



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109576238 A  
(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811339453.1

(22)申请日 2018.11.12

(71)申请人 太原理工大学

地址 030024 山西省太原市迎泽西大街79号

(72)发明人 张建栋 赵剑伟 张朝峰 常宏宏

(74)专利代理机构 太原晋科知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 14110

代理人 任林芳 翟冲燕

(51) Int. Cl.

C12N 9/10(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12P 13/00(2006.01)

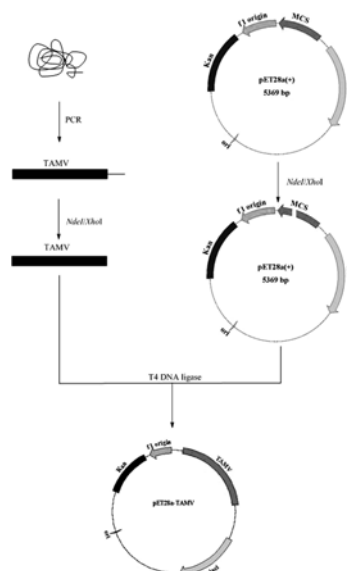
权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图7页

(54)发明名称

一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用

(57)摘要

本发明属生物技术领域,提供一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用,重组转氨酶来源于结核分枝杆菌,重组转氨酶的制备方法为:将编码所述转氨酶的基因插入到质粒中得到重组表达载体;将所述重组表达载体转移到宿主微生物中得到基因工程菌;培养基因工程菌得到重组转氨酶;其中:重组表达载体为pET系列载体;宿主微生物为大肠杆菌*E. coli*。该酶的基因序列总共包含1020 bp碱基,编码339个氨基酸。对该酶进行重组表达、纯化和表征。应用该酶不对称胺化 $\alpha$ -羟酮生产(S)-苯甘氨酸产量可达到68.6 g/L/d。转氨酶用于制备手性邻氨基醇的方法简单,高效,具有潜在的工业化应用前景。



1. 一种重组转氨酶, 其特征在于: 所述重组转氨酶来源于结核分枝杆菌 (*Mycobacterium vanbaalenii*), 重组转氨酶的制备方法为: (1) 将编码所述转氨酶的基因插入到质粒中得到重组表达载体; (2) 将所述重组表达载体转移到宿主微生物中得到基因工程菌; (3) 培养基因工程菌得到重组转氨酶; 其中: 所述重组表达载体为pET系列载体; 所述的宿主微生物为大肠杆菌 *E. coli*。

2. 根据权利要求1所述的一种重组转氨酶, 其特征在于: 所述重组表达载体的构建方法为:

(1) 以来源于结核分枝杆菌 (*Mycobacterium vanbaalenii*) 的转氨酶MVTA基因序列为模板, 引物为: 上游引物为GGGAATTCCATATGGGCATCGACACTGGCACCT, 下游引物为CCGCTCGAGGTACTGAATCGCTTCAATCAGTG; 下划线部分为*NdeI*和*XhoI*酶切位点; PCR扩增得到MVTA基因; 所述转氨酶MVTA基因序列如SEQ IDNO:1所示的核苷酸序列; 该转氨酶MVTA的氨基酸序列如SEQ IDNO:2所示;

(2) 回收MVTA基因和pET载体, 用限制性内切酶*NdeI*和*XhoI*在37°C水浴中酶切2小时, 经纯化回收的目的片段与质粒在T4连接酶的作用下室温过夜连接, 得到重组表达载体pET28a-MVTA;

(3) 将重组表达载体转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 的感受态细胞中, 在含有卡纳霉素抗性的平板上对阳性重组体进行筛选, 挑取单菌落PCR验证挑选阳性子即为重组表达载体。

3. 根据权利要求2所述的一种重组转氨酶, 其特征在于: 所述pET载体为pET28a载体。

4. 权利要求1或2所述的重组转氨酶在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用, 其特征在于: 在pH为6.0-11.0的磷酸缓冲液中, 体系温度为20-65°C,  $\alpha$ -羟酮为底物, 丙酮酸为氨基受体, 5-磷酸吡哆醛即PLP为辅因子、重组转氨酶的作用下, 底物被拆分反应生成2-羟基苯乙酮, 剩下R-苯甘氨酸, 其中: 重组转氨酶在反应体系中的量为1-20U/mL; PLP在反应体系中的量为0.01-1.0mM; 丙酮酸在反应体系中的量为1-300 mM;  $\alpha$ -羟酮在反应体系中的量为1-300 mM。

5. 权利要求4所述的重组转氨酶在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用, 其特征在于: 在pH为6.0-11.0的磷酸缓冲液中, 体系温度为20-65°C, 2-羟基苯乙酮为底物, R-苯乙胺为氨基受体, 5-磷酸吡哆醛即PLP为辅因子、重组转氨酶的作用下, 底物被转化生成苯甘氨酸, 其中: 重组转氨酶在反应体系中的量为1-20U/mL; PLP在反应体系中的量为0.01-1.0mM; R-苯乙胺在反应体系中的量为1-300 mM; 2-羟基苯乙酮在反应体系中的量为1-300 mM。

6. 根据权利要求4所述的重组转氨酶在拆分外消旋苯甘氨酸中的应用, 其特征在于: 所述磷酸缓冲液pH值为8.0。

## 一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用。该酶能以外消旋邻氨基醇作为氨基供体,丙酮酸作为氨基受体,在PLP存在下,将外消旋邻氨基醇中一个对映体完全转化为羟酮,剩下另一个未反应的对映体。同时,该酶能利用胺化合物作为氨基供体, $\alpha$ -羟酮作为氨基受体,在PLP存在下,将 $\alpha$ -羟酮完全转化(S)- $\beta$ -氨基醇。

### 背景技术

[0002] 手性邻氨基醇类化合物广泛存在于天然产物和人工合成化合物中,是一类重要的药物合成中间体。近年来,随着手性化合物的快速发展,手性邻氨基醇类化合物在医药和农业等方面发挥着越来越重要的作用,主要用于不对称合成手性催化剂的配体或作为合成手性化合物中的手性砌块。如S构型的DPMPM在催化二乙基锌和苯甲醛的不对称加成反应中,产物的ee值达到了97%,而DPMPM则是由脯氨酸衍生得来的。同时,手性氨基醇化合物还是很多药物的中间体,如手性-缬氨酸作为选择性有机催化剂用于交叉羟醛缩合反应;(S)-2-氨基-1-丁醇可被用来作为手性配体合成抗结核药乙胺丁醇;(1S,2R)-顺式-1-氨基-2-茛醇作为手性拆分试剂和手性助剂用于合成HIV蛋白酶抑制剂。

