



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102260696 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 201110195589. 1 *C12N 15/63* (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 08. 16 *C12N 1/15* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *C12N 1/19* (2006. 01)  
10/919182 2004. 08. 16 US *C12N 1/21* (2006. 01)  
*C12P 7/42* (2006. 01)

(62) 分案原申请数据 *C12R 1/19* (2006. 01)  
200580035301. 7 2005. 08. 16

(83) 生物保藏信息  
ATCC 55746 1996. 03. 08  
PTA-1177 2000. 01. 11

(71) 申请人 纳慕尔杜邦公司  
地址 美国特拉华州威尔明顿

(72) 发明人 M·S·佩恩 R·迪科西莫  
D·P·奥基夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
代理人 李波 高旭轶

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/60* (2006. 01)  
*C12N 15/62* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 27 页  
序列表 28 页

## (54) 发明名称

使用腈水解酶突变体生产 3- 羟基羧酸

## (57) 摘要

本发明涉及使用腈水解酶突变体生产 3- 羟基羧酸。本发明涉及具有改善的用于将 3- 羟基腈转化为 3- 羟基羧酸的腈水解酶活性的腈水解酶突变体。更具体地说,使用易错 PCR 和位点定向诱变突变敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 腈水解酶基因以产生具有改善的用于将 3- 羟基腈(如 3- 羟基丁腈或 3- 羟基戊腈)转化为相应的 3- 羟基羧酸的腈水解酶活性的腈水解酶。也提供了一种使用所述改善的突变体生产 3- 羟基羧酸的方法。

1. 如 SEQ ID NO :15 所示的分离的核酸分子。
2. 一种包含可操作地连接有合适的调节序列的权利要求 1 的分离的核酸分子的嵌合基因。
3. 一种包含权利要求 2 的嵌合基因的表达盒。
4. 一种包含权利要求 2 的嵌合基因的转化的微生物。
5. 一种包含权利要求 3 的表达盒的转化的微生物。
6. 权利要求 4 的转化的微生物,其中所述微生物选自:丛毛单胞菌 (*Comamonas* sp.)、棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.)、短杆菌 (*Brevibacterium* sp.)、红球菌 (*Rhodococcus* sp.)、固氮菌 (*Azotobacter* sp.)、柠檬酸杆菌 (*Citrobacter* sp.)、肠杆菌 (*Enterobacter* sp.)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium* sp.)、克雷白氏杆菌 (*Klebsiella* sp.)、沙门氏菌 (*Salmonella* sp.)、乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)、曲霉 (*Aspergillus* sp.)、糖酵母 (*Saccharomyces* sp.)、接合酵母 (*Zygosaccharomyces* sp.)、毕赤氏酵母 (*Pichia* sp.)、克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces* sp.)、假丝酵母 (*Candida* sp.)、汉森氏酵母 (*Hansenula* sp.)、杜氏藻 (*Dunaliella* sp.)、德巴利氏酵母 (*Debaryomyces* sp.)、毛霉 (*Mucor* sp.)、球拟酵母 (*Torulopsis* sp.)、甲基杆菌 (*Methylobacteria* sp.)、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)、埃希氏杆菌 (*Escherichia* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 和链霉菌 (*Streptomyces* sp.)。
7. 权利要求 6 的转化的微生物,其中所述转化的微生物是一种大肠杆菌菌株,选自保藏号为 ATCC 47076 的 MG1655、保藏号为 ATCC 53911 的 FM5、保藏号为 ATCC 27325 的 W3110、保藏号为 ATCC 35695 的 MC4100 和保藏号为 ATCC 12435 的 W1485。
8. 一种用于将 3- 羟基腈水解为 3- 羟基羧酸的方法,包括步骤:(a) 将反应混合物水溶液中的 3- 羟基腈与腈水解酶催化剂接触,由此所述 3- 羟基腈被水解为相应的 3- 羟基羧酸,所述腈水解酶催化剂为权利要求 1 的分离的核酸分子所编码;和 (b) 任选地分离步骤 (a) 中产生的 3- 羟基羧酸。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述 3- 羟基腈是 3- 羟基戊腈或 3- 羟基丁腈。
10. 一种用于将 3- 羟基戊腈水解为 3- 羟基戊酸的方法,包括步骤:(a) 将反应混合物水溶液中的 3- 羟基戊腈与权利要求 1 的分离的核酸分子编码的腈水解酶催化剂接触,由此所述 3- 羟基戊腈被水解为 3- 羟基戊酸;和 (b) 任选地分离步骤 (a) 中产生的 3- 羟基戊酸。

## 使用腈水解酶突变体生产 3- 羟基羧酸

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 8 月 16 日的中国专利申请 200580035301.7“使用腈水解酶突变体生产 3- 羟基羧酸”的分案申请。

[0002] 本申请要求 2004 年 8 月 16 日提交的美国非临时申请第 10/919182 号的利益。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及分子生物学和微生物学领域。更具体地说,本发明涉及具有改善的腈水解酶活性的突变的腈水解酶,所述腈水解酶用于将 3- 羟基腈转化为 3- 羟基羧酸。

### 背景技术

[0004] 具有优异性能、独特性质、改善的成本效率、品质以及低生态影响的新聚合物正引起工业界的注意。特别是,需要具有支链、致密结构以及末端带反应基的功能聚合物,因为与常规线型统计共聚物相比,它们具有更低的特性粘度和更高的活性。

[0005] 这样优异的聚合物可通过共聚高支化 (hyperbranching) 羟基羧酸共聚单体 (高支化  $AB_n$  型,其中 A 和 B 是具有羟基或羧基衍生的反应基部分, n 是 2 或更大) (Hult 等, pp. 656-658 和 Voit 等, pp. 658-659 in Concise Polymeric Materials Encyclopedia, 编辑 . J. C. Salomone, CRC Press, New York, 1999) 和多种线型羟基羧酸共聚单体 (线型 AB 型) 包括 3- 羟基戊酸 (3-HVA) 和 3- 羟基丁酸 (3-HBA) 得以制备。

[0006] 3- 羟基羧酸用作为共聚单体用于制造线型聚酯。聚酯被用作为热塑性、热固性、半结晶、非晶形、刚性和弹性体材料。它们是纤维、薄膜、模制品和涂料的主要成分 (Goodman, pp. 793-799 in Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 编辑 . J. I. Kroschwitz, John Wiley & Sons, New York, 1990)。

[0007] 已在使用皱落假丝酵母 (*Candida rugosa*) 的发酵中通过戊酸的 3- 羟基化作用制备了 3- 羟基戊酸 (Hasegawa 等, *J. Ferment. Technol.* 59 :257-262(1981) ;JP 59053838 B4), 并且通过使用恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、产蓝色素荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、氧化节杆菌 (*Arthrobacter oxydans*) 和 *Arthrobacter crystallopietes*, 经发酵的戊酸的 3- 羟基化作用, 类似地制备了 3- 羟基戊酸的单一对映体 (U. S. 3, 553, 081)。这些用于戊酸发酵氧化的方法通常产生低产物浓度的 3- 羟基戊酸, 并且从发酵培养基中分离 3- 羟基戊酸需要精心设计且费用昂贵。已通过化学降解 (Seebach 等, *Helv. Chim. Acta* 77 :2007-2034(1994)) 或聚 (3- 羟基丁酸酯 /3- 羟基戊酸酯) 发酵自降解 (WO 9929889) 制备得到 (R)-(-)-3- 羟基戊酸, 但是羟基丁酸 / 羟基戊酸共聚物的降解同样需要费力地将 3- 羟基丁酸与副产物 3- 羟基戊酸分离。还已通过酶促还原 3- 氧代戊酸 (Bayer 等, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 :543-547(1994)) 或不对称氢化甲基 3- 氧代戊酸酯接着皂化 (Burk 等, *Organometallics* 9 :2653-2655(1990)) 制备得到 (R)-(-)-3- 羟基戊酸。

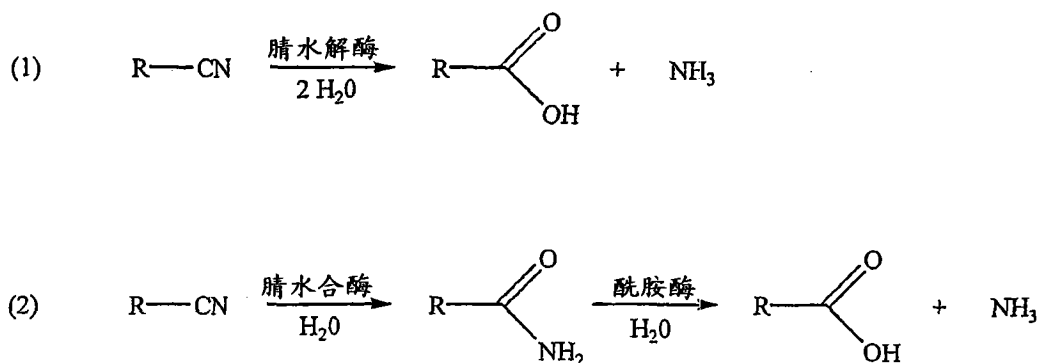
[0008] 通过多种化学方法, 腈容易地转化为相应的羧酸。这些方法需要强的酸性和碱性反应条件和高反应温度, 且通常产生不需要的副产物和 / 或作为不需要的废弃物的大量无

