基因插入载体pET-28a (+) 的第5070位和第5234位之间,且改进羰基还原酶编码基因位于改

进甲酸脱氢酶编码基因的上游,获得重组载体pET-28a(+)-Lsadh-Psfdh_{mut};

[0007] S2:将重组载体pET-28a(+)-Lsadh-Psfdh_{mut}热激转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,得到共表达羧基还原酶Lsadh和甲酸脱氢酶Psfdh_{mut}的重组菌株BL21(DE3)/pET-28a(+)-Lsadh-Psfdh_{mut}。

[0008] 本发明还提供了一种所述方法构建的工程菌。并进一步提供了所述的工程菌或其发酵产物在酶催化制备(β ,S)构型玻色因中的应用。

[0009] 本发明还提供了一种酶催化制备(β ,S)构型玻色因的方法,其包括如下步骤:

[0010] 1)对所述工程菌进行培养,对培养后菌体进行破碎,分离纯化得到羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut};

[0011] 2)配制海藻酸钠溶液,加入所得羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}酶液,其中羧基还原酶与甲酸脱氢酶的酶活之比为1:1~1:2,双酶终浓度之和为2~5mg/mL;

[0012] 将上述混合酶液滴加到与混合酶液等体积的壳聚糖和氯化钙混合溶液中,进行搅拌形成凝胶小球,再将凝胶小球静置固化,制得羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶;

[0013] 3)利用包含所述共固定化酶的反应体系进行(β ,S)构型玻色因的制备,反应条件为搅拌转速300~500rpm,反应温度35~40°C,反应时间6~8h;

[0014] 反应体系包含磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液10~50mM、15~30g/L共固定化酶、800~1000mM β -丙酮木糖苷、1.5~2.5mM甲酸钠、0.5~1mM辅酶NADP⁺。

[0015] 进一步的,所述步骤3)中,共固定化酶重复使用进行(β ,S)构型玻色因的合成反应。

[0016] 与现有技术相比,本发明至少具有如下有益效果:

[0017] (1)本发明通过共固定化羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}双酶体系催化制备玻色因,催化反应选择性高,所获得的产物为纯(β ,S)构型,使得产物在功效活性和安全性上均优于现有的化学合成工艺。共固定化羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的稳定性好,可重复使用,有利于连续化生产和降低成本。

[0018] (2)本发明所采用的催化反应在常温常压中性环境中进行,避免了化学合成工艺中的高温高压反应条件和碱性环境,降低了对于反应设备和工艺操作的要求,减少了设备投入和能耗。

[0019] (3)本发明所采用的催化反应转化率>99%,使用的底物 β -丙酮木糖苷和甲酸钠安全性高,并通过对甲酸脱氢酶进行突变改造,使其能够特异性催化辅酶NADP⁺的循环再生,显著的提高了产物(β ,S)玻色因的合成效率,副产物为无毒无害且易于挥发的二氧化碳,不会残留在反应体系中对产物的分离纯化造成影响。因此本发明提出的玻色因制备方法,不论在成本方面还是安全环保方面均具有显著优势。

附图说明

[0020] 图1为玻色因的两种构型;

[0021] 图2 为本发明酶催化制备(β ,S)构型玻色因的反应路线;

[0022] 图3为重组载体pET-28a(+)-Lsadh-Psfdh_{mut};

[0023] 图4为重组菌株共表达羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的SDS-PAGE图,其

中:泳道1为BL21 DE3/pET-28a (+) 空载对照;泳道2为BL21 DE3/pET-28a (+) -Lsadh-Psfdh_{mut};

[0024] 图5为羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的SDS-PAGE图;其中:泳道1为羧基还原酶LsADH;泳道2为甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施方式对本发明做进一步阐述和说明。所述实施例仅是本公开内容的示范且不圈定限制范围。本发明中各个实施方式的技术特征在没有相互冲突的前提下,均可进行相应组合。

[0026] 本发明实施例所采用的培养基如下:

[0027] LB液体培养基:0X0ID酵母提取物5g/L,0X0ID胰蛋白胨10g/L,氯化钠10g/L。

[0028] LB固体培养基:0X0ID酵母提取物5g/L,0X0ID胰蛋白胨10g/L,氯化钠10g/L,琼脂15g/L。

[0029] TB液体培养基:0X0ID酵母提取物24g/L,0X0ID胰蛋白胨12g/L,甘油4mL/L,磷酸二氢钾17mM,磷酸氢二钾72mM。

[0030] 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液:1%溴酚蓝溶液1mL,50%甘油溶液5mL,10%SDS溶液2mL,1M Tris-HCl溶液(pH=6.8)0.6mL,去离子水定容至9.5mL,使用前加入0.5mL β-巯基乙醇。

[0031] 菌落PCR反应体系:2×Rapid Taq Master Mix 10μL,上游引物和下游引物各0.4μL,ddH₂O 9.2μL,DNA模板适量,总体积为20μL。

[0032] 菌落PCR反应条件:95℃预变性10min;95℃变性15sec;58℃退火15sec;72℃延伸(延伸时长按4kb/min计算),循环28次;72℃延伸2min;4℃保存。

[0033] 本发明中采用的β-丙酮木糖苷和(β,S)构型玻色因高效液相色谱检测方法为:

[0034] 仪器:岛津LC-20A高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器。

[0035] 色谱柱型号:CAPCELL PAK ADME, 250×4.6mm,5μm。

[0036] 方法参数:流动相为100%水溶液,流速为1mL/min,检测池温度为40℃,柱温为35℃,进样量为10μL。

[0037] (β,S)构型玻色因标准曲线建立方法:称取0.1g(β,S)构型玻色因标准品(精确至0.0001g),加超纯水溶解,并定容至50mL,作为标准储备溶液。分别取0.5mL、1mL、2mL、4mL、8mL的标准储备溶液,用超纯水定容至10mL,配制成浓度为0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.8mg/mL、1.6mg/mL的标准样品溶液,通过0.22μm针式过滤器过滤,参照上述条件进行液相色谱分析,以标准样品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,相关系数应>0.99。

[0038] β-丙酮木糖苷标准曲线建立方法:称取0.1g β-丙酮木糖苷标准品(精确至0.0001g),加超纯水溶解,并定容至50mL,作为标准储备溶液。分别取0.5mL、1mL、2mL、4mL、8mL的标准储备溶液,用超纯水定容至10mL,配制成浓度为0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.8mg/mL、1.6mg/mL的标准样品溶液,通过0.22μm针式过滤器过滤,参照上述条件进行液相色谱分析,以标准样品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,相关系数应>0.99。

[0039] 实施例1 共表达羧基还原酶和甲酸脱氢酶的重组菌株的构建

[0040] 对Leifsonia sp. S749来源的羧基还原酶编码基因Lsadh (GenBank登录号: AB213459) 进行大肠杆菌密码子优化,并在其对应的氨基酸序列的N端和C端加上组氨酸标签序列,所设计的基因序列如SEQ ID No.1所示。对Pseudomonas sp. 101来源的甲酸脱氢酶编码基因Psfdh (GenBank登录号:P33160) 进行5个位点的突变设计 (A207G/D230Q/C264A/H388K/S389V) 以及大肠杆菌密码子优化,并在其对应的氨基酸序列的N端加上Strep标签,在其对应的氨基酸序列的起始密码子前面加上RBS序列和间隔序列,所设计的基因序列如SEQ ID No.2所示。将SEQ ID No.1和SEQ ID No.2交付基因合成公司进行基因合成,并将SEQ ID No.1和SEQ ID No.2插入载体pET-28a (+) 的第5070位和第5234位之间 (SEQ ID No.1位于SEQ ID No.2的上游),获得重组载体pET-28a (+) -Lsadh-Psfdh_{mut} (如图3所示)。

[0041] 吸取2μL重组载体pET-28a (+) -Lsadh-Psfdh_{mut},加入200μL商品化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴30min。将冰浴后的感受态细胞置于42℃金属浴热激90s,迅速放回冰浴静置3min,随后加入800μL的LB液体培养基,置于37℃、100rpm振荡培养1h。吸取100μL菌液涂布添加了50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基平皿,置于37℃过夜培养。使用引物T7-F和T7-R对获得的阳性转化子进行菌落PCR验证,验证正确的转化子制备甘油菌保存,得到共表达羧基还原酶Lsadh和甲酸脱氢酶Psfdh_{mut}的重组菌株BL21 (DE3) /pET-28a (+) -Lsadh-Psfdh_{mut}。

