



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112941045 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202110168351.3

C12N 15/70 (2006.01)

(22) 申请日 2021.02.05

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112941045 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(73) 专利权人 南京红杉生物科技有限公司

地址 210046 江苏省南京市栖霞区纬地路9号F6栋202室

(72) 发明人 吴法浩 李钢 高仰哲 张吉磊 王志航

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463

专利代理师 陈秋梦

## (56) 对比文件

CN 105452475 A, 2016.03.30

CN 105969746 A, 2016.09.28

CN 108823179 A, 2018.11.16

CN 109576238 A, 2019.04.05

CN 109666715 A, 2019.04.23

CN 110172484 A, 2019.08.27

CN 110713965 A, 2020.01.21

CN 112280761 A, 2021.01.29

US 2017067084 A1, 2017.03.09

US 5169780 A, 1992.12.08

审查员 黄炎

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

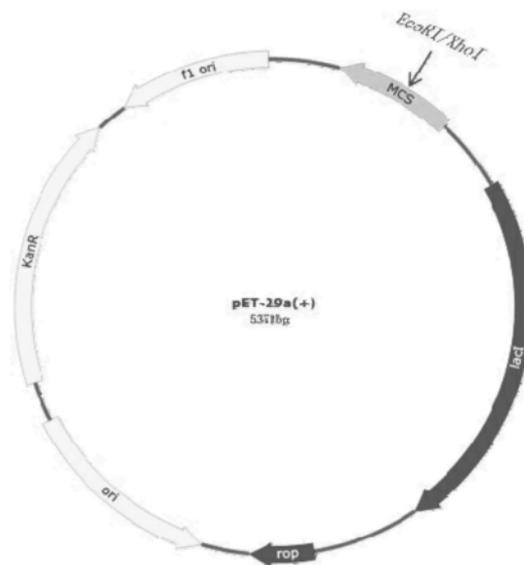
序列表3页 附图3页

## (54) 发明名称

一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法,涉及苯甘氨酸合成技术领域。该重组转氨酶对于底物的耐受度较高,且在较高的底物浓度下,仍可以保证较高纯度和较高收率的产物制备。相较于现有技术中化学法还原氨基酸和氨基酸酯制备手性氨基醇的方法,具有工艺流程简单,环境压力小的优势。与现有的酶法制备相比,本发明提供的合成L-苯甘氨酸的方法具有底物耐受度高,生产效率高,转化率高,适于工业化生产的优势。



1. 一种重组转氨酶,其特征在于,所述重组转氨酶的编码基因如SEQ ID NO.1所示。
2. 根据权利要求1所述的重组转氨酶,其特征在于,编码所述重组转氨酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
3. 一种如权利要求1或2所述的重组转氨酶的制备方法,其特征在于,所述重组转氨酶的制备方法包括:  
将插入有所述重组转氨酶的编码基因的重组表达载体转入宿主微生物中得到基因工程菌,培养所述基因工程菌获得重组转氨酶。
4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述重组表达载体为pET系列载体。
5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述重组表达载体为pET-29a或pET-28a载体。
6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述宿主微生物为大肠杆菌*E. coli*。
7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述宿主微生物为大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 的感受态细胞或大肠杆菌*E. coli* BL21的感受态细胞。
8. 一种使用重组转氨酶不对称胺化2-羟基苯乙酮合成L-苯甘氨酸的方法,其特征在于,所述重组转氨酶为权利要求1-2任一项所述的重组转氨酶或权利要求3-7任一项所述的制备方法制得的重组转氨酶。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法包括:在缓冲溶液中,以2-羟基苯乙酮为底物,异丙胺作为氨基供体,PLP作为辅酶,在重组转氨酶的作用下,在25 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C温度下反应。
10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,反应后的产物经过萃取,收集酯层,浓缩得到L-苯甘氨酸;  
所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲液。
11. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述底物的浓度为1mM-400mM,所述异丙胺的添加量与所述底物添加量的摩尔比为1-1.3:1。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述异丙胺的添加量与所述底物添加量的摩尔比为1-1.2:1。
13. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述PLP在反应体系中的添加量为0.1mM-0.5mM,所述重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的15%-35%。
14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的25%-30%;  
所述磷酸盐缓冲液的pH为7.0-8.5。
15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液的pH为7.5-8.5。
16. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述反应是在振荡条件下反应10-24h,所述萃取步骤的萃取剂为乙酸乙酯;所述振荡的转速为200-300rpm。
17. 根据权利要求16所述的方法,其特征在于,萃取后浓缩前,还包括:先将酯层用饱和盐水洗涤,干燥后进行浓缩。
18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述干燥是用无水硫酸钠进行干燥,所述浓缩是采用真空浓缩的方法;  
在反应结束后用氢氧化钠调节反应产物的pH $\geq$ 11。

## 一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及苯甘氨酸合成技术领域,具体而言,涉及一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法。