机盐。用于化学水解额外具有羟基的腈的反应条件,例如用于将 3-羟基戊腈转化为 3-羟基戊酸的反应条件,通常会导致不期望的伯、仲或叔羟基消除,产生碳-碳双键。

[0009] 腈酶催化水解为相应的羧酸是经常优选的化学方法,因为该反应通常在环境温度下进行,无需强的酸性或碱性反应条件,并以高转化率产生高选择性的所需产物。两种酶——腈水合酶和酰胺酶的组合可用于在水溶液中将脂肪腈转化为相应的羧酸。开始,通过腈水合酶将脂肪腈转化为酰胺,接着,随后通过酰胺酶将酰胺转化为相应的羧酸。已知多种细菌菌属具有不同的腈水合酶和酰胺酶活性谱 (Sugai 等, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 : 1419-1427 (1997)), 包括红球菌属 (*Rhodococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、产硫杆菌属 (*Alcaligenes*)、节核细菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、无芽孢杆菌属 (*Bacteridium*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 和微球菌属 (*Micrococcus*)。真菌节镰孢 (*Fusarium merismoides*) TG-1 还已用作为催化剂用于水解脂肪腈和二腈 (Asano 等, *Agric. Biol. Chem.* 44 : 2497-2498 (1980))。来自红球菌 (*Rhodococcus* sp.) (来自 Novo Industri 的 SP409) 的固定化腈水合酶和酰胺酶被用于将 3-羟基丙腈、3-羟基庚腈和 3-羟基壬腈水解为相应的 3-羟基羧酸,产率分别为 63%、62% 和 83% (de Raadt 等, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 137-140 (1992))。使用 TLC 也观察到了相应的酰胺的形成。与此相反,苍白芽孢杆菌 (*Bacillus pallidas*) Dac521 的纯化的腈水合酶水解多种脂肪腈,但不水解 3-羟基丙腈 (Cramp 等, *Biochim. Biophys. Acta* 1431 : 249-260 (1999))。

[0010] 单种酶——腈水解酶在水溶液中也 将腈转化为相应的羧酸和氨,但没有酰胺中间体形成 (方程式 1 和 2)。

[0011]



[0012] Kobayashi 等 (*Tetrahedron* 46 : 5587-5590 (1990) 和 *J. Bacteriology* 172 : 4807-4815 (1990)) 已描述了一种分离自紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) K22 的脂族腈水解酶,其催化多种脂肪腈水解为相应的羧酸。业已分离了来自睾丸酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni*) 的腈水解酶,其能将一系列脂族  $\alpha, \omega$ -二腈转化为相应的  $\omega$ -羧酸或二羧酸 (CA 2, 103, 616 ; Levy-Schil 等, *Gene* 161 : 15-20 (1995))。还利用紫红红球菌 NCIMB 11216 (Bengis-Garber 等, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 11-16 (1989) ; Gradley 等, *Biotechnology Lett.* 16 : 41-46 (1994))、紫红红球菌 PA-34 (Bhalla 等, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 : 184-190 (1992))、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*) (Goldlust 等, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11 : 581-601 (1989))、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.) AK 226 (Yamamoto 等, *Agric. Biol. Chem.* 55 : 1459-1473 (1991))、

粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) ATCC 8750 (Yamamoto 等, *J. Ferment. Bioeng.* 73 : 425-430 (1992)) 和敏捷食酸菌 (*Acidovorax facilis*) 72W (Gavagan 等, *J. Org. Chem.* 63 : 4792-4801 (1998)) 生产了脂族脞水解酶。

[0013] 业已克隆并重组表达了编码敏捷食酸菌 72W (ATCC 55746) 脞水解酶的基因 ((WO 01/75077 ; 相应于 US 6, 870, 038) 和 Chauhan 等, *Appl Microbiol Biotechnol*, 61 : 118-122 (2003))。敏捷食酸菌 72W 脞水解酶以高产率将 3- 羟基脞转化为相应的 3- 羟基羧酸 (US 6, 562, 603)。所产生的 3- 羟酸被用作作为基质用于制备包括高支化共聚多酯在内的聚合物。两种特别有用的 3- 羟基羧酸是 3- 羟基戊酸 (3-HVA) 和 3- 羟基丁酸 (3-HBA)。用于以高达 100% 转化的高产率将 3- 羟基戊脞 (3-BTVTST) 或 3- 羟基丁脞 (3-HBN) 转化为相应的 3- 羟基羧酸的, 具有改善的脞水解酶活性的脞水解酶, 对于减少工业生产成本应当是十分有用的。

[0014] 因此, 所要解决的问题就是提供具有用于将 3- 羟基脞高产率地转化为其相应的羧酸的活性的脞水解酶。更具体地说, 用于将 3- 羟基脞 (如 3- 羟基戊脞或 3- 羟基丁脞) 转化为相应的 3- 羟基羧酸的, 具有脞水解酶活性显著改善的脞水解酶 (相对于敏捷食酸菌 72W 的脞水解酶活性), 应当能用于减少工业生产成本。

## 发明内容

[0015] 当将 3- 羟基脞转化为 3- 羟酸时, 突变并筛选具有改善的的脞水解酶活性的敏捷食酸菌 72W 脞水解酶。相对于敏捷食酸菌 72W 脞水解酶的活性, 鉴定了具有改善的脞水解酶活性的几个氨基酸取代。因此, 提供了编码相对于敏捷食酸菌 72W 脞水解酶具有改善的脞水解酶活性的多肽的分离的核酸分子, 其中所述分离的核酸分子编码如 SEQ ID NO : 4 所示序列的至少一个氨基酸取代的序列, 所述取代选自 :

[0016] a) 在第 210 位用丙氨酸、异亮氨酸或半胱氨酸取代 ;

[0017] b) 在第 65 位用半胱氨酸取代 ;

[0018] c) 在第 168 位用赖氨酸、缬氨酸或亮氨酸取代 ; 和

[0019] d) 在第 174 位用异亮氨酸取代。

[0020] 本发明的一个实施方案是一种编码酶促活性的脞水解酶多肽的分离的核酸片段, 所述多肽具有选自 SEQ ID NO : 6、8、12、14、16 和 18 的多肽序列 ; 并且, 当在相同反应条件下将 3- 羟基戊脞转化为 3- 羟基戊酸时, 具有与敏捷食酸菌 72W (ATCC 55746) 脞水解酶的脞水解酶活性相比至少高 1.8 倍的脞水解酶活性。

[0021] 还包括在本发明之中的是一种分离的核酸片段, 所述核酸片段选自 SEQ ID NOs : 5、7、11、13、15 和 17, 其中所述分离的核酸片段编码一种多肽, 当在相同的水溶液反应条件下将 3- 羟基戊脞转化为 3- 羟基戊酸时, 所述多肽具有相对于敏捷食酸菌 72W (ATCC 55746) 脞水解酶的活性至少高 1.8 倍的脞水解酶活性改善。本发明的另外施方案包括本发明核酸片段所编码的多肽 ; 包含可操作地连接到适合的调节序列的本发明分离的核酸片段的嵌合基因 ; 包含本发明嵌合基因的表达盒 ; 包含本发明嵌合基因的转化的微生物 ; 以及包含本发明表达盒的转化的微生物。

[0022] 另一个实施方案是一种用于将 3- 羟基脞水解为 3- 羟基羧酸的改良方法, 包括步骤 : (a) 将反应混合物水溶液中的 3- 羟基脞与改良的脞水解酶催化剂接触, 所述改良的脞

水解酶催化剂特征在于在相同的反应条件下,与敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 脲水解酶的活性相比具有至少 1.8 倍改善,所述改良的脲水解酶催化剂为本发明分离的核酸片段所编码;和 (b) 任选地分离步骤 (a) 中生产的 3- 羟基羧酸。

[0023] 本发明的另一个实施方案是一种用于将 3- 羟基戊脲水解为 3- 羟基戊酸的改良方法,包括步骤:(a) 将反应混合物水溶液中的 3- 羟基戊脲与本发明分离的核酸片段所编码的脲水解酶催化剂接触,所述脲水解酶催化剂特征在于在相同的反应条件下,相对于敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 脲水解酶的活性具有至少 1.8 倍脲水解酶活性改善;和 (b) 任选地分离步骤 (a) 中生产的 3- 羟基戊酸。

[0024] 本发明的另一个实施方案是一种用于将 3- 羟基丁脲水解为 3- 羟基丁酸的改良方法,包括步骤:(a) 将反应混合物水溶液中的 3- 羟基丁脲与具有 SEQ ID NO:6 的多肽序列的酶促活性的脲水解酶催化剂接触,所述脲水解酶催化剂特征在于在相同的反应条件下,相对于敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 脲水解酶的活性具有至少 1.9 倍脲水解酶活性改善;和 (b) 任选地分离步骤 (a) 中生产的 3- 羟基丁酸。