[0003] 手性邻氨基醇的制备方法主要有两种:化学法和生物法。化学法主要有Sharpless胺羟化烯烃,还原氨基酸和氨基酸酯制备手性氨基醇。化学法反应条件较苛刻,需要昂贵的金属催化剂,产物收率和对映过量体ee值不高,而且容易造成环境的污染。生物法主要利用脂肪酶和转氨酶作为生物催化剂对外消旋氨基醇进行动力学拆分,酮还原酶不对称还原手性酮。转氨酶作为一种可靠酶可以被用来合成手性胺和非天然氨基酸,但是用于不对称还原羟酮合成手性邻氨基醇却鲜有报道。转氨酶(Aminotransferases, ATs)是依赖5-磷酸吡哆醛(PLP)的一种酶。转氨酶催化的转氨反应由两步反应组成,第一步反应是转醛亚胺过程,酶活性位点上赖氨酸残基上5-磷酸吡哆醛(PLP)和-NH<sub>2</sub>之间的席夫碱被氨基供体和PLP之间的席夫碱所取代形成一个外部的醛亚胺,释放出来的赖氨酸残基成为以后的催化剂,然后是1,3氢转移到从外部醛亚胺去质子化的亚胺,得到酮亚胺中间体,再将酮亚胺中间体水解释放氧化产物和5-磷酸吡哆胺(PMP)。第二步反应包括氨基受体接受氨基生成相应的胺类产品和辅酶再生的过程。转氨酶作为催化剂有着非常高的选择性和转化率,且反应条件温和,对手性邻氨基醇的高效、绿色合成具有潜在的工业化应用价值。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用,该重组转氨酶能以外消旋邻氨基醇作为氨基供体,丙酮酸作为氨基受体,在PLP存在下,将外消旋邻氨基醇中一个对映体完全转化为羟酮,剩下另一个未反应的对映体。同时,该酶能利用R-苯乙胺、丙氨酸、异丙胺等胺化合物作为氨基供体, $\alpha$ -羟酮作为氨基受体,在

PLP存在下,将 $\alpha$ -羟酮完全转化(S)- $\beta$ -氨基醇,因此该重组转氨酶可拆分外消旋邻氨基醇制备(R)- $\beta$ -邻氨基醇,也可不对称还原氨化 $\alpha$ -羟酮制备(S)- $\beta$ -氨基醇。

[0005] 本发明由如下技术方案实现的:一种重组转氨酶,所述重组转氨酶来源于结核分枝杆菌(*Mycobacterium vanbaalenii*),重组转氨酶的制备方法为:(1)将编码所述转氨酶的基因插入到质粒中得到重组表达载体;(2)将所述重组表达载体转移到宿主微生物中得到基因工程菌;(3)培养基因工程菌得到重组转氨酶;其中:所述重组表达载体为pET系列载体;所述的宿主微生物为大肠杆菌*E. coli*。

[0006] 所述重组表达载体的构建方法为:

(1)以来源于结核分枝杆菌(*Mycobacterium vanbaalenii*)的转氨酶MVTA基因序列为模板,引物为:上游引物为GGGAATTCCATATGGGCATCGACTGGCACCT,下游引物为CCGCTCGAGGTACTGAATCGCTTCAATCAGTG;下划线部分为*NdeI*和*XhoI*酶切位点;PCR扩增得到MVTA基因;所述转氨酶MVTA基因序列如SEQ IDNO:1所示的核苷酸序列;该转氨酶MVTA的氨基酸序列如SEQ IDNO:2所示;

(2)回收MVTA基因和pET载体,用限制性内切酶*NdeI*和*XhoI*在37°C水浴中酶切2小时,经纯化回收的目的片段与质粒在T4连接酶的作用下室温过夜连接,得到重组表达载体pET-MVTA;

(3)将重组表达载体转化至大肠杆菌*E. coli*的感受态细胞中,在含有卡纳霉素抗性的平板上对阳性重组体进行筛选,挑取单菌落PCR验证挑选阳性子即为重组表达载体。

[0007] 所述载体为pET系列载体。

[0008] 所述的重组转氨酶在拆分外消旋 $\beta$ -氨基醇制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用,在pH为6.0-11.0的磷酸缓冲液中,体系温度为20-65°C, $\alpha$ -羟酮为底物,丙酮酸为氨基受体,5-磷酸吡哆醛即PLP为辅因子、重组转氨酶的作用下,底物被拆分反应生成2-羟基苯乙酮,剩下(R)-苯甘氨酸,其中:重组转氨酶在反应体系中的量为1-20U/mL;PLP在反应体系中的量为0.01-1.0mM;丙酮酸在反应体系中的量为1-300 mM。所述磷酸缓冲液pH值优选为8.0。

[0009] 在pH为6.0-11.0的磷酸缓冲液中,体系温度为20-65°C,2-羟基苯乙酮为底物,R-苯乙胺、丙氨酸、异丙胺中任一化合物为氨基受体,5-磷酸吡哆醛即PLP为辅因子、重组转氨酶的作用下,底物被转化生成(S)-苯甘氨酸,其中:重组转氨酶在反应体系中的量为1-20U/mL;PLP在反应体系中的量为0.01-1.0mM;氨基供体(R-苯乙胺,丙氨酸,异丙胺)在反应体系中的量为1-300 mM;2-羟基苯乙酮在反应体系中的量为1-300 mM。

[0010] 本发明所述的重组转氨酶的基因序列总共包含1020 bp碱基,编码339个氨基酸。对该酶进行了重组表达、纯化和表征。应用该酶不对称胺化 $\alpha$ -羟酮生产(S)-苯甘氨酸产量可达到68.6 g/L/d。本发明提供的转氨酶用于制备手性邻氨基醇的方法简单,高效,具有潜在的工业化应用价值。

## 附图说明

[0011] 图1为MVTA经蛋白纯化后聚丙烯酰胺凝胶电泳结果;其中:M为低分子量蛋白,1为上清粗酶液,2为流穿液,3为平衡液,4为加入20 mM 咪唑洗脱液洗脱后的蛋白,5为加入50 mM咪唑洗脱液洗脱后的蛋白,6为加入100mM 咪唑洗脱液洗脱后的蛋白,7为加入250 mM 咪唑洗脱液洗脱后的蛋白,8为加入500 mM 咪唑洗脱液洗脱后的蛋白;

图2为MVTA最佳pH研究结果示意图；

图3为MVTA最适催化温度的研究结果示意图；

图4为不同pH对转氨酶稳定性的影响结果示意图；其中，带有“◆”的曲线为MVTA在缓冲液pH 6.0中的相对酶活；带有“■”的曲线为MVTA在缓冲液pH 7.0中的相对酶活；带有“▲”的曲线为MVTA在缓冲液pH 8.0中的相对酶活；带有“X”的曲线为MVTA在缓冲液pH 9.0中的相对酶活；带有“\*”的曲线为MVTA在缓冲液pH 10.0中的相对酶活；带有“●”的曲线为MVTA在缓冲液pH 11.0中的相对酶活；

图5为不同温度对转氨酶稳定性的影响结果示意图；带有“◆”的曲线为MVTA在4℃下的相对酶活，带有“■”的曲线为MVTA在20℃下的相对酶活，带有“▲”的曲线为MVTA在30℃下的相对酶活，带有“X”的曲线为MVTA在40℃下的相对酶活，带有“\*”的曲线为MVTA在50℃下的相对酶活。

[0012] 图6为不同二甲基亚砷浓度对转氨酶活的影响结果示意图；

图7为拆分外消旋苯甘氨酸的转化路线；

图8为表1中各化合物的结构式；

图9为MVTA不对称胺化2-羟基苯乙酮合成L-苯甘氨酸的转化路线图；

图10为表2中各化合物的结构式；

图11为所构建的重组表达载体pET28a-MVTA。

## 具体实施方式

[0013] 下面结合附图，给出本发明的较佳实施例，并予以详细描述。

[0014] SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(SK8141)购于生工生物工程(上海)股份有限公司。SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒(SK8192)购于生工生物工程(上海)股份有限公司；PCR扩增试剂dNTP, Buffer, Taq酶购于生工生物工程(上海)股份有限公司；限制性内切酶*NdeI*、*XhoI*购于Takara；连接酶和ligation buffer购于SCIENTIFIC；PCR引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司；DNA上样缓冲液，DNA标准分子量Marker购于生工生物工程(上海)股份有限公司；蛋白双染色Marker购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0015] 下列实施中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件。