[0042] 表1 实施例1使用的引物名称与序列

	引物名称	序列号	序列 (5'-3')
[0043]	T7-F	SEQ ID No.3	TAATACGACTCACTATAGGGG
	T7-R	SEQ ID No.4	CAAAAAACCCCTCAAGACCCG

[0044] 实施例2重组菌株羧基还原酶和甲酸脱氢酶的共表达

[0045] 将冻存的重组菌株BL21 (DE3) /pET-28a (+) -Lsadh-Psfdh_{mut}在添加了50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基平皿进行划线,37℃倒置培养12~16h。挑取平皿上生长良好的单菌落,接种添加了50μg/mL卡那霉素的5mL LB液体培养基,在37℃、200rpm条件下培养7.5h,制备种子液。将种子液按照1% (V/V) 的转接量转接至100mL TB液体培养基中,在37℃、200rpm条件下培养至OD₆₀₀=0.6,添加终浓度为0.2mM的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG),改变培养温度为28℃,继续培养16h,获得共表达羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的细胞。另取菌株BL21 (DE3) /pET-28a (+),按照上述方法条件进行活化与培养,作为空载对照。

[0046] 吸取培养好的重组菌株与对照菌株菌液各20mL,12000rpm离心5min,弃上清。使用纯水洗涤细胞一遍,再加入10mL纯水重悬菌体,在冰水浴中超声破碎细胞 (150W,15min)。破碎后获得的粗酶液在4℃、12000rpm的条件下,离心20min,去除不溶性的细胞碎片和蛋白包涵体。吸取40 μL清液,加入10μL 5×蛋白上样缓冲液,混合均匀后,置于100℃金属浴处理10 min,通过SDS-PAGE (5%的浓缩胶和12%的分离胶) 检测目的蛋白的表达情况。通过图4可以表明,与对照菌株相比,重组菌株的羧基还原酶LsADH (27.1kDa) 和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut} (45.1kDa) 均得到了良好的可溶性表达。

[0047] 实施例3 羧基还原酶和甲酸脱氢酶的纯化

[0048] 羧基还原酶LsADH通过Ni-NTA亲和层析柱进行纯化。取实施例2的100mL培养液在4

℃、10000rpm的条件下,离心5min收集菌体,弃尽上清。取20mL缓冲液(50mM Na_2HPO_4 , 300mM NaCl, pH=8.0),重悬菌体,在冰水浴中超声破碎细胞(150W,15min)。破碎后获得的粗酶液在4℃、12000rpm的条件下,离心20min,去除不溶性的细胞碎片和蛋白包涵体,并用0.22 μm 水系微孔滤膜过滤上清液。首先用缓冲液平衡5个柱体积,基线平衡后上样。上样完成后,用洗涤缓冲液(50mM Na_2HPO_4 , 300mM NaCl, 10mM咪唑, pH=8.0)平衡10个柱体积,直至穿透峰回到基线。最后使用洗脱缓冲液(50mM Na_2HPO_4 , 300mM NaCl, 250mM咪唑, pH=8.0)洗脱10个柱体积,收集洗脱峰。如图5所示,通过SDS-PAGE检测表明纯化所得羧基还原酶LsADH的纯度较高,通过考马斯亮蓝法测定纯化所得羧基还原酶LsADH的蛋白浓度为6.7mg/mL。

[0049] 甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}通过 StrepTrap HP亲和层析柱进行纯化。将步骤二100mL培养液在4℃、10000rpm的条件下,离心5min收集菌体,弃尽上清。取20mL缓冲液(20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 280mM NaCl, 6mM KCl, pH=7.4),重悬菌体,在冰水浴中超声破碎细胞(150W,15min)。破碎后获得的粗酶液在4℃、12000rpm的条件下,离心20min,去除不溶性的细胞碎片和蛋白包涵体,并用0.22 μm 水系微孔滤膜过滤上清液。首先用缓冲液平衡5个柱体积,基线平衡后上样。上样完成后,继续用缓冲液平衡20个柱体积,直至穿透峰回到基线。最后使用洗脱缓冲液(20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 280mM NaCl, 6mM KCl, 2.5mM d-脱硫生物素, pH=7.4)洗脱10个柱体积,收集洗脱峰。并用SDS-PAGE检测目的蛋白的纯化效果,通过考马斯亮蓝法测定目的蛋白的浓度。如图5所示,通过SDS-PAGE检测表明纯化所得甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的纯度较高,通过考马斯亮蓝法测定纯化所得甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的蛋白浓度为9.5mg/mL。