[0025] 所提供序列简述

[0026] 通过下列详细说明和所附的序列列表计算机可读形式,其内容引入作为本申请的一部分,可以更全面地理解本发明。

[0027] 以下序列符合 37 C.F.R. 1.821-1.825(“包含核苷酸序列和/或氨基酸序列披露的专利申请要求——序列细则”),并且也符合世界知识产权组织(WIPO)标准 ST.25(1998)和 EPC 和 PCT 的序列列表要求(细则 5.2 和 49.5(a-bis),以及行政规程第 208 节和附录 C)。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式符合 37C.F.R. § 1.822 的规定。S

[0028] SEQ ID NO:1 是用于易错 PCR 的引物的核酸序列,并用于扩增敏捷食酸菌 72W 脲水解酶。

[0029] SEQ ID NO:2 是用于易错 PCR 的引物的核酸序列,并用于扩增敏捷食酸菌 72W 脲水解酶。

[0030] SEQ ID NO:3 是在质粒 pNM18 中用作为对照的敏捷食酸菌 72W 脲水解酶编码序列的核酸序列。为了便于在大肠杆菌中表达,除起始密码子由 GTG 变为 ATG 之外,该序列与野生型敏捷食酸菌 72W 脲水解酶序列相同。

[0031] SEQ ID NO:4 是表达自质粒 pNM18 的敏捷食酸菌 72W 脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0032] SEQ ID NO:5 是质粒 pNM18/B2 和 pNM18/H9 中突变的脲水解酶编码序列的核酸序列。

[0033] SEQ ID NO:6 是表达自质粒 pNM18/B2 和 pNM18/H9 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:7 是质粒 pNM18/B4 中突变的脲水解酶编码序列的核酸序列。

[0035] SEQ ID NO:8 是表达自质粒 pNM18/B4 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:9 是用于产生在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶的第 210 位残基处具有单个氨基酸取代(Thr210 → Met)的突变的脲水解酶的引物的核酸序列。

[0037] SEQ ID NO:10 是用于产生在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶的第 210 位残基处具有单个氨基酸取代(Thr210 → Met)的突变的脲水解酶的引物的核酸序列。

[0038] SEQ ID NO :11 是突变的脲水解酶的核酸序列,所述核酸序列含有引起在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 210 位残基处单个氨基酸取代 (Thr210 → Cys) 的密码子改变。

[0039] SEQ ID NO :12 是在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 210 位残基处含有单个氨基酸取代 (Thr210 → Cys) 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO :13 是突变的脲水解酶的核酸序列,所述核酸序列含有引起在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处单个氨基酸取代 (Phe168 → Lys) 的密码子改变。

[0041] SEQ ID NO :14 是在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处含有单个氨基酸取代 (Phe168 → Lys) 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO :15 是突变的脲水解酶的核酸序列,所述核酸序列含有引起在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处单个氨基酸取代 (Phe168 → Val) 的密码子改变。

[0043] SEQ ID NO :16 是在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处含有单个氨基酸取代 (Phe168 → Val) 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0044] SEQ ID NO :17 是突变的脲水解酶的核酸序列,所述核酸序列含有引起在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处单个氨基酸取代 (Phe168 → Leu) 的密码子改变。

[0045] SEQ ID NO :18 是在敏捷食酸菌 72W 脲水解酶第 168 位残基处含有单个氨基酸取代 (Phe168 → Leu) 的突变的脲水解酶的推断的氨基酸序列。

[0046] 生物保藏简述

[0047] 申请人业已按照布达佩斯条约条款的规定进行了以下生物学保藏:

[0048]

保藏人识别参考	国际保藏指定编号	保藏日
敏捷食酸菌 72W	ATCC 55746	1996 年 3 月 8 日
大肠杆菌 SS1001	ATCC PTA-1177	2000 年 1 月 11 日

[0049] 如本文使用的“ATCC”指美国典型培养物保藏中心,位于 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 U. S. A. 的国际保藏机构。“国际保藏名称”是在 ATCC 保藏的培养物的保藏号。

[0050] 所列出的保藏物应当在所指明的国际保藏机构保藏至少三十 (30) 年,并且公众在得到披露其的专利授权之后可以获得。保藏物的可利用性并不构成对实施本发明的许可,这种实施会破坏通过政府行为授予的专利权。

### 具体实施方式

[0051] 提供了几种脲水解酶,当以高达 100% 转化的高产率将 3- 羟基脲转化为 3- 羟基羧酸时,相对于敏捷食酸菌 72W (ATCC 55746) 脲水解酶的活性,所述脲水解酶具有显著改善的脲水解酶活性。还提供了使用本发明的脲水解酶用于生产 3- 羟基羧酸 (3-HVA 和 3-HBA) 的方法。

[0052] 利用易错 PCR 和 / 或位点定向诱变突变敏捷食酸菌 72W 脲水解酶以产生一系列突变的脲水解酶,所述突变的脲水解酶具有改善的用于将 3- 羟基脲转化为相应的 3- 羟基羧酸的脲水解酶活性。如所附实施例所述,使用转化的微生物宿主细胞 (未固定化的和固定化的),测定用于 3- 羟基羧酸生产的脲水解酶活性的改善。

[0053] 具有将 3- 羟基腈的腈官能团转化为其相应羧酸能力的腈水解酶类提供了显著的优点。与化学或其他酶促方法相比,使用本发明腈水解酶的腈水解能用于由相对便宜和容易获得的起始原料以高产率合成 3- 羧酸,具有十分少的副产物和污染产生。

[0054] 所要求保护的用于制备 3- 羟基戊酸或 3- 羟基丁酸的方法产生很少的污染或反应副产物,且 3- 羟基羧酸易于从产物混合物中回收。先前已知的用于将 3- 羟基腈水解为 3- 羟基羧酸的化学方法无法产生使用酶催化的腈水解所获得的高产率和选择性。非酶促腈水解反应通常涉及在升温下加热腈溶液,在强酸或强碱存在下常常要好几次,然而酶催化的反应在环境温度下于水溶液及中性 pH 中进行,无需添加酸或碱。例如,业已使用氢氧化钡来将 3- 氨基丙腈水解为 3- 丙氨酸,产率 85-90% (Ford, J. H., Org. Synth., Coll. vol. III :34-36 (1955)),以及将 3- 氰基丁酸水解为甲基丁二酸,产率 72% (Brown, G. B., Org Synth. Coll. vol. III :615-617 (1955));使用 3- 羟基戊腈重复这两种方法的第一种,产生很少的或无法检测的 3- 羟基戊酸(参见比较实施例)。

[0055] 通过本发明生产的 3- 羟基戊酸和 3- 羟基丁酸被用作为配料来制备聚酯(特别是多支聚酯和高支化羟基羧酸共聚单体),以及在生物可降解的聚酯生产中被用作为共聚单体 (US 6, 562, 603)。业已使用二羟甲基丙酸作为支化共聚单体和多种线型羟基羧酸和内酯制备了几类多支共聚多酯多元醇。这些聚合物的某些显示了引人注意的特性。也已报道了具有相似的总成分(但具有不同的微结构)的相应的嵌段共聚物(如 Trollsas 等, Macromolecules, 30 :8508 (1997) 和 Trollsas 等, J. Polym. Sci. Part (A) :Polymer Chemistry 36 :2793 (1998) 中描述的 DMPA/ $\epsilon$ -己内酯嵌段共聚物)。当在使用二羟甲基丙酸或三羟甲基乙酸的共聚反应中,诸如 3- 羟基戊酸的 3- 羟基羧酸代替  $\epsilon$ -己内酯作为线型共聚单体时,也已报道了具有期望的、显著增加的  $T_g$  的用于活性涂层的多支共聚多酯多元醇基质 (US 6, 562, 603)。更高的  $T_g$  明显地扩大了支化共聚多酯可以使用的应用范围。

[0056] 在本说明书中使用了许多术语和缩写。提供以下定义。

[0057] 饱和的“烷基”定义为任何全部由碳和氢组成的基团,在此单键专门用于将碳原子连接在一起。因此,任何具有至少一个碳原子的稳定的碳和氢原子排列包括在饱和的烷基范围内。

[0058] 术语“高支化的”、“多支的”和“树枝状大分子”(树状聚体)通常可被描述为具有树形结构的三维的、多支的分子。树状聚体是高对称的,而类似的称为高支化或多支的大分子则可在一定程度上具有不对称性,且还保持多支树形结构。树状聚体可以说是高支化大分子的单分散变体。高支化的、多支的和树枝状大分子通常由引发剂或具有一个或多个反应活性部位的核、多个周围分支层以及任选的链终止分子层组成。所述层通常称为段(generations)。

[0059] 在本文中“腈水解酶催化剂”指具有腈水解酶活性特性的酶催化剂。所述酶催化剂可以全微生物细胞、透化处理的微生物细胞、微生物细胞提取物的一种或多种细胞成分、部分纯化的酶或纯化的酶的形式存在。术语“改良的腈水解酶”、“突变的腈水解酶”和“蛋白质工程的腈水解酶”可交换地用于指在相同反应条件下,对于将 3- 羟基腈(如 3- 羟基戊腈或 3- 羟基丁腈)转化为相应的 3- 羟基羧酸,与敏捷食酸菌 72W 腈水解酶的腈水解酶活性相比具有显著改善的腈水解酶活性的现有腈水解酶。如本文使用的“相同的反应条件”应指相同的和/或基本上相似的反应条件,其中所测定的腈水解酶活性的差异归因于现有