### 背景技术

[0002] 目前,苯甘氨酸的主要合成方法有化学合成法和生物酶制备方法。其中,化学法主要有还原氨基酸和氨基酸酯制备手性氨基醇。例如:以D-苯甘氨酸、L-苯甘氨酸和苯甘氨酸甲酯为底物,通过硼氢化钠、红铝溶液等昂贵的还原剂制备,此类方法反应条件较为苛刻,且容易造成环境的污染。而另一种方法是使用2-羟基苯乙酮合成2-羟基-1-苯基乙酮肟,再通过氢化铝锂催化合成苯甘氨酸,存在收率低的问题,仅为15.98%。

[0003] 专利CN201811339453.1公开了一种生物酶合成苯甘氨酸的方法。使用2-羟基苯乙酮为原料,通过转氨酶合成苯甘氨酸。虽然该方法相较于以上几种化学法具有较高的收率及纯度,且具有环境危害小的特点,但是其反应体系中所用的酶对于底物的耐受度较低,导致底物浓度只能达到100mM,而超过该浓度时转化率会逐渐降低,300mM时的转化率为71%,生产效率较低,且所用氨基供体苯乙胺价格也较高,提高了生产成本,不利于工业化大规模的生产。

[0004] 鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法以解决上述技术问题。

[0006] 本发明是这样实现的:

[0007] 本发明提供了一种重组转氨酶,重组转氨酶的编码基因如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述编码重组转氨酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 本发明提供了一种重组转氨酶的制备方法,重组转氨酶的制备方法包括:将插入有重组转氨酶的编码基因的重组表达载体转入宿主微生物中得到基因工程菌,培养基因工程菌获得重组转氨酶。

[0010] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述重组表达载体为pET系列载体。

[0011] 可选的,重组表达载体为pET-29a或pET-28a载体。

[0012] 优选地,宿主微生物为大肠杆菌E.coli。

[0013] 优选地,宿主微生物为大肠杆菌E.coli DH5 $\alpha$ 的感受态细胞或大肠杆菌E.coli BL21的感受态细胞。

[0014] 本发明提供了一种使用重组转氨酶不对称胺化2-羟基苯乙酮合成L-苯甘氨酸的方法。

[0015] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述方法包括:在缓冲溶液中,以2-羟基苯乙酮

为底物,异丙胺作为氨基供体,PLP作为辅酶,在重组转氨酶的作用下,在25℃-40℃温度下反应;

[0016] 优选地,反应后的产物经过萃取,收集酯层,浓缩得到L-苯甘氨酸;

[0017] 优选地,缓冲溶液为磷酸盐缓冲液。

[0018] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述底物的浓度为1mM-400mM,异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1-1.3:1;

[0019] 优选地,异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1-1.2:1。

[0020] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述PLP在反应体系中的添加量为0.1mM-0.5mM,重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的15%-35%;优选地,重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的25%-30%;

[0021] 优选地,磷酸缓冲溶液的pH为7.0-8.5;优选地,磷酸缓冲溶液的pH为7.5-8.5。

[0022] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述反应是在振荡条件下反应10-24h,萃取步骤的萃取剂为乙酸乙酯;优选地,振荡转速为200-300rpm;

[0023] 优选地,萃取后浓缩前,还包括:先将酯层用饱和盐水洗涤,干燥后进行浓缩;

[0024] 优选地,干燥是用无水硫酸钠进行干燥,浓缩是采用真空浓缩的方法;

[0025] 优选地,在反应结束后用氢氧化钠调节反应产物的pH $\geq$ 11。

[0026] 本发明具有以下有益效果:

[0027] 本发明提供了一种重组转氨酶,该重组转氨酶对于底物的耐受度较高,且在较高的底物浓度下,仍可以保证较高纯度和较高收率的产物制备。相较于现有技术中化学法还原氨基酸和氨基酸酯制备手性氨基醇的方法,具有工艺流程简单,环境压力小的优势。与现有的酶法制备相比,本发明提供的合成L-苯甘氨酸的方法具有底物耐受度高,生产效率高,转化率高,适于工业化生产的优势。

## 附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,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相关的附图。

[0029] 图1为pET-29a(+)质粒载体图;

[0030] 图2为上清重组转氨酶酶液的SDS-PAGE电泳图;

[0031] 图3为合成流程示意图;

[0032] 图4为产物L-苯甘氨酸的色谱峰图。

## 具体实施方式

[0033] 现将详细地提供本发明实施方式的参考,其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上,对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如,作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中,来产生更进一步的实施方式。

[0034] 本发明提供了一种重组转氨酶,重组转氨酶来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas*

putida), 重组转氨酶的编码基因如SEQ ID NO.1所示。

[0035] 本发明对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* NBRC 14164)的转氨酶的原始编码基因进行了优化, 优化后的重组转氨酶的编码基因如SEQ ID NO.1所示, 编码基因全长为1524bp。优化后, 上述编码重组转氨酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示, 共508个氨基酸。

[0036] 本发明提供了一种重组转氨酶的制备方法, 重组转氨酶的制备方法包括: 将编码重组转氨酶的基因插入到重组表达载体, 然后将重组表达载体转入宿主微生物中得到基因工程菌, 培养基因工程菌获得重组转氨酶。

[0037] 在本发明应用较佳的实施方式中, 上述重组表达载体为pET系列载体。

[0038] 可选的, 重组表达载体为pET-29a或pET-28a载体。在其他实施方式中, 上述的重组表达载体还可以是pET-39b或pET-17b载体, 并不限于上述列举的几种重组表达载体的类型, 只要能满足大肠杆菌蛋白表达均可行。