[0050] 实施例4 羧基还原酶和甲酸脱氢酶的酶活力测定

[0051] 本实施例采用按照以下公式计算酶活力:

[0052] 酶活力(U/mL) = $(\Delta A \times V_{\text{总}} \times n) / (6.22 \times d \times V)$;

[0053] 其中: ΔA 为反应初速度范围内每分钟吸光度值的差值(min^{-1}), $V_{\text{总}}$ 为反应总体积(mL), n 为酶液稀释倍数,6.22为NADPH的消光系数(L/(mmol·cm)), d 为光程(1cm), V 为酶液添加体积(mL)。

[0054] 比酶活(U/mg)定义为每毫克纯酶所具有的酶活力单位数。

[0055] 采用分光光度法测定羧基还原酶LsADH的酶活力,酶活单位(U)定义为37℃每1min转化1 μmol NADPH所需的酶量。反应体系为1mL,包含750 μL 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(10mmol/L, pH7.0),100 μL 40mmol/L β -丙酮木糖苷,100 μL 2mmol/L NADPH,50 μL 实施例3纯化所得羧基还原酶LsADH的酶液(反应体系中蛋白浓度为0.1mg/mL)。测定方法为将反应体系于37℃下温育2min,使用紫外分光光度计测定340nm吸光度值的变化。计算得到羧基还原酶LsADH的酶活力为4.5U/mL,比酶活为0.67U/mg。

[0056] 采用分光光度法测定甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的酶活力,酶活单位(U)定义为37℃每1min转化1 μmol NADP^+ 所需的酶量。反应体系为1mL,包含750 μL 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(10mmol/L, pH7.0),100 μL 40mmol/L甲酸钠,100 μL 2mmol/L NADP^+ ,50 μL 实施例3纯化所得甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的酶液。测定方法为将反应体系于37℃下温育2min,使用紫外分光光度计测定340nm吸光度值的变化。计算得到甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的酶活力为5.2U/mL,比酶活为0.55U/mg。

[0057] 实施例5 羧基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}的共固定化

[0058] 配制3.0%浓度的海藻酸钠溶液,在60℃下加热达到完全溶解状态。冷却至室温后,加入实施例3所得羰基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}酶液(酶活之比为1:1,双酶终浓度之和为4mg/mL)。将上述混合酶液用注射器滴加到与混合酶液等体积的2%壳聚糖和2%氯化钙混合溶液中,在25℃下进行搅拌形成凝胶小球,再将凝胶小球在2%氯化钙溶液中静置30min进行固化。固化后使用超纯水洗涤凝胶小球3次,去除表面的氯化钙溶液,制得羰基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶,保存在4℃下备用。

[0059] 实施例6 羰基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶催化制备(β,S)构型玻色因

[0060] 催化反应体系为500mL,包含磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(10mM,pH7.0),20g/L实施例5所得羰基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶,1000mM β-丙酮木糖苷,1.5mM甲酸钠,0.5mM辅酶NADP⁺。反应条件为搅拌转速400rpm,反应温度37℃,反应时间8h。其中,本发明酶催化制备(β,S)构型玻色因的反应路线如图2所示。

[0061] 羰基还原酶LsADH和甲酸脱氢酶PsFDH_{mut}共固定化酶的重复使用:反应结束后,使用超纯水洗涤凝胶小球3次,凝胶小球表面干燥后,再次投入新的催化反应体系,作为第二次重复使用,后续重复使用时按照相同方法处理。