脲水解酶的结构差异,表现为本文所述的氨基酸取代。敏捷食酸菌 72W 脲水解酶如 SEQ ID NO :3 所示。除起始密码子由 GTG 变为 ATG 之外,其与野生型敏捷食酸菌 72W 脲水解酶相同(导入以便于在大肠杆菌中表达)。在本发明中,表达自 pNM18 的敏捷食酸菌 72W 脲水解酶(SEQ ID NO :3)的编码序列被认为是适合的对照用于脲水解酶活性比较。

[0060] 在本发明中,“一单位酶活性”或“一单位活性”或“U”定义为在规定温度下每分钟产生  $1 \mu\text{mol}$  规定的 3-羟基羧酸产物所需要的酶活性量。在本发明中,例证生产的 3-羟基羧酸是 3-羟基戊酸和 3-羟基丁酸。

[0061] 在本发明中,术语“脲水解酶活性”指每单位质量(例如毫克)的蛋白质、细胞干重或珠子重量的酶活性。测定的对照的脲水解酶活性与细胞干重或珠子重量成正比。由于如使用 SDS-PAGE 凝胶的激光光密度分析所定量的,无法区别在敏捷食酸菌 72W 对照(SEQ ID NO :4)和改良的突变体之间的脲水解酶表达水平,因此相对于细胞干重或珠子重量测定对照和报道的脲水解酶活性改善。

[0062] 如本文使用的术语“相对的脲水解酶活性”指表示为参考(对照)脲水解酶活性的多倍(或分数)的脲水解酶活性。在本发明中,相对的脲水解酶活性的“显著改善”是在相同的反应条件下,与对照的脲水解酶活性相比至少高 1.2 倍的脲水解酶活性的改善。在另一个实施方案中,所述改善是在相同的反应条件下,与对照的脲水解酶活性相比至少高 1.8 倍的脲水解酶活性的改善。在又一个实施方案中,所述改善是在相同的反应条件下,与对照的脲水解酶活性相比至少高 5 倍的脲水解酶活性的改善。

[0063] “3-羟基脲”等同于“ $\beta$ -羟基脲”。“3-羟基脲”包括但不限于,下列化合物:3-羟基丙脲、3-羟基丁脲、3-羟基戊脲、3-羟基己脲、3-羟基庚脲、3-羟基壬脲、3-羟基-3-异丙基-4-甲基戊脲、3-羟基-3-苯基丙脲、2-丙基-3-羟基戊脲和 3-羟基-3-甲基-n-戊脲。在本发明中优选的 3-羟基脲包括 3-羟基戊脲和 3-羟基丁脲。

[0064] “3-羟基羧酸”等同于“ $\beta$ -羟基羧酸”。“3-羟基羧酸”包括但不限于,下列化合物:3-羟基丙酸、3-羟基丁酸、3-羟基戊酸、3-羟基己酸、3-羟基-3-异丙基-4-甲基戊酸、3-羟基-3-苯基丙酸、2-丙基-3-羟基戊酸、3-羟基-2,2-二甲基丙酸和 3-羟基-3-甲基-n-戊酸。在本发明中生产的 3-羟基羧酸包括 3-羟基戊酸和 3-羟基丁酸。所产生的 3-羟基羧酸可以酸或其相应的铵盐的形式存在。

[0065] “3-羟基戊脲(3-Hydroxyvaleronitrile)”也被称为 3-羟基戊脲(3-hydroxypentanitrile)和 3-HVN。

[0066] “3-羟基戊酸(3-Hydroxyvaleric acid)”也被称为 3-羟基戊酸(3-hydroxypentanoic acid)和 3-HVA。

[0067] “3-羟基丁脲(3-Hydroxybutyronitrile)”也被称为 3-羟基丁脲(3-hydroxybutanitrile)和 3-HBN。

[0068] “3-羟基丁酸(3-Hydroxybutyric acid)”也被称为 3-羟基丁酸(3-hydroxybutanoic acid)和 3-HBA。

[0069] 术语“宿主细胞”、“异源的宿主细胞”和“宿主生物”指能接受外源或异源基因、基因片段活 DNA 片段的细胞。

[0070] 术语“重组生物”、“转化宿主”、“转化体”、“转基因生物”和“转化的微生物宿主”指已用异源或外源 DNA 转化的宿主生物。本发明的重组生物表达编码活性脲水解酶的外源编

码序列或基因。“转化”指 DNA 片段转移入宿主生物中。所述转移的 DNA 片段可以在染色体或染色体外掺入（即通过载体）宿主生物中的。“转化盒”指含有一组便于准备插入宿主细胞中的遗传元件的 DNA 特定片段，通常作为质粒的一部分。“表达盒”指含有一组便于准备插入宿主细胞中的遗传元件的 DNA 特定片段，通常作为质粒的一部分，还供在宿主中增强基因表达之用。

[0071] 术语“质粒”和“载体”指通常携带不是宿主细胞主要新陈代谢的一部分的基因的染色体外元件，且通常以环状双链 DNA 分子形式存在。这样的元件可以是来自任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列、线性或环状的单链或双链 DNA 或 RNA，其中许多核苷酸序列业已被结合或重组入独特的结构中。

[0072] “基因”指表达特定蛋白质的核酸片段，包括位于编码序列前面的调节序列（5' 非编码序列）和位于编码序列后面的调节序列（3' 非编码序列）。“天然基因”指自然界中与它自身的调节序列一起出现的基因。“嵌合基因”指除了天然基因以外的任何基因，包括在自然状态下不是一起出现的调节序列和编码序列。因此，嵌合基因可以包含来自不同来源的调节序列和编码序列，或来自相同来源的调节序列和编码序列，但是排列方式与天然排列方式不同。“内源基因”指处在天然生物的基因组中的天然位点上的天然基因。“外源基因”指正常情况下不存在于宿主生物中的基因，但是所述基因是通过基因转移导入宿主生物中的。外源基因可包含插入非天然生物中的天然基因或嵌合基因。“转基因”是已通过转化操作导入基因组的基因。

[0073] 术语“核酸”指活细胞中存在的高分子量复合化合物，其基本单位是通过磷酸桥连接在一起的核苷酸。核酸分为两种类型：核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）。

[0074] 当在上下文的核酸中提及，字母“A”、“G”、“T”和“C”分别指嘌呤碱基（腺嘌呤（ $C_5H_5N_5$ ）和鸟嘌呤（ $C_5H_5N_5O$ ）以及嘧啶碱基（胸腺嘧啶（ $C_5H_6N_2O_2$ ）和胞嘧啶（ $C_4H_5N_3O$ ））。

[0075] 术语“编码序列”或“编码区”指编码特定氨基酸序列的 DNA 序列。术语“ORF”、“开放阅读框”、“编码序列”和“编码区”可交换地用于指 DNA 序列的一部分，其翻译为蛋白质。在 DNA 序列翻译为蛋白质序列中，序列中的 ORFs 通常通过指示起始的三碱基对（起始密码子）和指示终止的三碱基对（终止密码子）来描绘。

[0076] 如本文使用的“分离的核酸分子”或“片段”是单链或双链 RNA 或 DNA 的聚合物，任选地含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。一种以 DNA 聚合物形式存在的分离的核酸分子可由一个或多个 cDNA、基因组 DNA 或合成的 DNA 的片断组成。

[0077] 术语“限制性内切核酸酶”和“限制性内切酶”指一种催化双链 DNA 中的特定核苷酸序列水解切割的酶。

[0078] 术语“寡核苷酸”指要被检测的引物、探针、寡聚物片段、标记的复制封闭探针、以及寡聚体对照物，并且一般指多聚脱氧核糖核苷酸（含有 2-脱氧-D-核糖）、多聚核糖核苷酸（含有 D-核糖）以及任何是嘌呤或嘧啶碱基（核苷酸）或修饰的嘌呤或嘧啶碱基的 N-糖苷物的多核苷酸。还包括在“寡核苷酸”定义中的是核酸类似物（如肽核酸）和那些业已在结构上进行修饰的（如硫代磷酸酯键）（也参见 Thuong 等, Biochimie(1985) JuI-Aug 67(7-8):673-684.）。在“核酸”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”的长度之间，没有预期的差别。

[0079] 术语“引物”指一种寡核苷酸（合成的或天然存在的），其作为核酸合成或当置于互补链合成为聚合酶所催化的条件下时沿互补链复制的起始点。

[0080] “合适的调节序列”指影响转录、RNA 加工、RNA 稳定性或相关编码序列翻译且位于编码序列上游(5' 非编码序列)、之中或下游(3' 非编码序列)的核苷酸序列。调节序列可包括启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

[0081] “启动子”指一种能控制编码序列或功能性 RNA 表达的 DNA 序列。一般而言,编码序列位于启动子序列的 3'。启动子可以完全来自天然基因、或由来源于天然存在的不同启动子的不同元件组成,或甚至包含合成的 DNA 片断。本领域技术人员应当明白的是不同的启动子可在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段、或响应不同的环境条件指导基因的表达。能使基因在大部分细胞类型中在大多数时间下或在大多数的环境条件下表达的启动子,通常称为“组成型启动子”。能使基因仅在特定化合物或环境条件存在下表达的启动子,通常称为“诱导型启动子”。由于在大多数情况下,调节序列的确切边界还未完全确定,因此不同长度的 DNA 片段可以具有相同的启动子活性。