[0039] 优选地, 宿主微生物为大肠杆菌*E. coli*。

[0040] 优选地, 宿主微生物为大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 的感受态细胞或大肠杆菌*E. coli* BL21的感受态细胞。在其他的实施方式中, 上述的宿主微生物还可以根据需要进行选择其他的感受态细胞, 并不限于上述的两种感受态细胞。

[0041] 可选的, 将优化后的SEQ ID NO.1所示的基因序列通过EcoRI/XhoI插入pET-29a (+) 质粒, 将重组质粒载体转入至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 得到可以诱导转氨酶的基因工程菌。

[0042] 在其他实施方式中, 也可以根据需要设置其他的限制性核酸内切酶位点, 用于酶切连接, 并不限于本发明中上述列举的两种酶切位点。

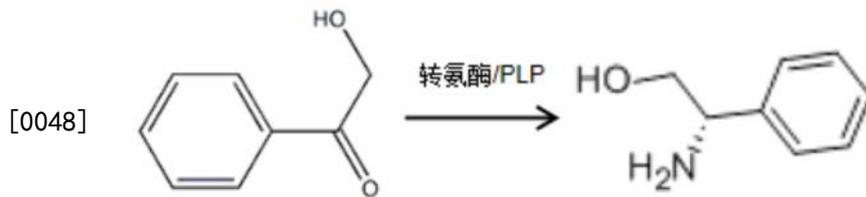
[0043] 将构建好的可以诱导转氨酶的基因工程菌, 接种至含卡那霉素的LB培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、200rpm下培养10h后, 按2%的接种量接入装有TB培养基的摇瓶中。在37 $^{\circ}$ C、200rpm摇床培养, 当培养液的OD600达到0.6-0.8时加入浓度为0.2mM的IPTG, 20 $^{\circ}$ C, 180rpm下诱导12h。在4 $^{\circ}$ C, 8000rpm下离心10min或6000rpm离心20min收集上清菌体, 用100mM pH为7.0的磷酸钠缓冲液洗涤两次。将获得的菌体用100mM pH为7.0的磷酸钠缓冲液悬浮, 冰浴中超声破碎, 离心收集上清, 得到重组转氨酶酶液。

[0044] 需要说明的是, 上述的重组转氨酶酶液的获得仅为其中一种实施方式, 在其他实施方式中, 上述的重组转氨酶酶液也可根据基因工程菌的类型选择其他的培养方法及对应的培养条件。

[0045] 本发明提供了一种使用重组转氨酶不对称胺化2-羟基苯乙酮合成L-苯甘氨酸的方法。

[0046] 上述的方法包括: 在磷酸缓冲溶液中, 以2-羟基苯乙酮为底物, 异丙胺作为氨基供体, PLP作为辅酶, 在重组转氨酶的作用下, 在25 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C温度下反应, 反应后的产物经过萃取, 收集酯层, 浓缩得到L-苯甘氨酸。

[0047] PLP即为5-磷酸吡哆醛, 在重组转氨酶和PLP辅酶的作用下, 以2-羟基苯乙酮为底物, 异丙胺作为氨基供体, 合成L-苯甘氨酸。反应方程如下所示:



[0049] 反应温度保持在25℃-40℃温度时产物的收率较高,而当反应温度低于25℃或者高于40℃时,产物的收率下降明显。在其他实施方式中,上述的反应温度可以是25℃、27℃、29℃、30℃、32℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃或40℃。

[0050] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述底物的浓度为1mM-400mM,异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1-1.3:1;

[0051] 优选地,异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1-1.2:1。可选的,异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1:1,1.1:1或1.2:1。

[0052] 发明人发现当底物浓度在400mM以内时,L-苯甘氨酸的收率及纯度都保持在较高的水平,而当底物浓度达到450mM时,收率虽然能达到80%以上,但产物的纯度有所下降,因此,底物浓度保持在400mM以内为较佳的应用范围。

[0053] 当异丙胺的添加量与底物添加量的摩尔比为1-1.2:1,产物收率较高,当异丙胺的添加量增加到1.3摩尔倍数时,产物的收率开始有所下降。发明人发现选择异丙胺作为氨基供体,产物的收率和纯度有了明显的提升,而氨水、D-丙氨酸以及R-苯乙胺均无法达到与异丙胺相当的产物收率和纯度。

[0054] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述PLP在反应体系中的添加量为0.1mM-0.5mM,重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的15%-35%;优选地,重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的25%-30%。

[0055] 发明人发现当转氨酶用量在底物质量的15%以下时,产物无法彻底转化,产物的收率及纯度较低,当转氨酶用量在底物质量的15%以上时,产物的收率逐渐提高。转氨酶用量超过底物质量的35%时,成本较高。

[0056] 优选地,磷酸缓冲溶液的pH为7.0-8.5;优选地,磷酸缓冲溶液的pH为7.5-8.5。可选的,磷酸缓冲溶液的pH为7.5,7.8,8,8.2或8.5。