[0062] 使用共固定化酶重复进行5次反应,反应结束后通过高效液相色谱法测得反应液中的(β,S)玻色因的产量和转化率如表2所示。

[0063] 其中,转化率(%)=(β-丙酮木糖苷的初始添加量-反应体系中β-丙酮木糖苷的剩余量)/β-丙酮木糖苷的初始添加量×100%。

[0064] 由表中数据可知共固定化酶的稳定性较好,能够重复使用,进行多次连续催化反应。

[0065] 表2 实施例6催化反应的(β,S)玻色因产量及转化率

[0066]	反应次数	(β,S)玻色因产量 (g/L)	转化率 (%)
	第一次	191.6	99.7
	第二次	187.2	97.4
	第三次	182.8	95.1
	第四次	177.6	92.4
	第五次	170.9	88.9

[0067] 对比例1

[0068] 菌株构建过程同实施例1,区别在于本对比例所涉及的甲酸脱氢酶编码基因Psf dh未进行5个位点的突变设计。按照实施例2~实施例6所述方法进行本对比例羰基还原酶和甲酸脱氢酶的共表达、共固定化以及催化反应。使用共固定化酶重复进行5次反应,催化反应结束后,通过高效液相色谱法检测反应液中(β,S)玻色因的产量和转化率如表3所示。结合实施例6,可以表明本发明中甲酸脱氢酶编码基因Psf dh的5个位点突变,有效的提高了(β,S)玻色因的合成效率。

[0069] 表3 对比例1催化反应的(β,S)玻色因产量及转化率

[0070]

反应次数	(β ,S)玻色因产量 (g/L)	转化率 (%)
第一次	146.8	76.4
第二次	141.7	73.7
第三次	133.6	69.5
第四次	125.3	65.2
第五次	117.1	60.9