[0082] 如本文使用的,术语“可操作地连接”指核酸序列在单一核酸片段上的缔合,使得一个的功能受另一个影响。例如,当启动子能影响编码序列表达时,其就是与编码序列可操作地连接的(即所述编码序列受所述启动子的转录控制)。编码序列可沿有义或反义方向可操作地与调控序列连接。

[0083] “3' 非编码序列”指位于编码序列下游并包括多腺苷酸化识别序列(通常限于真核生物)和其他编码能影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号的序列的 DNA 序列。多腺苷酸化信号(通常限于真核生物)通常特点在于影响多聚腺苷酸束添加到 mRNA 前体的 3' 末端上。

[0084] 本领域技术人员应充分意识到,在使用核苷酸密码子以确定所给定的氨基酸中,特定宿主细胞具有“密码子偏倚”。因此,当合成用于改善在宿主细胞中的表达的基因时,期望设计能使其密码子使用反映优选的宿主细胞密码子偏倚的基因。对序列信息可获得的来源于宿主细胞的基因的调查,可以确定其的密码子偏倚。密码子优化是本领域众所周知的,且业已被描述用于不同的系统,包括但不限于,酵母(Outchkourov 等, *Protein Expr Purif*, 24(1):18-24(2002)) 和大肠杆菌(Feng 等, *Biochemistry*, 39(50):15399-15409(2000))。

[0085] 术语“表达”指由编码基因产物序列的基因转录并翻译为所述基因产物,所述基因产物通常为蛋白质。

[0086] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”可交换地用于指表达的基因产物。

[0087] “密码子简并”指允许核苷酸序列改变而不影响所编码多肽的氨基酸序列的遗传密码的趋异。例如,本领域众所周知三联密码子 CTT、CTC、CTA 和 CTG 都编码氨基酸亮氨酸。本领域还众所周知在给定位置产生化学等价的氨基酸(“保守改变”),但不影响所编码蛋白质的功能特性的基因改变是常见的。因此,编码氨基酸丙氨酸——一种疏水性氨基酸的密码子,可为编码另一种更低疏水性残基(例如甘氨酸)或更高疏水性残基(例如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)的密码子所取代,而不影响所编码蛋白质的功能特性。同样地,用一个带负电荷残基取代另一个(例如用天冬氨酸取代谷氨酸)或用一个带正电荷残基取代另一个(例如用赖氨酸取代精氨酸)也可被认为产生功能性等价产物。导致蛋白质分子 N-末端和 C-末端部分改变的核苷酸改变也不应被认为要改变所述蛋白质活性。每个被提议的修饰都充分地落在本领域的常规技术范围内,如确定所编码产物的生物学活性是否保持。

**[0088] 敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 腈水解酶**

[0089] 敏捷食酸菌 72W 腈水解酶 (EC 3.5.5.1) 是一种用于由脂肪族或芳香族腈产生羧酸的稳定催化剂 (US 6,870,038 和 Chauhan 等, (同上))。还已显示能催化 3-羟基腈转化为 3-羟基羧酸 (US 6,562,603)。

[0090] 所有已知的腈水解酶,包括敏捷食酸菌 72W 腈水解酶,在酶活性中心都具有亲核的半胱氨酸 (Cowan 等, *Extremophiles*, 2:207-216 (1998); Pace, H. 和 Brenner, C, *Genome Biology*, 2(1):reviews 1-9 (2001); 和 Chauhan 等, 同上) 且都易受硫醇试剂 (1.0mM 浓度的氯化铜、硝酸银、乙酸汞或氯化铁,每一种都引起敏捷食酸菌 72W 腈水解酶活性大幅减少) 影响而失活。半胱氨酸残基也能被不可逆地氧化为亚磺酸,导致酶活性损失。尽管腈水解酶对多种失活机制敏感,但是固定化的敏捷食酸菌 72W 细胞是稳定的,在多次重复利用反应后能保持其大部分腈水解酶活性 (US 6,870,038)。

[0091] 业已报道了敏捷食酸菌 72W 腈水解酶和其他细菌腈水解酶的序列比较 (Chauhan 等, 同上)。该 72W 腈水解酶具有几个保守的特征结构域,包括邻近氨基末端的 16-氨基酸区 (SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 40-55) 和含有必需的半胱氨酸残基的催化区 (SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 160-173)。该半胱氨酸残基 (SEQ ID NO:4 的 Cys164),连同保守的谷氨酸 (SEQ ID NO:4 的 Glu48) 以及赖氨酸残基 (SEQ ID NO:4 的 Lys130),形成在所有腈水解酶中都存在的催化三联基序 (Pace, H., 和 Brenner, C, 同上)。尽管在报道的腈水解酶中存在某些结构上类似的保守,但是这些酶的底物特异性变化很大 (O' Reilly, C. 和 Turner, P., *J Appl Microbiol*, 95:1161-1174 (2003))。

**[0092] 酶特性**

[0093] 在指定条件下,测试具有改善的相对腈水解酶活性的突变的 72W 腈水解酶,所述腈水解酶活性能将 3-羟基戊腈转化为 3-羟基戊酸或将 3-羟基丁腈转化为 3-羟基丁酸。使用测量 3-HVN 至 3-HVA 转化的筛选方法来选择那些具有改善的腈水解酶活性的腈水解酶突变体。

[0094] 通过与对照 (敏捷食酸 72W(ATCC 55746) 腈水解酶) 的腈水解酶活性比较测定腈水解酶活性的改善。通过将所测得的活性单位 (U) 除以催化剂重量计算腈水解酶活性。可根据纯化的蛋白质重量、细胞湿量、细胞干重或固定化的催化剂 (GA/PEI- 交联的催化剂 / 藻酸盐珠子) 的重量测定催化剂重量。在本发明中,腈水解酶活性记录为每克细胞干重的活性单位 (U/g DCW) 或每克催化剂珠子 (固定化的催化剂对照) 的活性单位。基于细胞干重作为单位催化剂重量的腈水解酶活性对照,应当考虑腈水解酶蛋白质产生水平。测定不同转化体和对照之间的表达水平,并观察到是基本上相同的。因此。对于不同的突变体而言,所报道的腈水解酶活性的改善归因于酶结构上的修饰。

[0095] 在相同的载体 (pTrcHis2-TOPO) 和宿主 (大肠杆 TOP10) 或大肠杆菌 FM5 背景中表达本发明突变的腈水解酶 (以及敏捷食酸菌 72W(ATCC 55746) 腈水解酶对照; SEQ ID NO:4) 的编码序列。SDS-PAGE 分析 (如使用激光光密度分析法定量) 证明了在每种突变体 (和对照) 中腈水解酶蛋白质表达水平是基本上相同的 (如由于使用相同的表达系统和宿主所预期的)。相对酶活性被记录为对不同突变的催化剂所测定的腈水解酶活性对于在表达敏捷食酸菌 72W 腈水解酶 (SEQ ID NO:4) 的大肠杆菌对照转化株中所测定的腈水解酶活性的倍数增加。

[0096] 对于未固定化的催化剂,通过测定每克细胞干重的 0.5M 的 3- 羟基腈溶液在 25°C (pH 7.0) 下转化为 3- 羟基羧酸的转化率,确定突变的腈水解酶的腈水解酶活性 (U/g 细胞干重)。对于固定化的催化剂对照,通过在 35°C (pH 7.0) 下测定 0.4M 的 3-HVN 溶液转化为 3-HVA 的转化率确定具体的活性,并记录为每克珠子的腈水解酶活性单位 (U/g 珠子)。一单位的腈水解酶活性 (U) 相当于在 25°C (或 35°C 下,对于固定化的催化剂) 下 1 微摩尔 3- 羟基羧酸 / 分钟的产生。在本发明中,在 3- 羟基戊酸或 3- 羟基丁酸产生的基础上记录腈水解酶活性单位。

[0097] 对于特定的突变的腈水解酶,使用下列格式之一,关于敏捷食酸菌 72W 氨基酸序列 (SEQ ID NO :4) DNA 编码区中的点取代突变以及所得到的氨基酸改变得详细来说明:

[0098] 1. 扩展格式:提供了 SEQ ID NO :4 中野生型氨基酸 (使用标准的 3- 字母缩写) 和相应的氨基酸残基位置,之后是在相同的残基位置处见于突变体中的新氨基酸,例如。“Thr210 改变为 Ala”或“Thr210 → Ala”描述了一种在 SEQ ID NO :4 中氨基酸残基第 210 位处作为突变的结果——苏氨酸被该改变为丙氨酸的突变。

[0099] 2. 简写形式:野生型氨基酸 (表示为标准的单字母缩写) 之后是 SEQ ID NO :4 的氨基酸残基位置,再后是突变的氨基酸 (也表示为标准的单字母缩写)。例如,“T210A”描述了一种在 SEQ ID NO :4 中氨基酸残基第 210 位处作为突变的结果——苏氨酸被该改变为丙氨酸的突变。