[0057] 发明人发现,当磷酸缓冲溶液的pH保持在7.5-8.5时,重组转氨酶的活性较高,产物的收率可达到90%左右的水平,当磷酸缓冲溶液的pH在7以下或8.5以上的条件时,产物的收率及纯度下降明显。

[0058] 在本发明应用较佳的实施方式中,上述反应是在振荡条件下反应10-24h,萃取步骤的萃取剂为乙酸乙酯;优选地,振荡转速为200-300rpm。

[0059] 通过震荡反应以促使反应更为彻底的进行。在其他实施方式中,上述震荡的转速可以根据需要进行自适应调整,并不限于本发明限定的震荡参数范围。

[0060] 优选地,萃取后浓缩前,还包括:先将酯层用饱和盐水洗涤,干燥后进行浓缩。用盐水洗涤的目的是使得蛋白质盐析出。

[0061] 优选地,干燥是用无水硫酸钠进行干燥,浓缩是采用真空浓缩的方法。在其他实施方式中,也可以选自其他的干燥剂进行干燥,例如硅胶干燥剂、无水氯化钙等干燥剂。

[0062] 优选地,在反应结束后用氢氧化钠调节反应产物的pH $\geq$ 11。此步骤的目的在于萃

取产品。

[0063] 本发明提供了一种重组转氨酶在不对称胺化2-羟基苯乙酮制备L-苯甘氨酸中的应用。可选的,上述应用是指利用本发明中的重组转氨酶制备L-苯甘氨酸的应用。

[0064] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0065] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0066] 实施例1

[0067] 本实施例提供了一种重组转氨酶。如下为重组转氨酶的制备过程:

[0068] 本实施例先对来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* NBRC14164)的转氨酶的原始编码基因进行了优化,优化后的重组转氨酶的编码基因如SEQ ID NO.1所示,编码基因全长为1524bp。优化后,上述编码重组转氨酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,共508个氨基酸。

[0069] 将上述优化后的SEQ ID NO.1所示的基因序列通过EcoRI/XhoI插入pET-29a(+)质粒,将重组质粒载体转入至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,得到可以诱导转氨酶的基因工程菌。

[0070] pET-29a(+)质粒的载体图参照图1所示。

[0071] 将构建好的可以诱导转氨酶的基因工程菌,接种至含卡那霉素的LB培养基中,在37 $^{\circ}$ C、200rpm下培养10h后,按2%的接种量接入装有TB培养基的摇瓶中。在37 $^{\circ}$ C、200rpm摇床培养,当培养液的OD<sub>600</sub>达到0.6-0.8时加入浓度为0.2mM的IPTG,20 $^{\circ}$ C,180rpm下诱导12h。在4 $^{\circ}$ C,8000rpm下离心10min或6000rpm离心20min收集上清菌体,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,得到重组转氨酶酶液。

[0072] 上清重组转氨酶酶液的SDS-PAGE电泳图参照图2所示,由图2可知,重组转氨酶的蛋白大小为57KD。

[0073] 本实施例中所使用的LB平板培养基配方为:蛋白胨10g/L,酵母浸粉5g/L,氯化钠10g/L,琼脂粉20g/L。

[0074] TB培养基配方为:胰蛋白胨12g,酵母提取物24g,甘油4ml,去离子水900ml。

[0075] 实施例2

[0076] 本实施例提供了不对称胺化合成L-苯甘氨酸的方法,合成方法参照图3所示的流程图所示。

[0077] 本实施例以实施例1制备的重组转氨酶为催化剂。按照1L的反应体系,取300mM(40.8g)的2-羟基苯乙酮(上海源叶生物科技有限公司)加入到pH=8.0的磷酸钾缓冲溶液中,加入0.13g(0.5mM)的PLP(上海澄绍生物科技有限公司)和19.5g异丙胺(氨基供体),再加入8.16g实施例1制备的重组转氨酶,然后将反应体系保持在30 $^{\circ}$ C,200rpm下振荡反应24h。待反应结束后,向反应产物中加入500ml水,使用氢氧化钠将反应液调至pH $\geq$ 11,然后用乙酸乙酯萃取产品3次,500ml/次,萃取结束收集酯层,将酯层用无水硫酸钠干燥30min,浓缩,得到L-苯甘氨酸。称量得到的L-苯甘氨酸重量为37.6g,纯度为99.8%,收率为91.5%。

- [0078] 纯度检测方法为色谱法,产物L-苯甘氨酸的色谱峰图参照图4所示。
- [0079] 色谱条件
- [0080] 柱子:(Daicel)CHIRALPAK AY-H,250mm x 4.6mm,5 $\mu$ m
- [0081] 流速:1.0ml/min;
- [0082] 波长:220nm;
- [0083] 柱温:40 $^{\circ}$ C;
- [0084] 进样量:20 $\mu$ l;
- [0085] 运行时间:20min;
- [0086] 流动相:正己烷:乙醇:二乙胺=85:15:0.1;
- [0087] 稀释剂:正己烷:乙醇=85:15。
- [0088] 实施例3
- [0089] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物的浓度为200mM。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0090] 实施例4
- [0091] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物的浓度为400mM。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0092] 实施例5
- [0093] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置磷酸钾缓冲液的pH为7。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0094] 实施例6
- [0095] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置磷酸钾缓冲液的pH为7.5。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0096] 实施例7
- [0097] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置磷酸钾缓冲液的pH为8.5。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0098] 实施例8
- [0099] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置反应温度为25 $^{\circ}$ C。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0100] 实施例9
- [0101] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置反应温度为35 $^{\circ}$ C。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0102] 实施例10
- [0103] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置反应温度为40 $^{\circ}$ C。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0104] 实施例11
- [0105] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物与异丙胺摩尔比为1:1.0。其余合成方法及原料与实施例2相同。
- [0106] 实施例12
- [0107] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物与异丙胺摩尔比为1:

1.2.其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0108] 实施例13

[0109] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物与异丙胺摩尔比为1:

1.3.其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0110] 实施例14

[0111] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的15%。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0112] 实施例15

[0113] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的25%。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0114] 实施例16

[0115] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的30%。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0116] 实施例17

[0117] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的35%。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0118] 对比例1

[0119] 在实施例2基础上,使用现有专利转氨酶MVTA代替本申请重组转氨酶:

	收率(%)	纯度(%)
转氨酶MVTA	56	97.5

[0121] 在仅替换重装转氨酶的情况下相同试验条件下对底物的转化效率及最终产品纯度,最终结果熟虑及纯度都低于本申请的试验结果。

[0122] 本对比例是针对实施例2设置的对比比例,与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物的浓度为450mM。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0123] 对比比例2

[0124] 本对比例是针对实施例2设置的对比比例,与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置底物的浓度为500mM。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0125] 对比比例3

[0126] 本对比例是针对实施例2设置的对比比例,与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置磷酸钾缓冲液的pH为9。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0127] 对比比例4

[0128] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置氨基供体为氨水。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0129] 对比比例5

[0130] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置氨基供体为D-丙氨酸。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0131] 对比比例6

[0132] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置氨基供体为R-苯乙胺。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0133] 对比例7

[0134] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置反应温度为20℃。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0135] 对比例8

[0136] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置反应温度为45℃。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0137] 对比例9

[0138] 与实施例2相比,保持其他合成条件不变,本实施例设置重组转氨酶在反应体系中的添加量为底物添加质量的10%。其余合成方法及原料与实施例2相同。

[0139] 实验例1

[0140] 将实施例3-4以及对比例1-2合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表1所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0141] 表1实验例1的产物收率和纯度检测结果。

处理组	底物浓度 (mM)	收率%	纯度%
实施例2	200	93.0	99.3
实施例3	400	92.5	99.5
对比例1	450	82.3	98.8
对比例2	500	75.6	87.5

[0143] 由表1可知,当底物浓度在400mM以内时,L-苯甘氨酸的收率及纯度都保持在较高的水平,而当底物浓度达到450mM时,收率虽然能达到80%以上,但产物的纯度有所下降,因此,底物浓度保持在400mM以内为较佳的应用范围。

[0144] 实验例2

[0145] 将实施例5-7以及对比例3合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表2所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0146] 表2实验例2的产物收率和纯度检测结果。

处理组	PH	收率%	纯度%
实施例5	7	83.0	87.8
实施例6	7.5	89.8	99.3
对比例7	8.5	91.5	99.5
对比例3	9	79.4	81.6

[0148] 由表2可知,当磷酸缓冲溶液的pH保持在7.5-8.5时,重组转氨酶的活性较高,产物的收率可达到90%左右的水平,当磷酸缓冲溶液的pH在7以下或8.5以上的条件时,产物的收率及纯度下降明显。

[0149] 实验例3

[0150] 将对比例4-6合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表3所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0151] 表3实验例3的产物收率和纯度检测结果。

处理组	氨基供体	收率%	纯度%
-----	------	-----	-----

对比例4	氨水	28.0	63.5
对比例5	D-丙氨酸	53.7	68.9
对比例6	R-苯乙胺	74.5	89.8

[0153] 由表3可知,采用另外3种不同的氨基供体参与反应,其中氨水和D-丙氨酸参与反应收率和纯度都较低,使用R-苯乙胺作为供体,产物收率和纯度虽提升明显,但仍然达不到质量要求,不适合作为最佳反应的氨基供体。

[0154] 实验例4

[0155] 将实施例8-10和对比例7-8合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表4所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0156] 表4实验例4的产物收率和纯度检测结果。

处理组	温度℃	收率%	纯度%
对比例7	20	82.5	93.7
实施例8	25	89.8	99.4
实施例9	35	92.0	99.3
实施例10	40	88.1	99.7
对比例8	45	82.6	96.9

[0158] 由表4可知,当反应温度保持在25℃-40℃温度时产物的收率较高,而当反应温度低于25℃或者高于40℃时,产物的收率下降明显。

[0159] 实验例5

[0160] 将实施例11-13合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表5所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0161] 表5实验例5的产物收率和纯度检测结果。