[0071] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

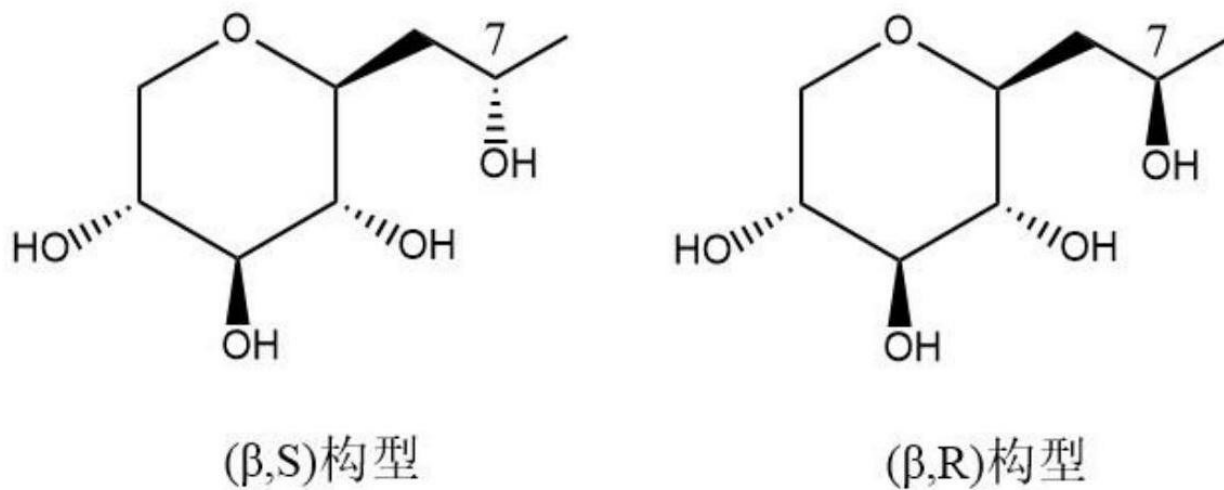