[0100] 3- 羟基腈水解为 3- 羟基羧酸:

[0101] 通过将 3- 羟基腈 (例如 3- 羟基戊腈或 3- 羟基丁腈) 与酶催化剂的水悬浮液混合进行水解反应。完整的重组微生物细胞 (表达本发明突变的腈水解酶) 可用作为酶催化剂,无需任何预处理。或者,所述微生物细胞可固定在聚合物基质 (如藻酸盐珠子或聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 颗粒) 中或固定在不溶性载体 (如硅藻土) 上以便于所述酶催化剂的回收和再使用。纯化的或部分纯化的酶还可分离自所述全细胞,并且可被直接用作为催化剂,或者所述酶可固定在聚合物基质中或固定在不溶性载体上。先前已报道了敏捷食酸菌 72W 腈水解酶的固定化 (US 6,870,038)。业已广泛地报道了用于细胞或分离的酶固定化的方法,并且为本领域技术人员众所周知 (Methods in Biotechnology, Vol.1 :Immobilization of Enzymes and Cells; Gordon F. Bickerstaff, 编辑; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997)。

[0102] 反应混合物水溶液中酶催化剂的浓度取决于所述酶催化剂特定的催化活性,并被选择以获得所期望的反应速率。在水解反应中用作为催化剂的微生物细胞的细胞湿重通常在每毫升总反应体积 0.001g-0.250g 湿细胞之间,优选为每毫升 0.002g-0.050g 湿细胞。

[0103] 选择水解反应温度以优化反应速率和酶催化剂活性的稳定性。反应温度可在仅高于反应混合物凝固点 (大约 0°C) 到 65°C 的范围内,优选的反应温度在 5°C -35°C。微生物细胞催化剂悬浮液可通过将细胞悬于蒸馏水中,或悬于保持 5.0-10.0 优选 6.0-9.0 的反应初始 pH 的缓冲水溶液中得到制备。当反应进行时,由于来自相应的腈官能团的羧酸铵盐的形成,可改变反应混合物的 pH。反应可进行直至将 3- 羟基戊腈或 3- 羟基丁腈完全转化,不需要控制 pH,或在整个反应过程中可添加适合的酸或碱以维持所需的 pH。

[0104] 在 25°C 下,发现 3- 羟基戊腈和 3- 羟基丁腈可以任何比例与水完全混溶。在选择使得 3- 羟基腈的溶解性也取决于溶液温度和 / 或水相中盐浓度 (缓冲液或产物 3- 羟基羧酸铵盐) 的反应条件的情况下,反应混合物可最初由两相组成:含有酶催化剂和溶解的

3-羟基脒的水相以及有机相（不溶解的 3-羟基脒）。当反应进行时，3-羟基脒溶解在水相中，最后获得单一相的产物混合物。反应还可通过以大约等于酶促水解反应速率的速率将 3-羟基脒添加到反应混合物中得以进行，由此维持了单一相反应混合物水溶液，并避免了潜在的在高原料浓度下酶底物抑制的问题。

[0105] 从产物混合物中分离 3-羟基羧酸

[0106] 3-羟基戊酸或 3-羟基丁酸可作为质子化羧酸及其相应的铵盐的混合物（取决于所述产物混合物的 pH）存在于产物混合物中，亦可作为羧酸盐与任何可额外地存在于产物混合物中的缓冲液额外地存在。视所需，3-羟基羧酸产物可作为质子化羧酸或作为羧酸盐分离自反应混合物。

[0107] 在 3-羟基脒完全转化下，产物混合物中 3-羟基羧酸的终浓度可在 0.001M 至 3-羟基羧酸产物溶解度极限的范围内。优选地，3-羟基戊酸的浓度应在 0.10M-2.0M 范围内。通过使用浓盐酸将反应混合物的 pH 调节到 1.0-2.5 之间、用氯化钠饱和和所得到的溶液、并用诸如甲基叔丁醚、乙醚或二氯甲烷的适合的有机溶剂萃取 3-羟基戊酸，可从反应混合物（在除去催化剂后）中分离 3-羟基戊酸。然后将所混合的有机萃取物与合适的干燥剂（如硫酸镁）一起混合、搅拌，过滤，并除去溶剂（如通过旋转蒸发），以高产率和高纯度（通常为 98-99% 纯的）产生所期望的产物。如果需要，所述产物可通过重结晶或蒸馏来进一步纯化。

[0108] 使用类似于那些上述用于 3-羟基戊脒的方法（参见随后的实施例）将 3-羟基丁脒酶促水解为 3-羟基丁酸，在高达 100% 的 3-羟基丁脒转化下，以 100% 产率产生 3-羟基丁酸。

[0109] 使用 3-羟基羧酸的聚合物合成

[0110] 先前业已报道了使用线型 3-羟基羧酸或其酯合成多支共聚多酯 (US 6, 562, 603)，其中至少两个重复单位来源于至少一个结构为  $R^1O-CR^4R^5CR^6R^7C(O)OR^1$  的线型 3-羟基羧酸或其酯，以及至少一个结构为  $(R^2O)_n-R-[C(O)OR^1]_m$  的高支化羟基羧酸或其酯，其中 R 是  $C_{1-12}$  烷基或具有  $n+m$  自由价的部分或完全取代的羟基，在此某些或所有的氢原子可被碳原子取代， $R^1$  是 H、 $C_{1-12}$  或羟基取代的  $C_{1-12}$  烷基， $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$  是 H 或  $C_{1-12}$  烷基， $R^2$  是 H 或  $(O)CR^3$ ， $n+m$  是 3 或更多，且条件是  $n$  和  $m$  之一是 1，这些重复单位还可来源于可形成聚酯的等价化合物，例如羟基羧酸酯。化合物  $(R^2O)_n-R-[C(O)OR^1]_m$ ，由于具有三个或更多的官能团，有时被称为高支化单体。超过一个这样的单体可以这样聚合的形式存在。优选  $n+m$  是 3 或 4。本领域众所周知的常用酯化催化剂（例如，质子酸、路易斯酸或碱性催化剂包括磺酸，磷酸或膦酸，醇钛，二烷基锡氧化物，锡、锌、锰、钙、镁或铈的氧化物、碳酸盐和羧酸盐）可与这些单体一起使用来形成聚酯。用于制备聚酯的方法是本领域众所周知的。

[0111] 3-羟基羧酸的分析

[0112] 适合于分析 3-羟基羧酸产生的分析方法是本领域众所周知的，包括但不限于 HPLC、CE、GC 和 MS。例如，HPLC 分析被用于测定 3-羟基戊酸产生的量，其使用了折光率检测器和 Supelco LC-18-DB 柱 (15cmx4.6mm 直径)，用溶于 10mM 乙酸/10mM 乙酸钠水溶液中的 7.5% (v/v) 甲醇作为流动相（对于 3-羟基戊脒反应），或 Bio-Rad HPX-87H 柱 (30cmx7.8mm 直径) 和在 50°C 下 0.001N 硫酸作为流动相（对于 3-羟基丁脒反应）。

[0113] 微生物表达

[0114] 本发明的脲水解酶突变体可在异源宿主细胞中生产,优选在微生物宿主中生产。在本发明中特别有用的是容易适用于大规模发酵方法的细胞。这样的生物体是工业生物工艺领域众所周知的,其的例子可见于 Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications, Murooka 等,编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, NY(1994), 并包括发酵细菌以及酵母和丝状真菌。宿主细胞可包括但不限于丛毛单胞菌 (*Comamonas* sp.)、棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.)、短杆菌 (*Brevibacterium* sp.)、红球菌、固氮菌 (*Azotobacter* sp.)、柠檬酸杆菌 (*Citrobacter* sp.)、肠杆菌 (*Ehterobacter* sp.)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium* sp.)、克雷白氏杆菌 (*Klebsiella* sp.)、沙门氏菌 (*Salmonella* sp.)、乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)、曲霉 (*Aspergillus* sp.)、糖酵母 (*Saccharomyces* sp.)、接合酵母 (*Zygosaccharomyces* sp.)、毕赤氏酵母 (*Pichia* sp.)、克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces* sp.)、假丝酵母 (*Candida* sp.)、汉森氏酵母 (*Hansenula* sp.)、杜氏藻 (*Dunaliella* sp.)、德巴利氏酵母 (*Debaryomyces* sp.)、毛霉 (*Mucor* sp.)、球拟酵母 (*Torulopsis* sp.)、甲基杆菌 (*Methylobacteria* sp.)、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)、埃希氏杆菌 (*Escherichia* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 和链霉菌 (*Streptomyces* sp.)。特别优选的是大肠杆菌。其中突变的脲水解酶基因可被表达的适合的大肠杆菌宿主细胞的例子包括,但不限于在此列举的宿主细胞和 MG1655 (ATCC 47076)、FM5 (ATCC 53911)、W3110 (ATCC 27325)、MC4100 (ATCC 35695)、W1485 (ATCC 12435) 及其衍生物。