处理组	底物与异丙胺摩尔比	收率%	纯度%
实施例11	1: 1.0	90.8	99.4

实施例12	1: 1.2	92.1	99.7
实施例13	1: 1.3	85.1	98.5

[0164] 当底物与异丙胺摩尔比为1:1-1.2,产物收率较高,当异丙胺的添加量为底物的1.3倍摩尔数时,产物的收率开始有所下降。

[0165] 实验例6

[0166] 将实施例14-17和对比例9合成的产物L-苯甘氨酸进行收率检测和纯度检测,检测结果参照表6所示,检测的色谱条件与实施例2相同。

[0167] 表6实验例6的产物收率和纯度检测结果。

处理组	转氨酶用量%	收率%	纯度%
对比例9	10	75.5	87.8
实施例14	15	87.9	99.3
实施例15	25	93.1	99.5
实施例16	30	92.4	99.5
实施例17	35	91.5	99.1

[0169] 当转氨酶用量在底物质量的15%以下时,产物无法彻底转化,产物的收率及纯度较低,当转氨酶用量在底物质量的15%以上时,产物的收率逐渐提高。转氨酶用量超过底物质量的35%时,成本较高。

[0170] 经过以上对比试验,转氨酶不对称胺化2-羟基苯乙酮制备L-苯甘氨酸的最佳反应条件为400mM以内的底物,1-1.2底物摩尔倍的异丙胺,配合0.1-0.5mM的PLP,在pH=7-8.5下,添加底物质量的15%-30%的转氨酶,保持温度25-40℃反应,制得L-苯甘氨酸。

[0171] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。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。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 南京红杉生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种重组转氨酶及合成L-苯甘氨酸的方法
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 1524
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] atgagcacca acaaccgca aaccctgaa tggcagacac tatcaggaga acaccaccta 60
- [0012] gcaccattct cagactacaa acaactaaaa gaaaaaggac cacgaattat tacaaaagca 120
- [0013] gaaggagtat acctatggga ctcagaagga aacaaaattc tagacggaat ggcaggacta 180
- [0014] tgggtcatga acgtaggata cggacgaaaa gaactagcag aagtagcata caaacaatg 240
- [0015] ctagaactac catactacaa cctattcttc caaacagcac acccaccagc actagaacta 300
- [0016] gcaaaaagca ttgcagacat tgcaccagaa ggaatgaacc acgtattctt cacaggatca 360
- [0017] ggatcagaat caaacgacac agtactacga atggtacgac actactggtc aattaaagga 420
- [0018] aaaccacaaa aaaaagtagt aattggacga tggaaccag gaattgtaca cattgcacaa 480
- [0019] ccatactggt acggagaagg aggagacatg tcagcagaag aattcggagt atgggcagca 540
- [0020] gaacaactag aaaaaaaaaat tctagaagta ggagaagaag gaatgaacca cgtattcttc 600
- [0021] acaggatcag gatcagaatc aaacgacaca gtactacgaa tggtacgaca ctactggtca 660
- [0022] attaaaggaa aaccacaaaa aaaagtagta attggacgat ggaaccagg aattgtacac 720
- [0023] attgcacaac catactggta cggagaagga ggagacatgt cagcagaaga attcggagta 780
- [0024] tgggcagcag aacaactaga aaaaaaaaaatt ctagaagtag gagaagtagc agcagcagta 840
- [0025] gcactagaaa acattcgaat tctacgagaa gaaaaaattg tagaaacagt aaaagcagaa 900
- [0026] acagcaccat acctacaaaa acgatggcaa gaactagcag accaccact agtaggagaa 960
- [0027] gcacgaggag taggaatggt aggagcacta gaactagtaa aaaacaaaa aacacgagaa 1020
- [0028] cgattcgaaa acggagtagg aatgctatgc cgagaacact gcttccgaaa cggactaatt 1080
- [0029] atgcgagcag taggagacac aatgattatt tcaccaccac tagtaattac aaaaccagaa 1140
- [0030] attgacgaaa cagtagcagc agcagtagca ctagaaaaca ttcgaattct acgagaagaa 1200
- [0031] aaaattgtag aaacagtaaa agcagaaca gcaccatacc tacaaaaacg atggcaagaa 1260
- [0032] ctagcagacc acccactagt aggagaagca cgaggagtag gaatggtagg agcactagaa 1320
- [0033] ctagtaaaaa acaaaaaaac acgagaacga ttcgaaaacg gagtaggaat gctatgccga 1380
- [0034] gaacactgct tccgaaacgg actaattatg cgagcagtag gagacacaat gattatttca 1440
- [0035] ccaccactag taattacaaa accagaaatt gacgaactaa ttacactagc acgaaaatgc 1500
- [0036] ctagacaaa cagcagcagt agca 1524
- [0037] <210> 2
- [0038] <211> 508
- [0039] <212> PRT
- [0040] <213> 人工序列
- [0041] <400> 2