图 1

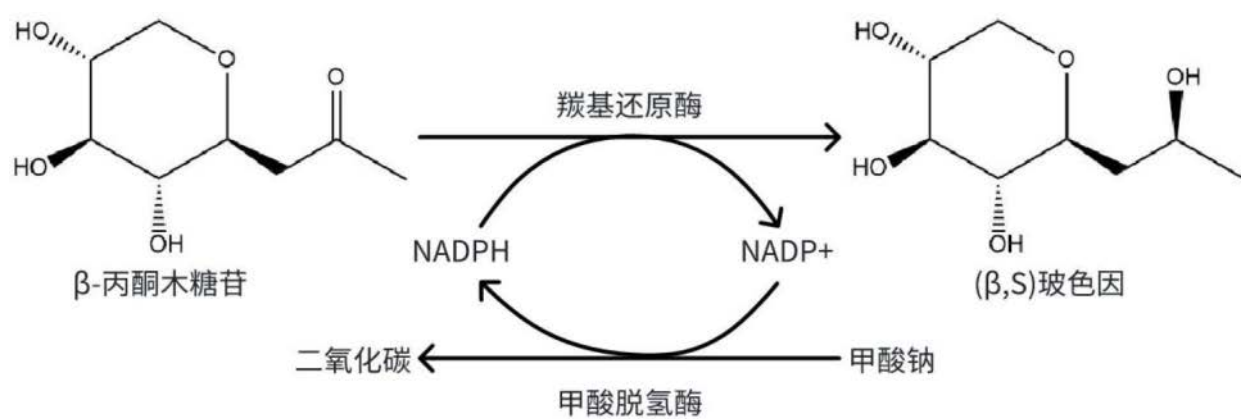


图 2

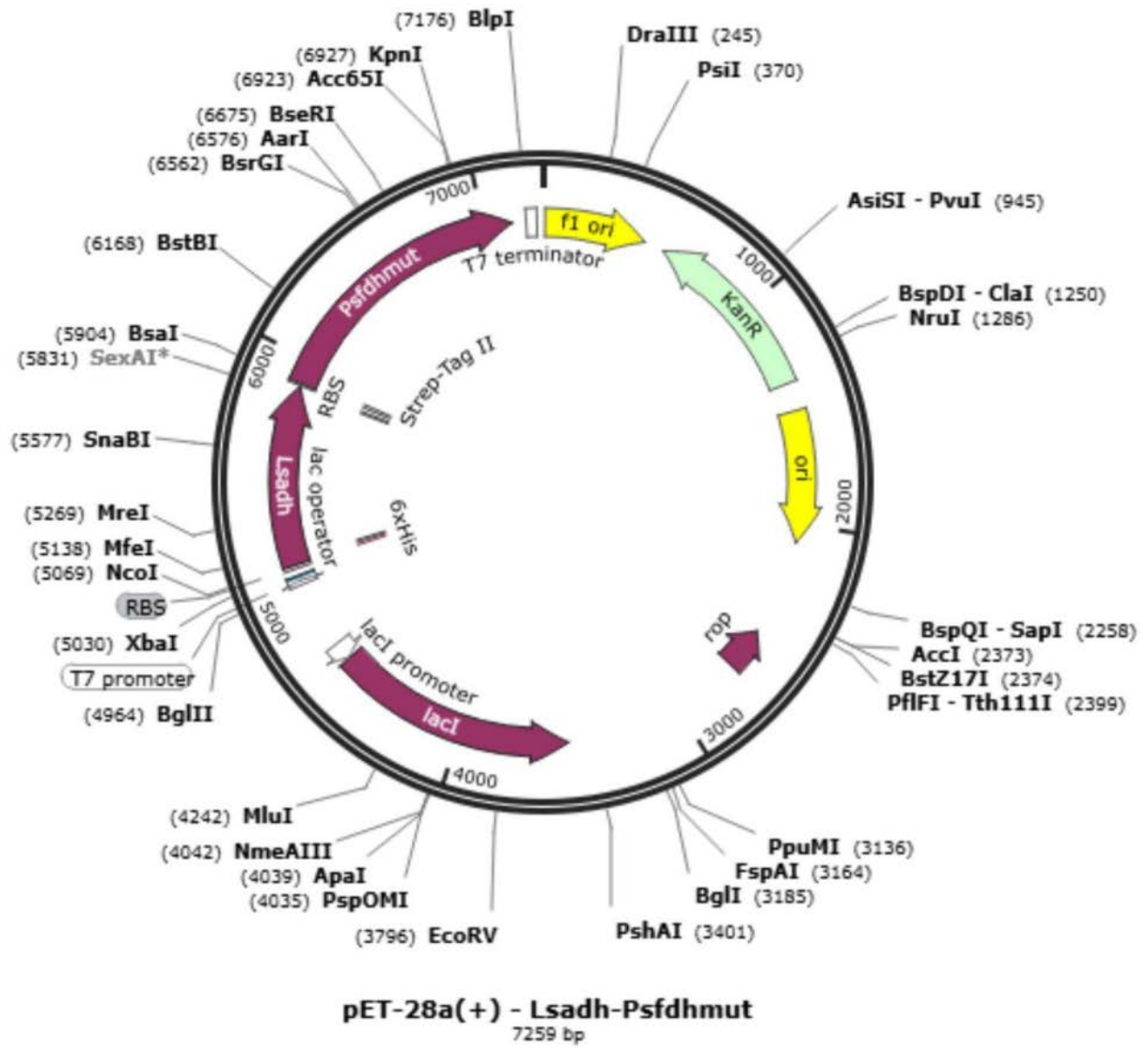