[0115] 先前已报道了敏捷食酸菌 72W 脲水解酶的异源表达 (Chauhan 等, 同上和 US 6, 870, 038)。Chauhan 等报道了一种表达活性敏捷食酸菌 72W 脲水解酶的大肠杆菌菌株 (大肠杆菌 SS1001 (ATCC PTA-1177))。与野生型 72W 脲水解酶序列 (SEQ ID NO :3) 相比,该重组表达的 (大肠杆菌 SS1001) 脲水解酶的编码序列含有两个微小的序列改变。起始密码子由 GTG 改变为 ATG 以利于重组表达,且在克隆过程中导入引起邻近 C-末端的单个氨基酸改变的人工产物 (Pro367 [CCA] → Ser [TCA])。

[0116] 本发明突变的脲水解酶,如 SEQ ID NOs :5、7、11、13、15 和 17 提供的编码序列所示,在重组宿主 (大肠杆菌) 中表达。在工业上合适的宿主中进行重组表达具有几个优点。首先,与由大多数获得目的基因的微生物得到的遗传工具相比,对于大多数常用的生产宿主,其遗传工具箱通常得到充分开发。与在天然宿主中表达相比,在这些宿主中重组表达一般更具成本效率。例如,业已显示当通过发酵培养时,敏捷食酸菌 72W 细胞得在甘油——一种相当昂贵的碳底物上生长,而使用便宜的葡萄糖却无法成功地生长。与此相反,与敏捷食酸菌 72W 细胞相比,在约一半时间内,大肠杆菌转化体就可在葡萄糖上生长至相同的细胞密度,显著地降低了生物催化剂生产成本 (US 6, 870, 038)。

[0117] 含有指导高水平外源蛋白质表达的调节序列的微生物表达系统和表达载体是本领域技术人员众所周知的。这些可用于构建用来生产本发明突变的脲水解酶的基因产物的嵌合基因。然后,通过转化可将这些嵌合基因导入适当的微生物中,以提供高水平的突变的脲水解酶表达。本发明的核苷酸被用来产生具有相对于天然的敏捷食酸菌 72W 脲水解酶 (pNM18 对照 ;SEQ ID NO :4) 增加的或改变的活性水平的基因产物。

[0118] 此外,在改变宿主细胞特性上嵌合基因应当是有效的。例如,在适当的启动子控制下,将至少一个编码本发明的脲水解酶的嵌合基因拷贝导入宿主细胞,赋予了该宿主细胞

改善的将 3- 羟基戊腈或 3- 羟基丁腈分别转化为 3- 羟基戊酸或 3- 羟基丁酸的能力。本发明的嵌合基因应包含适合的用于驱动本发明突变的腈水解酶序列基因表达的调节序列。调节序列可包括,但不限于启动子、翻译前导序列和核糖体结合位点。如果这些序列来源于宿主生物体,则是优选的;但是,本领域技术人员应当认识到也可以使用异源调节序列。

[0119] 通过将嵌合基因克隆入适合的表达载体中,其可被导入适当的宿主中。可用于适合的宿主细胞转化的载体或表达盒是本领域众所周知的。一般而言,所述载体或表达盒含有指导有关基因转录和翻译的序列、可选择的标记以及容许自主复制或染色体整合的序列。适合的载体包含具有转录起始控制的编码序列的 5' 区和控制转录终止的 DNA 片段的 3' 区。尽管这样的控制区无需来源于选择作为生产宿主的特定物种自身的基因,当这两个控制区都来源于与宿主细胞同源的基因时,则是最优选。

[0120] 在一个实施方案中,所述调节序列应包括启动子。启动子可以是组成型或诱导型的。诱导型启动子一般响应于特定的刺激(如 IPTG 诱导的 lac 启动子)。诱导型启动子可以响应于多种刺激,包括化学药品、生长周期、温度改变、pH 改变和摩尔渗透压浓度改变,仅举了几个例子。

[0121] 用于在期望的宿主细胞中驱动本发明突变的腈水解酶表达的起始控制区或启动子为数众多,且为本领域技术人员所熟悉,包括但不限于 CYC1、HIS 3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TPI(用于在糖酵母属中表达);AOX1(用于在毕赤氏酵母中表达);和 lac、trp、 $1P_L$ 、 $1P_R$ 、T7、tac、 $P_{BAD}$ 、npr 和 trc(用于在大肠杆菌中表达)。例子包括至少一种选自大肠杆菌的色氨酸操纵子启动子 P<sub>trp</sub>、大肠杆菌的乳糖操纵子启动子 P<sub>lac</sub>、大肠杆菌的 P<sub>tac</sub> 启动子、 $\lambda$  噬菌体右翼启动子 PR、 $\lambda$  噬菌体左翼启动子 PL、T7 启动子和来自甲醇酵母(*Pichia pastoris*)的 GAP 基因的启动子的启动子,或是至少一种强启动子,选自由从毛单胞菌属、棒状杆菌属、短杆菌属、红球菌属、固氮菌属、柠檬酸细菌属、肠杆菌属、梭菌属、克雷白氏杆菌属、沙门氏菌属、乳酸杆菌属、曲霉属、糖酵母属、毕赤氏酵母属、接合酵母属、克鲁维氏酵母属、假丝酵母属、汉森氏酵母属、杜氏藻属、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属、*Methylobacteria*、芽孢杆菌属、埃希氏杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属和链霉菌属组成的微生物。

[0122] 终止控制区还可来源于不同的优选宿主自身的基因。任选地,终止位点可以是不需要的;但是,如果包括的话,则是最优选的。

[0123] 此外,所插入的遗传物质可包括核糖体结合位点。所述核糖体结合位点可来自  $\lambda$  噬菌体 CII 基因或选自:从毛单胞菌属、棒状杆菌属、短杆菌属、红球菌属、固氮菌属、柠檬酸细菌属、肠杆菌属、梭菌属、克雷白氏杆菌属、沙门氏菌属、乳酸杆菌属、曲霉属、糖酵母属、毕赤氏酵母属、接合酵母属、克鲁维氏酵母属、假丝酵母属、汉森氏酵母属、杜氏藻属、德巴利酵母属、毛霉属、球拟酵母属、*Methylobacteria*、芽孢杆菌属、埃希氏杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属和链霉菌属基因的核糖体结合位点。

[0124] 任选地,本发明的基因产物可优选地为转化的宿主的分泌产物。期望蛋白质分泌到生长培养基中简化了纯化程序并降低了费用。分泌信号序列通常用于促进可表达的蛋白质主动转运通过细胞膜。可通过将编码分泌信号的 DNA 序列掺入宿主中产生能分泌的转化的宿主。用于选择适当的信号序列的方法是本领域众所周知的(参见例如 EP 546049;WO 9324631)。所述分泌信号 DNA 可位于表达控制 DNA 和本发明的编码序列或编码序列片段之



间,以及位于带有后者的阅读框中。

#### [0125] 蛋白质工程

[0126] 通过诱变生产本发明突变的胨水解酶。预期本发明的核苷酸可用于生产具有进一步增强的或改变的活性的基因产物。用于突变天然基因序列以产生具有改变的或增强的活性的基因产物的多种方法是公知的,包括但不限于 1) 随机诱变,2) 结构域交换(使用锌指结构域或限制性内切酶),3) 易错 PCR(Melnikov 等, *Nucleic Acids Research*, 27(4): 1056-1062(1999));4) 位点定向诱变(Coombs 等, *Proteins*(1998), pp 259-311, 1 plate. Angeletti, Ruth Hogue, Ed., Academic: San Diego, CA);和 5) “基因改组”(US 5,605,793; US 5,811,238; US 5,830,721;和 US 5,837,458,在此并入作为参考)。

[0127] 通过错误掺入核苷酸,聚合酶链式反应(PCR)可用于扩增带有伴随多个突变产生的 DNA 片段。这可通过改变 PCR 条件例如改变 dNTPs 比率或在反应中添加不同数量的氯化锰而得以实现(Fromant 等, *Anal Biochem*, 224(1):347-53(1995);Lin-Goerke 等, *Biotechniques*, 23(3):409-12(1997))。然后,可克隆突变的 DNA 片段库以产生突变质粒文库,在诸如大肠杆菌的宿主中表达后,接着可对所述文库进行筛选。

[0128] 由于基因改组的方法容易实施且诱变率高并易于筛选,因此其是特别具有吸引力的。基因改组的方法包括在具有与目的基因相似性和/或差异的额外几群 DNA 区存在下,用限制性内切核酸酶将目的基因切割为特定大小的片段。然后,该片段库应变性并重退火以产生突变的基因。接着,筛选改变活性的所述突变的基因。