[0016] 1. 在本发明的下述实施例中，使用的大肠杆菌培养基配制方法如下：

(1) LB培养基：1 L的LB液体培养基中加入10.0 g NaCl, 10.0 g胰蛋白胨, 5.0 g酵母浸粉，定容到1 L后，用pH计检测其pH，一般显酸性，然后用5 mol/L的NaOH慢慢调节pH至7.0。若是配置固体培养基，可在配好的液体培养基的基础上，按1.5%的含量加入琼脂粉。密封好后，用高压蒸汽灭菌锅在121℃下，灭菌30 min，待冷却后放在4℃低温冰箱中保存待用。

[0017] (2) TB培养基：将下列组分溶解在0.9 L水中：胰蛋白胨12 g，酵母提取物24 g，甘油4 mL。将各组分溶解后高压灭菌。冷却到60℃，再加入100 mL灭过菌的磷酸缓冲液(2.31 g的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和12.54 g的K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶于100 mL水中)。

[0018] 2. 底物2-羟基苯乙酮和产物苯甘氨酸含量的检测方法：将反应液加氯化钠到饱和，用等体积含有内标(十二烷)乙酸乙酯进行萃取，取有机相用无水硫酸钠干燥，在气相色谱仪上进行分析，在进样口250℃，柱温120℃，检测器250℃下进行检测。

[0019] 实施例1：构建重组表达载体pET28a-MVTA

根据基因序列(MVTA)设计引物,MVTA基因上游引物为GGGAATTCCATATGGGCATCGACACTG GCACCT,下游引物为CCGCTCGAGGTACTGAATCGCTTCAATCAGTG;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。下划线部分为NdeI和XhoI酶切位点。再以结核分枝杆菌*Mycobacterium vanbaalenii*基因组为模板PCR扩增得到MVTA基因,也可以为其它来源微生物的MVTA基因,PCR扩增体系为:灭菌蒸馏水40  $\mu$ L,10 xTaq plus buffer 5  $\mu$ L,dNTP 1  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,MVTA-R 1  $\mu$ L,MVTA-F 1  $\mu$ L,Taq DNA polymerase 1  $\mu$ L。PCR条件如下:在PCR仪上于95 $^{\circ}$ C预加热5分钟,使模板DNA充分变性,然后进入扩增循环。在每一个循环中,先于94 $^{\circ}$ C保持45秒钟使模板变性,然后将温度降到复性温度60 $^{\circ}$ C保持4秒钟,使引物与模板充分退火;在72 $^{\circ}$ C保持1.5分钟,使引物在模板上延伸,合成DNA完成一个循环。重复这样的循环30次,使扩增的DNA片段大量累积。最后,在72 $^{\circ}$ C保持10分钟,使产物延伸完整。琼脂糖凝胶电泳结果表明扩增得到的基因大小与理论值一致。将回收的MVTA基因和pET28a,用限制性内切酶Nde I和Xho I在37 $^{\circ}$ C水浴中酶切2小时,双酶切50  $\mu$ L反应体系为:目的基因/表达载体15  $\mu$ L,10 x buffer 5  $\mu$ L,内切酶Nde I和Xho I各1  $\mu$ L,灭菌蒸馏水28  $\mu$ L。经纯化回收的目的片段与质粒在T4连接酶的作用下室温过夜连接,酶连体系为:酶切后pET28a 3  $\mu$ L,酶切后MVTA 7  $\mu$ L,缓冲液 1  $\mu$ L,连接酶 4  $\mu$ L,灭菌蒸馏水 5  $\mu$ L。得到重组表达载体pET28a-MVTA。采用热击法将重组表达载体转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,涂布含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C培养过夜。待长出菌落后,随机挑取抗性平板上的单克隆转化子,于含相应抗生素的 LB 液体培养基中,于37  $^{\circ}$ C摇床培养 6-7 h,提取质粒,进行质粒PCR及双酶切验证。

[0020] 将重组表达载体转化至宿主微生物中制得所述重组表达转化体。所述宿主微生物可以是本领域的各种常见宿主微生物,只要该微生物可以稳定的自行复制重组表达载体,且能有效的表达所携带的本发明的MVTA基因即可。本发明中采用大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)作为宿主微生物。

[0021] 实施例2:大肠杆菌重组MVTA的表达及纯化

所述的培养重组表达转化体中所用的培养基可以是本领域内常规的任何可使转化体生长并且产生本发明MVTA的培养基,对于大肠杆菌接种时优选LB培养基,扩培时优选TB培养基。培养方法和培养条件没有特殊限制,可以根据宿主类型和培养方法等因素的不同按本领域普通知识进行选择,只要能使转化体生长并且产生本发明MVTA即可。其他培养转化体具体操作均可按本领域常规操作进行。

[0022] 大肠杆菌重组MVTA的纯化:对于大肠杆菌菌株选用下述方法:将实施例1中构建好的菌株,接种至含卡那霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r振荡培养8 h,按2%的接种量接入装有50mL TB培养基的摇瓶中,37 $^{\circ}$ C、180 r培养,当培养液的OD<sub>600</sub>达到0.6时加入终浓度为0.1mM的IPTG,20 $^{\circ}$ C,180r诱导12h。4 $^{\circ}$ C,8000 r离心5 min收集菌体,用100mM pH为7.0的磷酸钠缓冲液洗涤两次。将获得的菌体用100mM pH为7.0的磷酸钠缓冲液悬浮,冰浴中超声破碎,离心收集上清,即为MVTA的粗酶液。上清液中的重组蛋白经过镍柱进行纯化,500 mM咪唑进行洗脱,获得纯化的MVTA。分别收集超声破碎的上清液(粗酶液)及纯化后的酶液经SDS-PAGE(5%浓缩胶,12%分离胶)分离,考马斯亮蓝染色后观察结果。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图1。图1表明,重组转氨酶MVTA在上述诱导条件下有良好可溶表达,分子量大小约37kDa,因pET-28a(+)载体中携带有一段组氨酸标签,故其分子量比预测偏大。经过含不同

浓度咪唑的缓冲液洗脱,杂蛋白被逐渐洗脱,最后得到单一条带的目的蛋白。

#### [0023] 实施例3: MVTA酶活测定

利用酶标仪检测2-羟基苯乙酮的生成量计算重组转氨酶MVTA的酶活。MVTA活力测定方法如下:在1mL体系中,10mM苯甘氨酸,0.1mM PLP,10mM丙酮酸钠,0.1mM磷酸缓冲液(pH=7),30℃、200 r震荡反应5 min后按2-羟基苯乙酮含量测定方法进行测定。

[0024] MVTA转氨酶活力单位定义:在上述条件下,1mL转氨酶酶液每分钟转化底物生成1 $\mu$ mol的2-羟基苯乙酮定义为一个酶活单位(U)。

[0025] 公式:酶活(U) =  $a / (c \cdot t)$ ;比活力(U/mg) = 酶活/m;其中:a:2-羟基苯乙酮的物质的量( $\mu$ mol);t:反应时间(min);c:酶的体积(mL);m:酶液中蛋白含量(mg)。

#### [0026] 实施例4: MVTA 酶学性质

接种子液后,在20℃诱导12 h,收取菌液后进行细胞超声破碎5 min,8000 g、4℃离心5 min,取上清粗酶液,测定MVTA酶活,进行酶学性质表征。

[0027] A、MVTA最佳温度测定:分别取温度为20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃,测定MVTA的酶活,绘制酶活随温度的变化曲线,比较在不同温度条件下MVTA酶活的大小,确定MVTA的最适催化温度。实验结果如图2所示。图2表明,转氨酶MVTA的最适温度为55℃