[0042]	Met Ser Thr Asn Asn Pro Gln Thr Arg Glu Trp Gln Thr Leu Ser Gly
[0043]	1 5 10 15
[0044]	Glu His His Leu Ala Pro Phe Ser Asp Tyr Lys Gln Leu Lys Glu Lys
[0045]	20 25 30
[0046]	Gly Pro Arg Ile Ile Thr Lys Ala Glu Gly Val Tyr Leu Trp Asp Ser
[0047]	35 40 45
[0048]	Glu Gly Asn Lys Ile Leu Asp Gly Met Ala Gly Leu Trp Cys Met Asn
[0049]	50 55 60
[0050]	Val Gly Tyr Gly Arg Lys Glu Leu Ala Glu Val Ala Tyr Lys Gln Met
[0051]	65 70 75 80
[0052]	Leu Glu Leu Pro Tyr Tyr Asn Leu Phe Phe Gln Thr Ala His Pro Pro
[0053]	85 90 95
[0054]	Ala Leu Glu Leu Ala Lys Ala Ile Ala Asp Ile Ala Pro Glu Gly Met
[0055]	100 105 110
[0056]	Asn His Val Phe Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Ser Asn Asp Thr Val
[0057]	115 120 125
[0058]	Leu Arg Met Val Arg His Tyr Trp Ser Ile Lys Gly Lys Pro Gln Lys
[0059]	130 135 140
[0060]	Lys Val Val Ile Gly Arg Trp Asn Pro Gly Ile Val His Ile Ala Gln
[0061]	145 150 155 160
[0062]	Pro Tyr Trp Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Met Ser Ala Glu Glu Phe Gly
[0063]	165 170 175
[0064]	Val Trp Ala Ala Glu Gln Leu Glu Lys Lys Ile Leu Glu Val Gly Glu
[0065]	180 185 190
[0066]	Glu Gly Met Asn His Val Phe Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Ser Asn
[0067]	195 200 205
[0068]	Asp Thr Val Leu Arg Met Val Arg His Tyr Trp Ser Ile Lys Gly Lys
[0069]	210 215 220
[0070]	Pro Gln Lys Lys Val Val Ile Gly Arg Trp Asn Pro Gly Ile Val His
[0071]	225 230 235 240
[0072]	Ile Ala Gln Pro Tyr Trp Tyr Gly Glu Gly Gly Asp Met Ser Ala Glu
[0073]	245 250 255
[0074]	Glu Phe Gly Val Trp Ala Ala Glu Gln Leu Glu Lys Lys Ile Leu Glu
[0075]	260 265 270
[0076]	Val Gly Glu Val Ala Ala Ala Val Ala Leu Glu Asn Ile Arg Ile Leu
[0077]	275 280 285
[0078]	Arg Glu Glu Lys Ile Val Glu Thr Val Lys Ala Glu Thr Ala Pro Tyr
[0079]	290 295 300
[0080]	Leu Gln Lys Arg Trp Gln Glu Leu Ala Asp His Pro Leu Val Gly Glu
[0081]	305 310 315 320
[0082]	Ala Arg Gly Val Gly Met Val Gly Ala Leu Glu Leu Val Lys Asn Lys
[0083]	325 330 335

[0084]	Lys Thr Arg Glu Arg Phe Glu Asn Gly Val Gly Met Leu Cys Arg Glu
[0085]	340 345 350
[0086]	His Cys Phe Arg Asn Gly Leu Ile Met Arg Ala Val Gly Asp Thr Met
[0087]	355 360 365
[0088]	Ile Ile Ser Pro Pro Leu Val Ile Thr Lys Pro Glu Ile Asp Glu Thr
[0089]	370 375 380
[0090]	Val Ala Ala Ala Val Ala Leu Glu Asn Ile Arg Ile Leu Arg Glu Glu
[0091]	385 390 395 400
[0092]	Lys Ile Val Glu Thr Val Lys Ala Glu Thr Ala Pro Tyr Leu Gln Lys
[0093]	405 410 415
[0094]	Arg Trp Gln Glu Leu Ala Asp His Pro Leu Val Gly Glu Ala Arg Gly
[0095]	420 425 430
[0096]	Val Gly Met Val Gly Ala Leu Glu Leu Val Lys Asn Lys Lys Thr Arg
[0097]	435 440 445
[0098]	Glu Arg Phe Glu Asn Gly Val Gly Met Leu Cys Arg Glu His Cys Phe
[0099]	450 455 460
[0100]	Arg Asn Gly Leu Ile Met Arg Ala Val Gly Asp Thr Met Ile Ile Ser
[0101]	465 470 475 480
[0102]	Pro Pro Leu Val Ile Thr Lys Pro Glu Ile Asp Glu Leu Ile Thr Leu
[0103]	485 490 495
[0104]	Ala Arg Lys Cys Leu Asp Gln Thr Ala Ala Val Ala
[0105]	500 505