图 3

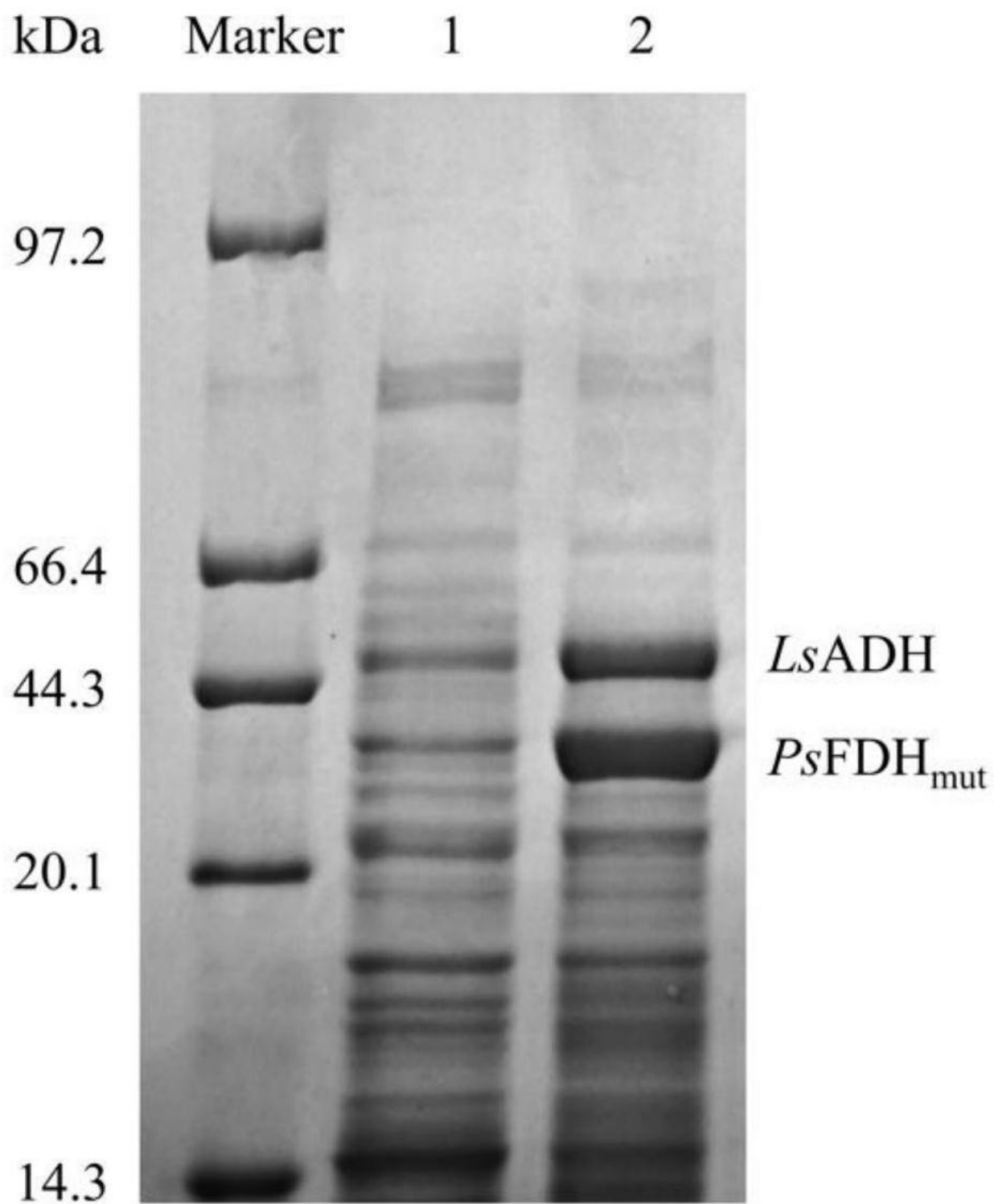


图 4

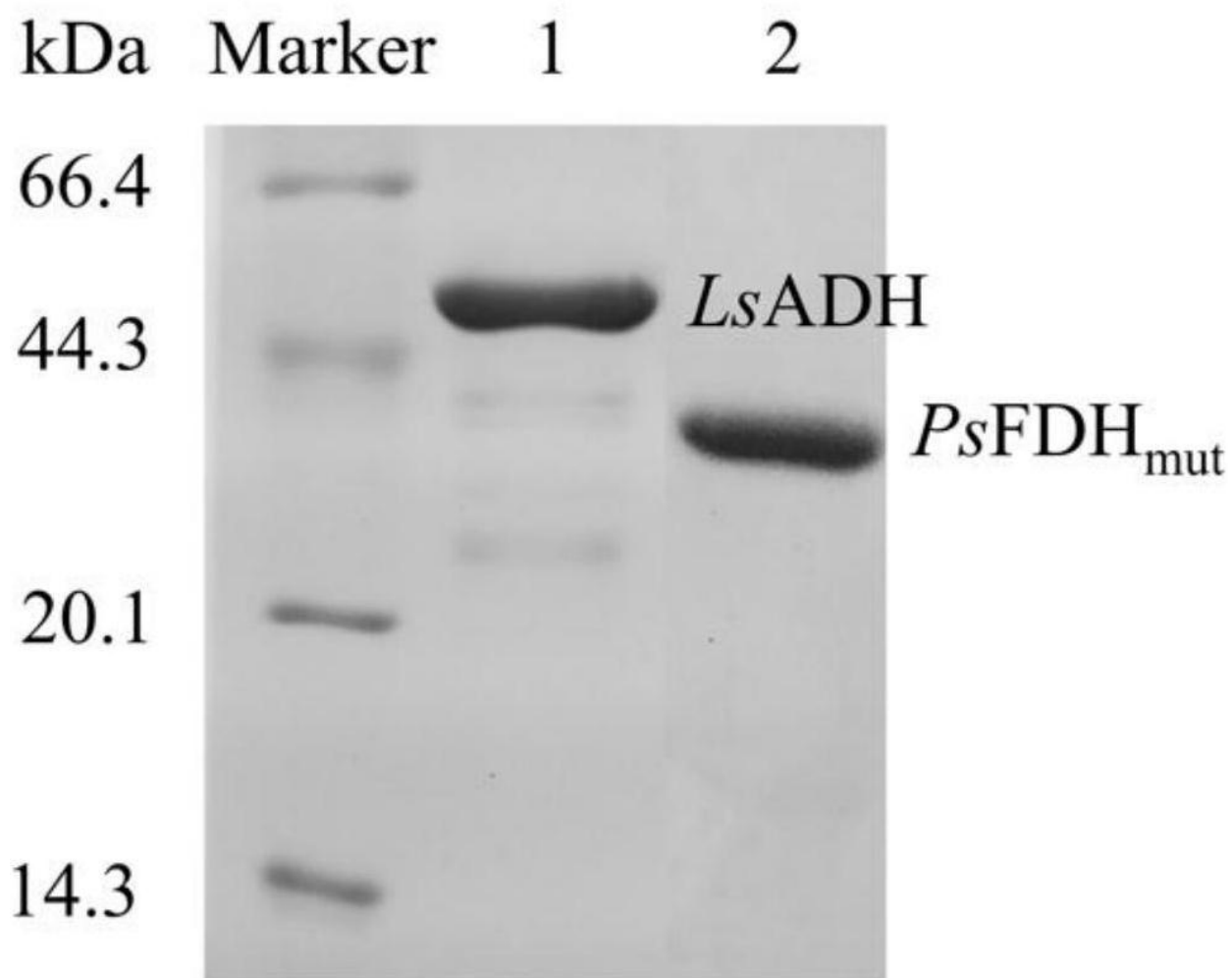


图 5