B、MVTA最佳pH测定:分别取pH为6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0测定MVTA的酶活,绘制酶活随pH的变化曲线,比较在不同pH值条件下MVTA酶活的大小,确定MVTA的最适催化pH。实验结果如图3所示。图3表明,转氨酶MVTA的最适pH为8.0,在pH为7.0~9.0的范围内,转氨酶MVTA的酶活性能够达到70%以上。

[0028] C、MVTA温度稳定性测定:分别取温度为4℃、20℃、30℃、40℃、50℃,测定MVTA的酶活随时间的变化,绘制酶活随温度和时间的变化曲线,比较在不同温度条件下随时间变化,MVTA的残余酶活,确定MVTA的温度稳定性。实验结果如附图4所示。图4表明,在4℃和20℃时,转氨酶MVTA在热稳定性非常好,在30℃保温处理24h后,残余酶活仍可达到90%以上,在该温度下依然有良好的稳定性,50℃孵育下,酶活随着时间下降明显,4小时酶活下降了30%,24h后酶活几乎全部丧失,转氨酶MVTA对高温的耐受性较差。

[0029] D、MVTA pH稳定性测定:分别取pH为6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0测定MVTA的酶活随时间的变化,绘制酶活随pH和时间的变化曲线,比较在不同pH条件下随时间变化,MVTA的残余酶活,确定MVTA的pH稳定性。实验结果如附图5所示。图5表明,转氨酶MVTA在 pH 8.0的条件下表现出很好的稳定性,保存 24 h 仍可保持90%以上的酶活力。在酸性条件下,转氨酶MVTA保存24 h后残余酶活也达到80%,表现出较好的稳定性。。

[0030] E、不同二甲基亚砷浓度对MVTA酶活影响测定:分别取二甲基亚砷的浓度为5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%,测定MVTA的酶活,制作酶活随二甲基亚砷浓度的变化曲线,比较在不同二甲基亚砷条件下MVTA酶活的大小,实验结果如图6所示。图6表明,随着二甲基亚砷浓度的增大,转氨酶MVTA酶活显著下降,当二甲基亚砷浓度小于15%时,转氨酶MVTA酶活基本不变。

#### [0031] 实验例5: MVTA拆分外消旋苯甘氨酸的转化率及e.e.值测定

所述拆分外消旋苯甘氨酸的方法为:在磷酸缓冲液中,氨基受体丙酮酸和辅因子PLP存在下,底物被拆分反应生成2-羟基苯乙酮,剩下未反应的R-苯甘氨酸。其转化生成路线如图

7所示。图中：MVTA指转氨酶；PLP指5-磷酸吡哆醛。

[0032] 标准反应体系为1 mL的100 mM pH 8.0的磷酸钾缓冲液，含有50 mM外消旋苯甘氨酸，0.1 mM PLP，50 mM丙酮酸钠，0.1-0.3 mL MVTA酶液。反应液置于1.5mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定反应体系中2-羟基苯乙酮的含量。取反应液500μL，加氯化钠到饱和，用等体积乙酸乙酯进行萃取，充分震荡混匀后，12000 r离心5min，取有机相用无水硫酸钠干燥，用气相色谱仪测定2-羟基苯乙酮的含量，以4-二甲氨基吡啶在醋酸酐中的浓度为50 mg/mL为衍生剂，同时在40℃、700r下衍生有机相，再与饱和氯化胺溶液混合均匀后离心，取有机相，无水硫酸钠干燥后用于气相色谱仪测定底物e.e.值。实验结果如表1所示。

[0033] 实验例6：MVTA拆分外消旋2-氨基-1-丙醇的转化率及e.e.值测定：标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液，含有10 mM 2-氨基-1-丙醇，0.1 mM PLP，10 mM丙酮酸钠，4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.值。实验结果如表1所示。

[0034] 实验例7：MVTA拆分外消旋2-氨基-1-丁醇的转化率及e.e.值测定：标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液，含有10 mM 2-氨基-1-丁醇，0.1 mM PLP，10 mM丙酮酸钠，4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.值。实验结果如表1所示。

[0035] 实验例8：MVTA拆分外消旋缬氨酸的转化率及e.e.值测定：标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液，含有50 mM 外消旋缬氨酸，0.1 mM PLP，50 mM丙酮酸钠，4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.实验结果如表1所示。

[0036] 实验例9：MVTA拆分外消旋2-氨基环戊醇的转化率及e.e.值测定：标准反应体系为1 mL的100 mM pH 8.0的磷酸钾缓冲液，含有100 mM 外消旋2-氨基环戊醇，0.1 mM PLP，100 mM丙酮酸钠，4 U/mL MVTA。反应液置于1.5mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.实验结果如表1所示。

[0037] 实验例10：MVTA拆分外消旋1-氨基-2-茛醇的转化率及e.e.值测定：标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液，含有50 mM 外消旋1-氨基-2-茛醇，0.1 mM PLP，50 mM丙酮酸钠，4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中，30℃，200 r振荡反应0-24 h，隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.实验结果如表1所示。

[0038] 表1：MVTA拆分外消旋手性邻氨基醇的转化率及e.e.值



底物	浓度 (mM)	时间 (h)	转化率 (%)	未反应的底物	底物 ee (%)
1a	10	12	80	—	—
1b	10	20	53	(R)-1b	>99
1c	10	20	50	(R)-1c	>99
1c	50	24	50	(R)-1c	>99
1d	50	24	50	(R)-1d	>99
1e	100	12	50	(R,S)-1f	>99
1f	50	12	50 <sup>c</sup>	(R,S)-1i	>99 <sup>e</sup>

表中:1a:外消旋2-氨基-1-丙醇;1b:外消旋2-氨基-1-丁醇;1c:外消旋缬氨酸;1d:外消旋苯甘氨酸;1e:外消旋2-氨基环戊醇;1f:外消旋1-氨基-2-茛醇,结构式见图8。表1表明,转氨酶MVTA催化反应不同底物浓度的外消旋氨基酸类化合物((±)-1c-(±)-1f),都表现出了优秀的拆分能力,底物转化率为50%且产物对映体过量值为>99.0%,转氨酶MVTA对(R)-2-氨基-1-丁醇有微弱的活力,所以转化率略高于50%,转氨酶MVTA对2-氨基-1-丙醇的选择性较差,两种构型都可以反应。

[0039] 实验例11: MVTA不对称胺化2-羟基苯乙酮合成L-苯甘氨酸的转化率及e.e.值测定:在磷酸缓冲液中,氨基受体R-苯乙胺和辅因子PLP存在下,底物2-羟基苯乙酮被转氨酶转化生成苯甘氨酸。其转化生成路线如图9。

[0040] 标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液,含有100 mM 2-羟基苯乙酮,0.1 mM PLP,100 mM R-苯乙胺,0.1-0.3 mL MVTA酶液。反应液置于1.5 mL离心管中,30 °C,200 r振荡反应0-24 h,隔不同时间进行取样测定反应体系中L-苯甘氨酸的含量。取反应液500 μL,加氯化钠到饱和,用等体积乙酸乙酯进行萃取,充分震荡混匀后,12000 r离心5 min,取有机相用无水硫酸钠干燥,用气相色谱仪测定L-苯甘氨酸的含量,以4-二甲氨基吡啶在醋酸酐中的浓度为50 mg/mL为衍生剂,同时在40 °C、700 r下衍生有机相,再与饱和氯化胺溶液混合均匀后离心,取有机相,无水硫酸钠干燥后用于气相色谱仪测定底物e.e.值。实验结果如表2所示。