图1

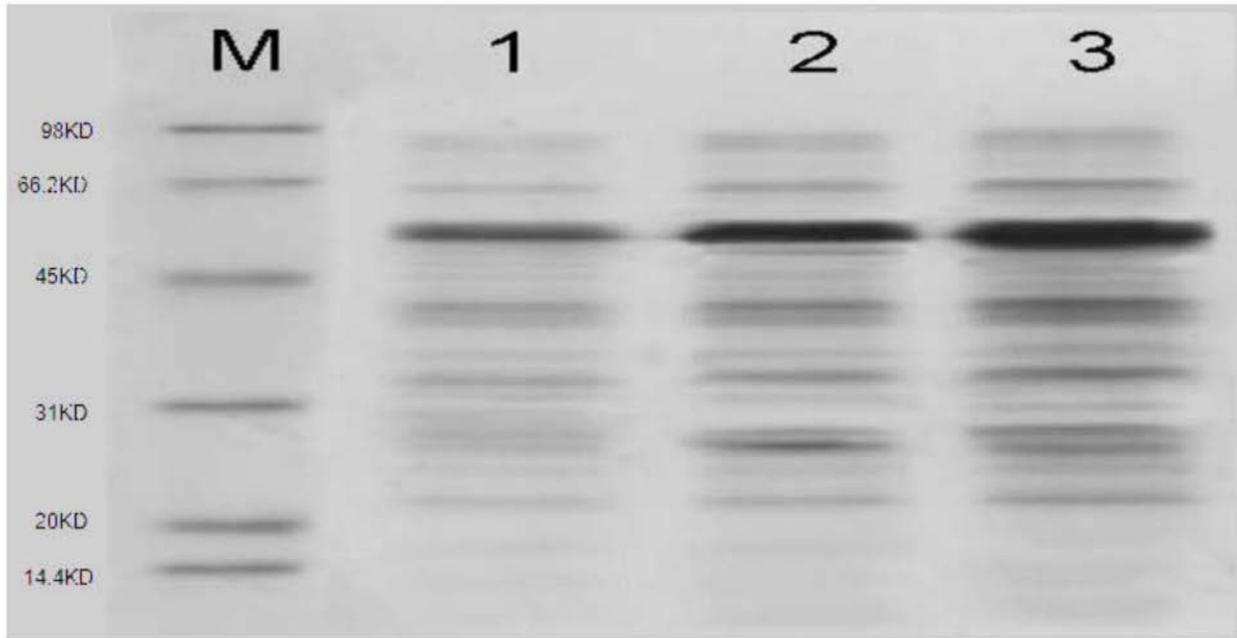


图2

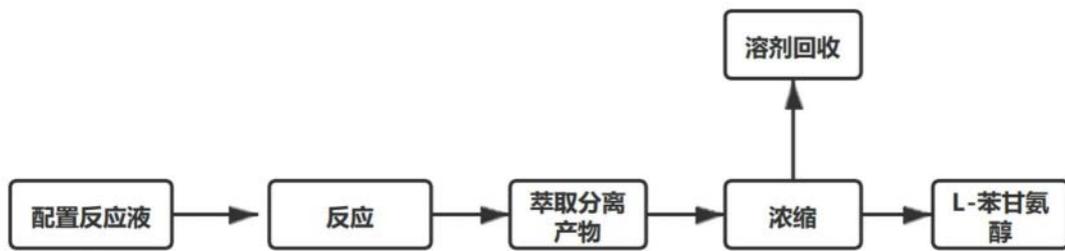
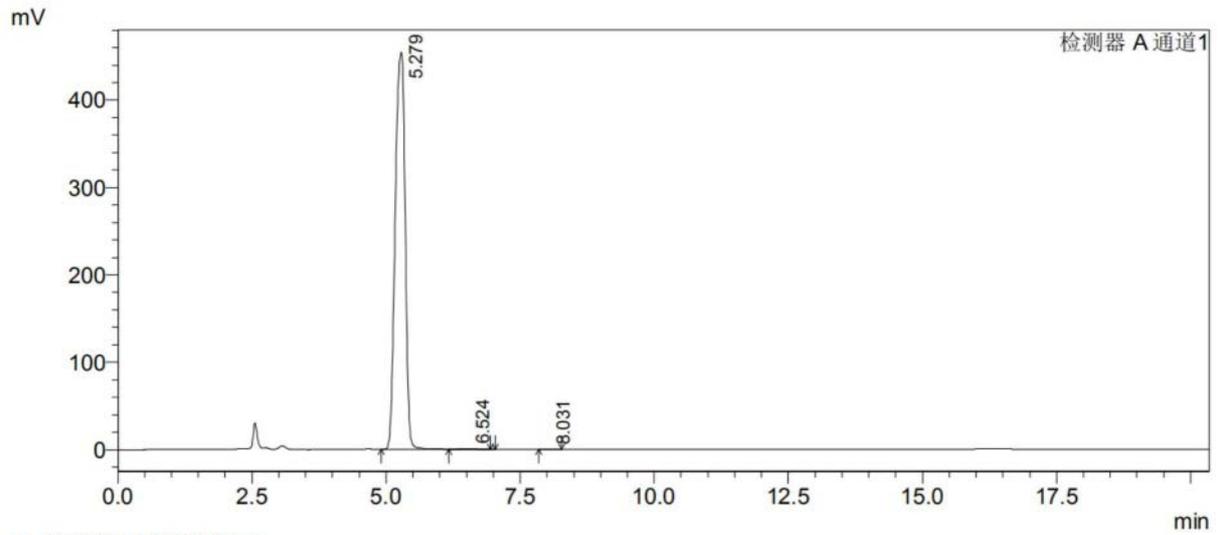


图3



1 检测器 A 通道1/210nm

峰表

检测器 A Ch1 210nm

峰#	保留时间	面积	高度	面积 %	高度 %
1	5.279	5864327	454512	99.849	99.889
2	6.524	7050	330	0.120	0.073
3	8.031	1827	177	0.031	0.039
总计		5873204	455019	100.000	100.000

图4