[0041] 实验例12: MVTA不对称胺化1-羟基-2-丁酮合成S-2-氨基-1-丁醇的转化率及e.e.值测定:标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液,含有10 mM 1-羟基-2-丁酮,0.1 mM PLP,10 mM R-苯乙胺,4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中,30 °C,200 r振荡反应0-24 h,隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.值。实验结果如表2所示。:

实验例13: MVTA不对称胺化1-羟基-3-甲基丁烷-2-酮合成L-缬氨酸的转化率及e.e.值测定:标准反应体系为1 mL的100 mM pH8.0的磷酸钾缓冲液,含有50 mM 1-羟基-3-甲基丁烷-2-酮,0.1 mM PLP,50 mM R-苯乙胺,4 U/mL MVTA。反应液置于1.5 mL离心管中,30 °C,

200 r振荡反应0-24 h,隔不同时间进行取样测定转化率和e.e.值。实验结果如表2所示。

[0042] 表2: MVTA不对称胺化羟酮合成手性邻氨基醇的转化率及e.e.值

底物	浓度 (mM)	时间 (h)	转化率 (%) <sup>b</sup>	产物构型	产物ee (%) <sup>c</sup>
2b	10	12	90.0	(S)-1b	>99
2c	50	12	99.0	(S)-1c	>99
2d	100	3	92.0	(S)-1d	>99

表中: 2b: 1-羟基-2-丁酮; 2c: 1-羟基-3-甲基丁烷-2-酮; 2d: 2-羟基苯乙酮; 其结构式为图10。表2表明转氨酶转化底物2b-2d生成对应的邻氨基醇转化率都达到90%以上, 且产物对映体过量值均>99%。因此该反应有较高的转化率且反应条件温和高效, 在不对称胺化羟酮合成手性邻氨基醇中有良好的应用潜力。

## 序列表

&lt;110&gt; 太原理工大学

<120> 一种重组转氨酶及其在不对称胺化 $\alpha$ -羟酮制备手性 $\beta$ -氨基醇中的应用

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1022

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 1

```

catatgggca tcgacactgg cacctcgaac ctggtggcgg tggagccggg ggcgattcgc 60
gaggacacac cggcaggcag cgtcatccag tattecgatt acgagattga ttacagctcg 120
ccgttcgcgg gcggcgtggc gtggattgag ggtgagtacc tgccggccga agatgcgaaa 180
attagcatct tcgacaccgg tttcggccac tcggacctga cctacacggt ggcgcacggt 240
tggcacggca acattttccg cttgggggat cacctggacc gcctgctcga cggcgcacgg 300
aagctccgcc tggacagcgg ctacaccaaa gacgagctcg ccgacatcac caagaagtgc 360
gtgagcctga gccagctgcg tgaaagcttc gtgaacctga ccatcaccgg cgggtacggc 420
aagcgcaagg gggaaaagga cctgagcaag ctgaccacc aagtgtacat ttacgccatt 480
ccgtatctgt gggcgttccc cccggcggag cagatcttcg gcaccaccgc ggtggtgccg 540
cgccacgtgc gccgcgccgg ccgcaatacc gtggaccgga ccatcaagaa ctaccagtgg 600
ggcgacctga ccgcggccag cttcgaggct aaggatcggg gcgcgcgcac cgccattctg 660
atggacgcgg acaactgcgt cgcggagggc ccgggattca acgtgtgcat tgtgaaggac 720
ggcaagctgg caagcccgtc ccgcaacgcg ctgccgggca tcaccgcaa gaccgtgttc 780
gagattgcgg gagccatggg aattgaagcg gcgctccgcg acgtgacctc ccatgagctg 840
tacgacgccg acgagattat ggcggtgacc accgcgggcg gcgtgacccc gattaacacc 900
ctggacggcg tgccgatcgg cgacggcgag ccgggtccgg tgaccgtggc gattcgcgac 960
cgcttctggg cgctgatgga cgagccgggg cactgattg aagcgattca gtacgcggcc 1020
gc 1022

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 337

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

```

Met Gly Ile Asp Thr Gly Thr Ser Asn Leu Val Ala Val Glu Pro Gly
1           5           10           15
Ala Ile Arg Glu Asp Thr Pro Ala Gly Ser Val Ile Gln Tyr Ser Asp
           20           25           30
Tyr Glu Ile Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Gly Gly Val Ala Trp Ile

```

35	40	45
Glu Gly Glu Tyr Leu Pro Ala	Glu Asp Ala Lys Ile Ser	Ile Phe Asp
50	55	60
Thr Gly Phe Gly His Ser Asp	Leu Thr Tyr Thr Val Ala	His Val Trp
65	70	75
His Gly Asn Ile Phe Arg Leu	Gly Asp His Leu Asp Arg	Leu Leu Asp
85	90	95
Gly Ala Arg Lys Leu Arg Leu	Asp Ser Gly Tyr Thr Lys	Asp Glu Leu
100	105	110
Ala Asp Ile Thr Lys Lys Cys	Val Ser Leu Ser Gln Leu	Arg Glu Ser
115	120	125
Phe Val Asn Leu Thr Ile Thr	Arg Gly Tyr Gly Lys Arg	Lys Gly Glu
130	135	140
Lys Asp Leu Ser Lys Leu Thr	His Gln Val Tyr Ile Tyr	Ala Ile Pro
145	150	155
Tyr Leu Trp Ala Phe Pro Pro	Ala Glu Gln Ile Phe Gly	Thr Thr Ala
165	170	175
Val Val Pro Arg His Val Arg	Arg Ala Gly Arg Asn Thr	Val Asp Pro
180	185	190
Thr Ile Lys Asn Tyr Gln Trp	Gly Asp Leu Thr Ala Ala	Ser Phe Glu
195	200	205
Ala Lys Asp Arg Gly Ala Arg	Thr Ala Ile Leu Met Asp	Ala Asp Asn
210	215	220
Cys Val Ala Glu Gly Pro Gly	Phe Asn Val Cys Ile Val	Lys Asp Gly
225	230	235
Lys Leu Ala Ser Pro Ser Arg	Asn Ala Leu Pro Gly Ile	Thr Arg Lys
245	250	255
Thr Val Phe Glu Ile Ala Gly	Ala Met Gly Ile Glu Ala	Ala Leu Arg
260	265	270
Asp Val Thr Ser His Glu Leu	Tyr Asp Ala Asp Glu Ile	Met Ala Val
275	280	285
Thr Thr Ala Gly Gly Val Thr	Pro Ile Asn Thr Leu Asp	Gly Val Pro
290	295	300
Ile Gly Asp Gly Glu Pro Gly	Pro Val Thr Val Ala Ile	Arg Asp Arg
305	310	315
Phe Trp Ala Leu Met Asp Glu	Pro Gly Pro Leu Ile Glu	Ala Ile Gln
325	330	335
Tyr		

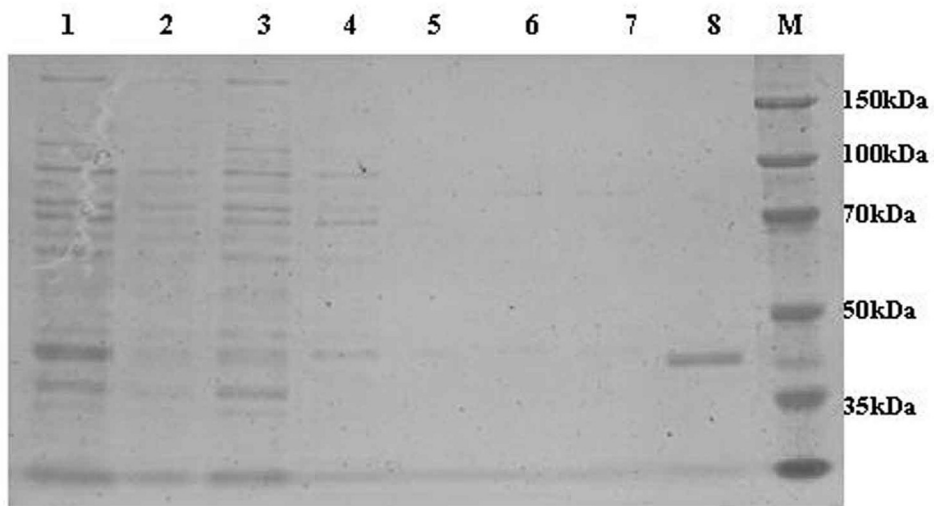


图1

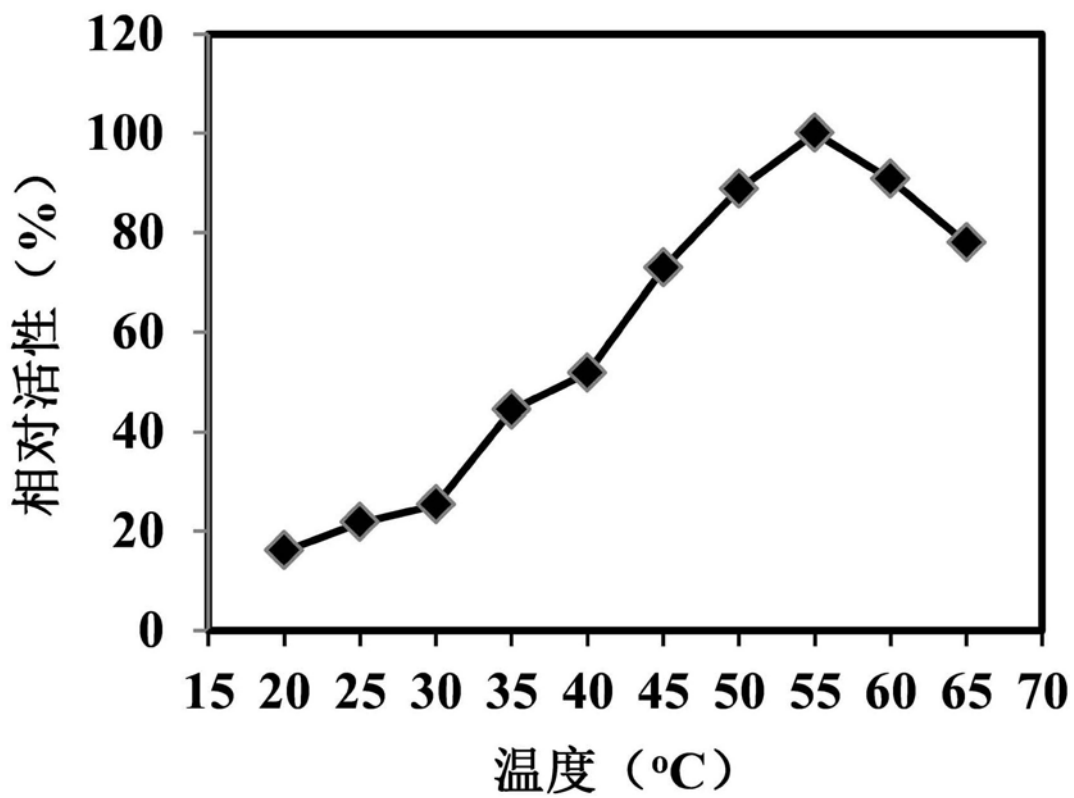


图2

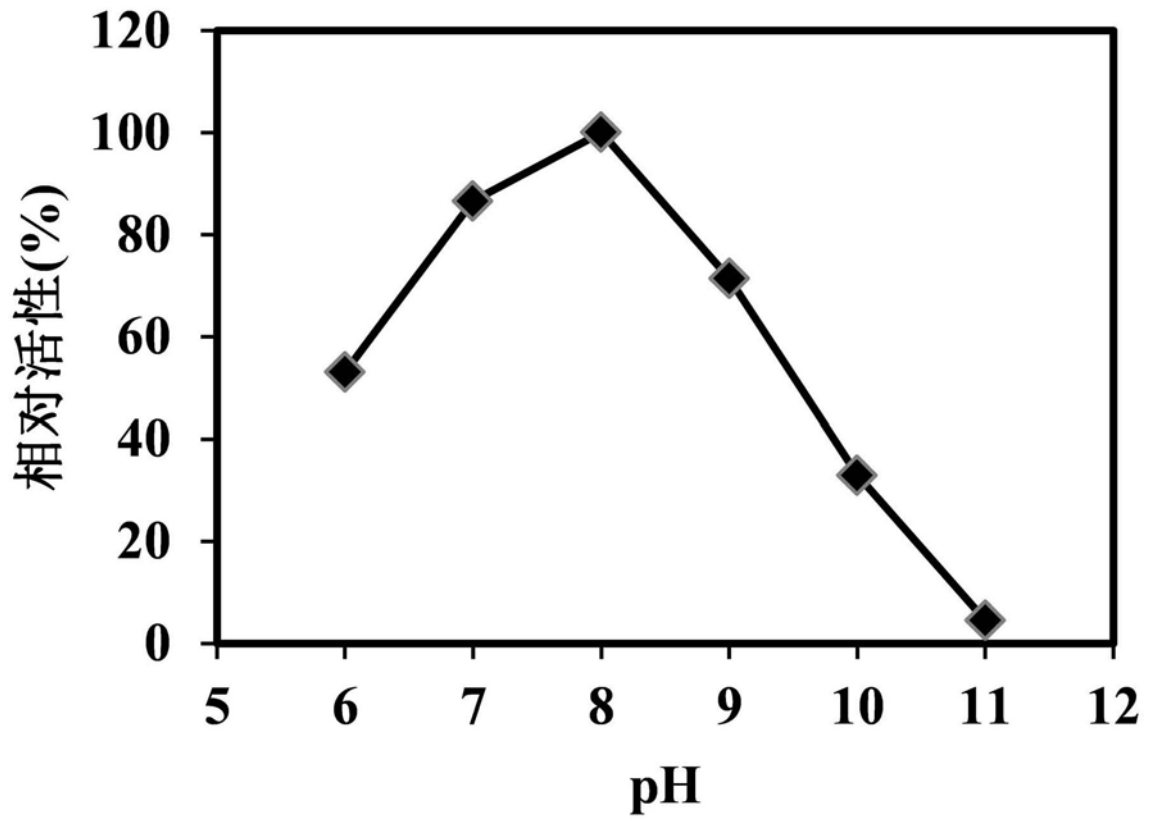


图3

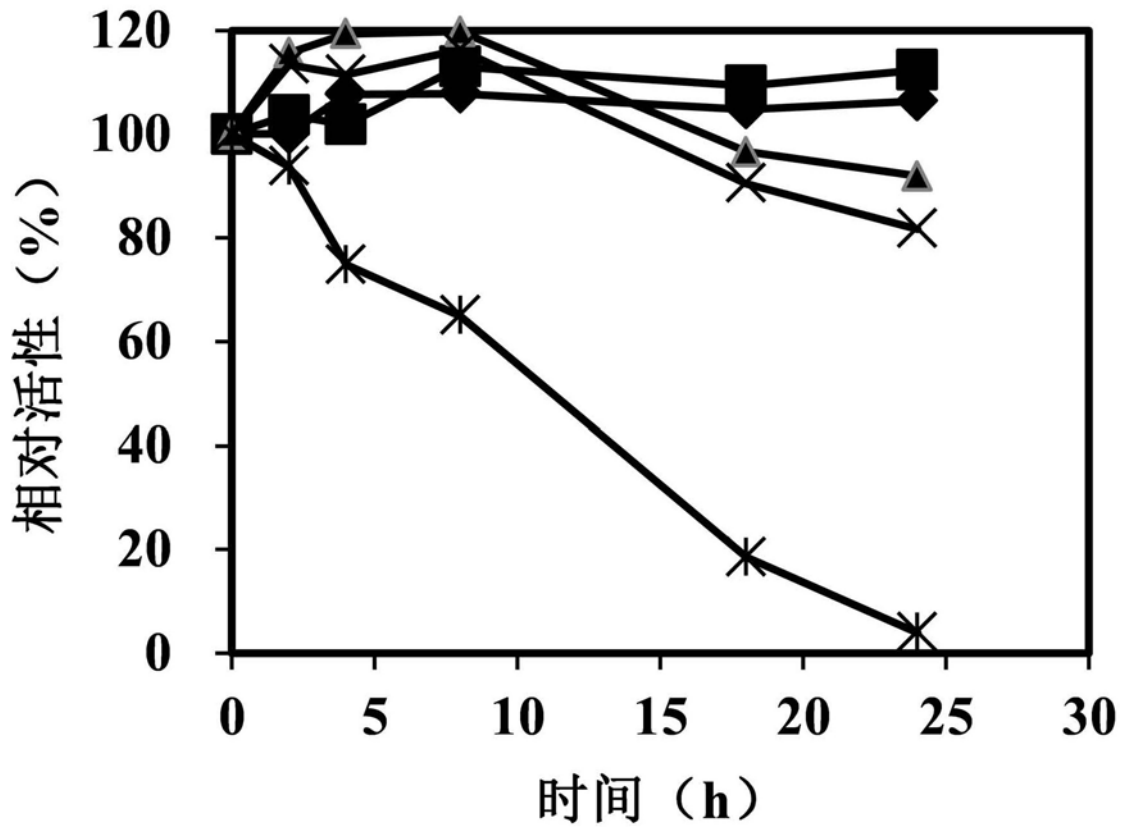


图4

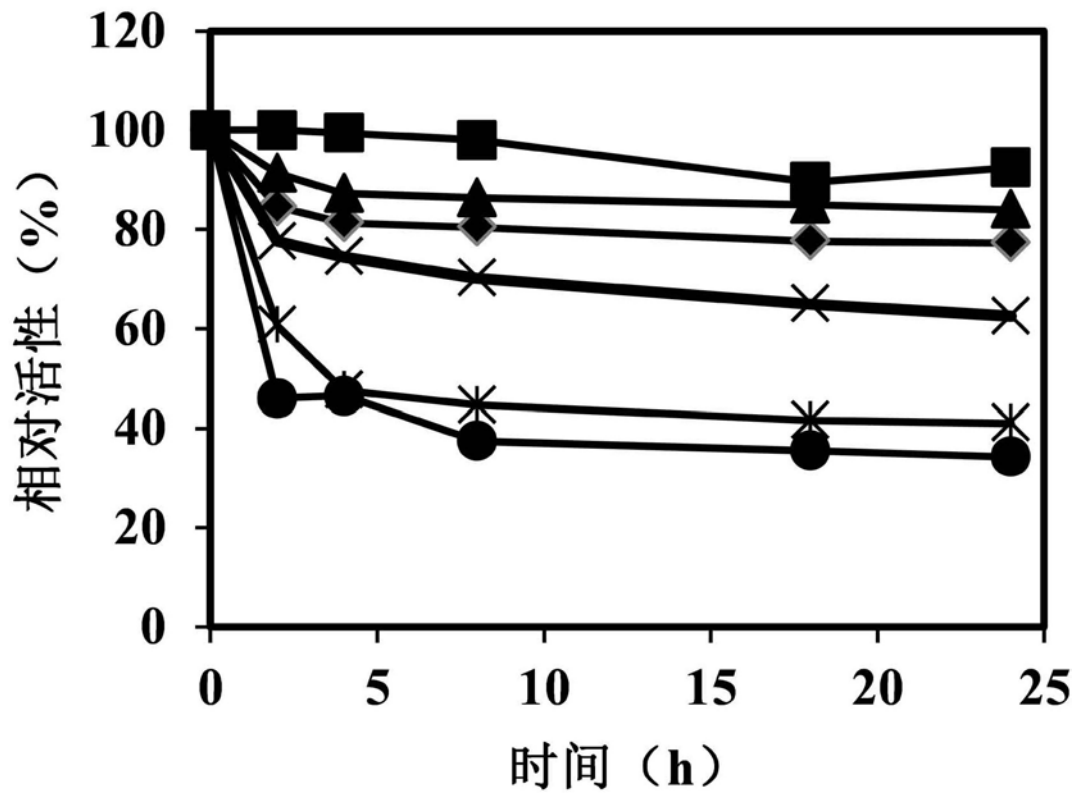


图5



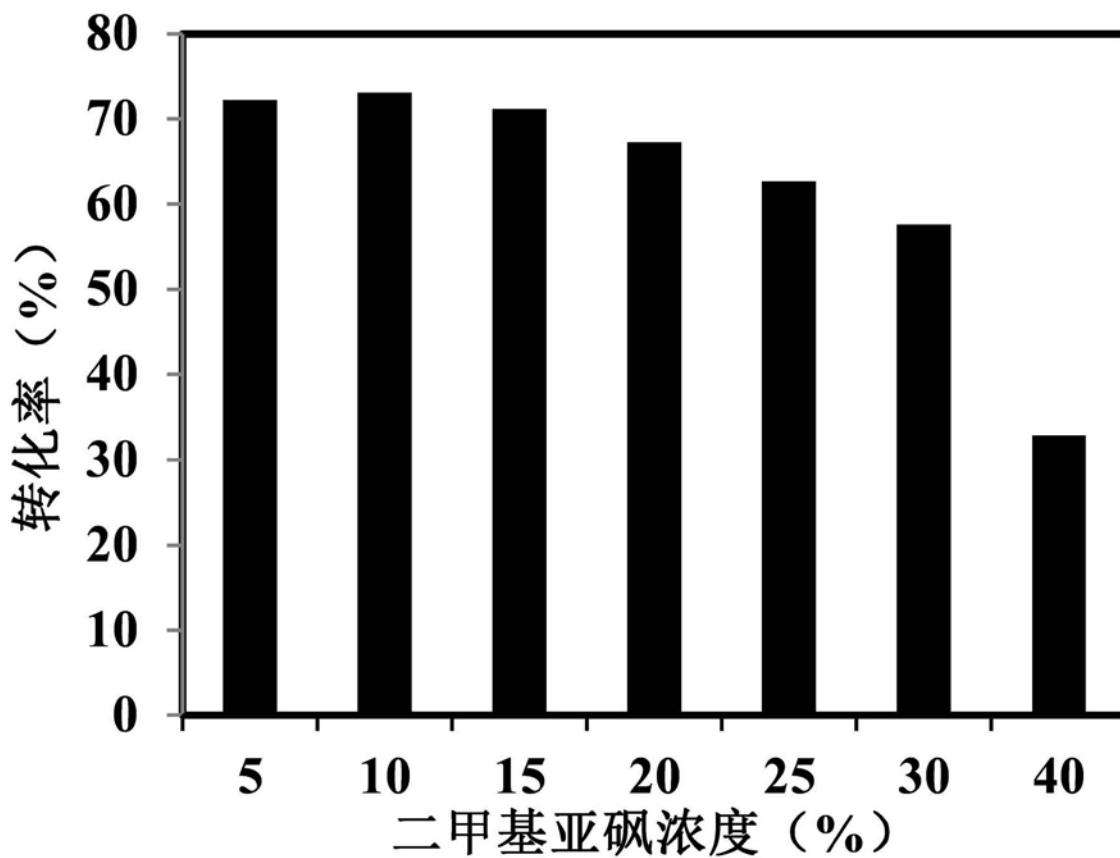


图6

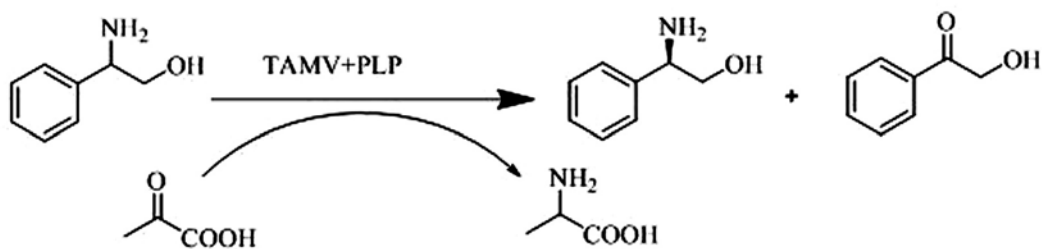


图7

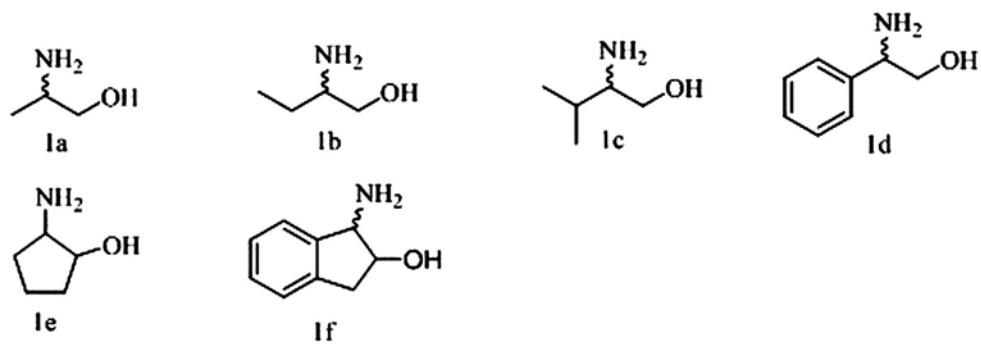


图8

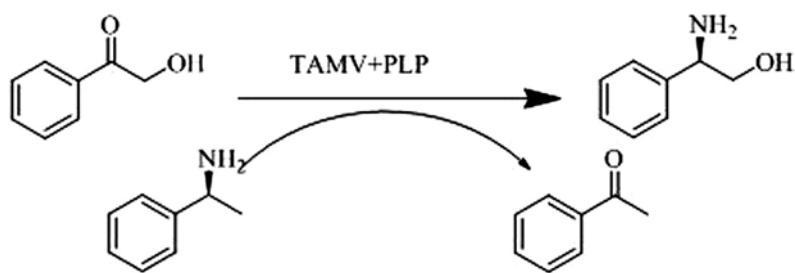


图9

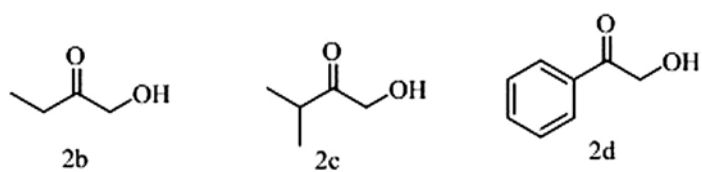


图10

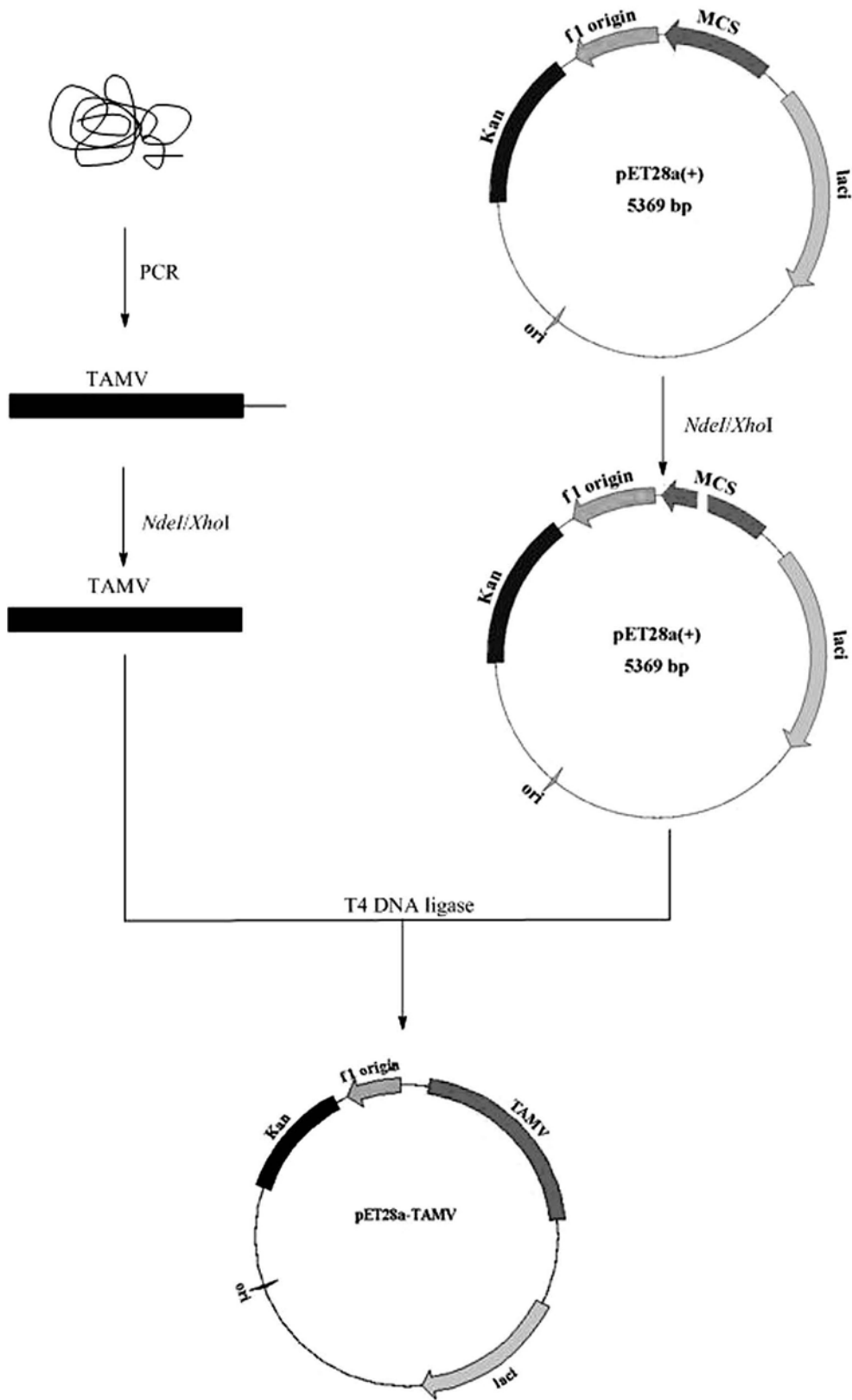


图11