[0129] 可通过该方法突变本发明的微生物序列,并筛选改变或增强的活性。该序列应当是双链的且可以具有从 50bp 到 10kB 不同的长度。使用本领域众所周知的限制性内切核酸酶,该序列可以被随机消化为约 10bp 到 1000bp 的片段(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY(1989);在下文中“Maniatis”)。除本发明的微生物序列之外,可以添加与微生物序列全部或部分能杂交的片段群。同样地,也可以添加不能与本发明序列杂交的片段群。一般来说,与总的核酸相比,这些附加的片段群以约 10-20 倍过量添加。一般地,如果执行该方法,则混合物中不同的特定核酸片段的数目会在约 100 至约 1000。对混合的随机核酸片段群变性以形成单链核酸片段,然后重退火。只有那些具有与其他单链核酸片段同源的区域的双链核酸片段会重退火。可通过加热变性随机核酸片段。本领域技术人员能确定完全变性双链核酸所必需的条件。优选温度为约 80°C -100°C。可通过冷区重退火核酸片段。优选温度为约 20°C -75°C。可通过添加聚乙二醇(“PEG”)或盐加速复性。适合的盐浓度可在 0mM-200mM。然后在核酸聚合酶和 dNTPs(即 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP)存在下温育退火的核酸片段。所述核酸聚合酶可以是 Klenow 片段、Taq 聚合酶或任何其他本领域公知的 DNA 聚合酶。可在退火先前、退火同时或退火后,添加所述聚合酶到随机核酸片段。在聚合酶存在下,变性、复性和温育循环重复期望的次数。优选所述循环重复约 2-50 次,更优选所述次序重复 10-40 次。所得到的核酸是一种约 50bp 至约 100kB 的较大的双链多核苷酸,且通过标准的克隆和表达实验设计,对于表达和改变的活性可进行筛选(Maniatis, 同上)。

[0130] 此外,可通过使用基因改组(外显子改组)方法融合功能域装配杂合蛋白质(Nixon 等, *PNAS*, 94:1069-1073(1997))。本发明基因的功能域可与其他基因的功能域相结

合以产生具有期望催化功能的新酶。可使用 PCR 重叠延伸方法构建杂合酶并使用本领域技术人员众所周知的技术将其克隆入不同的表达载体中。

### [0131] 3-羟基羧酸的工业生产

[0132] 在期望使用本发明突变的腓水解酶基因商业性生产 3-羟基羧酸之处,多种培养方法可应用于生产腓水解酶催化剂。发酵,其可以分批、补料分批或连续的模式进行,为本领域所常见和众所周知的(Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第 2 版(1989)Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, (1989);Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36(3):227-234(1992))。

[0133] 典型的分批培养方法是一种封闭系统,在其中培养基组合在培养开始时就设定好的,在培养过程中不进行人工改变。因此,在培养过程开始时,就将期望的生物体接种培养基,并且在不添加任何物质到该系统中的情况下,让其生长或进行代谢活动。但是,一般来说,“分批”培养是针对碳源的添加而言的分批,并且通常试图控制诸如 pH 和氧浓度的因素。在分批系统中,该系统的代谢物和生物量组成稳定地改变着,直到培养结束。在分批培养中,细胞通过静止停滞期到高速生长对数期并最终到达稳定期,其中,在稳定期生长速度降低或停止。如果不进行处理。处在静止期的细胞最终会死亡。对数期的细胞通常决定最终产物或在某些系统中的中间产物的产量。静止期或指数期后生产可以在其他系统中获得。

[0134] 标准分批系统的变化形式是补料分批系统。补料分批培养方法同样适用于本发明,并且包括典型的分批系统,所不同的是,随着培养的进行,以增量形式添加底物。当代谢物抑制倾向于抑制细胞的代谢以及当培养基中需要具有有限量的底物时,可以使用补料分批系统。要测定补料分批系统的实际底物浓度是困难的,因此,根据可测定因素,如 pH,溶解氧,以及诸如 CO<sub>2</sub> 的废气的分压的变化进行估算。分批和补料分批培养方法是常用的并且为本领域众所周知,其例子可见于 Brock(同上)和 Deshpande(同上)。

[0135] 腓水解酶催化剂的商业性生产还可以通过连续培养来实现。连续培养是一种开放系统,其中,将规定的培养基连续地添加到生物反应器中,并且同时将等量的条件培养基取出进行加工。连续培养通常将细胞保持在恒定的高液相密度下,其中,细胞主要是在对数期生长。或者,可用固定化的细胞进行连续培养,其中连续添加碳和养分以及不断地从细胞团块中将有价值的产物、副产物或废弃产物取出。可使用多种由天然和/或合成材料组成的载体进行细胞固定化。

[0136] 连续或半连续培养可以调节能够影响细胞生长或最终产物浓度的一种因素或任意数目的因素。例如,一种方法能保持限制养分,如让碳源或氮含量处在固定比例上,并且允许所有其他参数处在适当水平上。在其他系统中,可以连续地改变影响生长的多种因素,同时保持通过培养基浊度测量的细胞浓度恒定。连续系统试图保持稳态生长条件,因此,通过取出培养基所导致的细胞减少,必须与培养物中的细胞生长速度平衡。调节连续培养方法的养分和生长因子的方法,以及用于使产物形成速度最大化的方法在工业微生物学领域中是众所周知的,并且由 Brock(同上)详细披露了多种方法。

[0137] 本发明的发酵培养基必须含有适合的碳底物。适合的碳底物可以包括,但不限于诸如葡萄糖和果糖的单糖、诸如乳糖或蔗糖的二糖、诸如淀粉或纤维素或其混合物的多糖、以及来自诸如干酪乳清渗透物、玉米浆、甜菜糖浆和大麦芽的可再生原料的未纯化的混合

物。因此,预计用于本发明的碳源可包括多种含碳底物,并且仅受限于所选择的生物体。

#### [0138] 实施例

[0139] 适用于细菌培养物保持和生长的材料和方法是本领域众所周知的。适用于下列实施例的技术可见于 Manual of Methods for General Bacteriology; Phillip Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg 和 G. Briggs Phillips, 编辑; American Society for Microbiology; Washington, DC, (1994) 或 Brock (同上)。

[0140] PCR 扩增、通过核酸内切酶和核酸外切酶产生期望的末端用于 DNA 克隆的 DNA 修饰、连接和细菌转化需要的操作是本领域众所周知的。在此使用的标准的重组 DNA 和分子克隆技术是本领域众所周知的,并且由 Maniatis (同上) 和 T. J. Silhavy 等 (in Experiments with Gene Fusions, (1984) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY); 以及 Ausubel 等 (in Current Protocols in Molecular Biology (1994-1998) John Wiley & Sons, Inc., New York) 所描述。

[0141] 除非另作说明,所有用于细菌细胞生长和保持的试剂和原料都获得自 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) 或 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)。业已通过在三乙基铝存在下将氰化氢与 1,2-环氧丁烷反应 (FR 1446127),以通过在二正丁基硼烷基三氟甲基磺酸盐 (di-n-butylboryl triflate) 存在下乙腈与丙醛的反应制备了 3-羟基戊腈 (Hamana 等, Chem. Lett. 1401-1404 (1982))。业已通过脂肪酶催化的 2-氰基-1-甲基乙酸乙酯水解制备了旋光性的 3-羟基戊腈 (Itoh 等, J. Org. Chem. 62:9165-9172 (1997))。

[0142] 说明书中相应于测量单位、技术、特性或化合物的缩写如下:“s”表示秒,“min”表示分钟,“h”表示小时,“d”表示天,“ $\mu$ L”表示微升,“mL”表示毫升,“L”表示升,“mM”表示毫摩尔,“M”表示摩尔,“mmol”毫摩尔,“amp”表示氨苄青霉素,“kb”表示千碱基,“kd”表示千道尔顿,“nm”表示纳摩,和“wt”表示重量,“ORF”表示开放阅读框,“PCR”表示聚合酶链式反应,“SSC”表示柠檬酸钠盐水缓冲液,“HPLC”表示高效液相色谱,“ca”表示大约,“rxn”表示反应,“dcw”表示细胞干重,“OD”表示在指定波长下的光密度,“AU”表示吸光度单位,“rpm”表示每分钟转数,“slpm”表示每分钟标准升数,“U”表示单位,“IU”表示国际单位,以及“IPTG”表示异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷。

#### [0143] 实施例 1

##### [0144] 通过易错聚合酶链式反应构建敏捷食酸菌 72W 腈水解酶随机诱变文库

[0145] 根据厂商使用说明,使用 Puregene DNA 分离试剂盒 (Genra Systems, Minneapolis, MN) 由敏捷食酸菌 72W (ATCC 55746) 制备基因组 DNA。根据 GeneMorph PCR 诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA) 提供的使用说明,对敏捷食酸菌 72W 腈水解酶基因 (编码序列; SEQ ID NO:3) 进行易错 PCR,使用标识为 SEQ ID NO:1 (5' -GCGCATATGGTTTCGTATAACAGCAAGTTCC-3') 和 SEQ ID NO:2 (5' -ATAGGATCCTTATGGCTACTTTGCTGGGACCG-3') 的引物。使用的推荐产生低突变频率 (0-3 次突变/kb) 和中等突变频率 (3-7 次突变/kb) 的反应条件。根据 pTrcHis2 TOPO TA 表达试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提供的使用说明,将 10% 的 1.1kb PCR 产物连接入表达载体 pTrcHis2 TOPO 中。根据供应厂商 (Invitrogen) 的推荐,将一半的连接混合物转化到大肠杆菌 TOP10 中。将 1% 的转化混合

物涂布 (plated) 在补充有 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上。所得到的转化体共计 200-400 个克隆, 表明所产生的总 PCR 产物能产生 400,000-800,000 个克隆, 远多于筛选改善的酶活性所需的。通过随机选择的克隆样品的核苷酸序列分析证实了突变频率。如所预计的, 序列分析也证实了大约 50% 的插入物是以正向存在。SDS-PAGE 分析证实了当如推荐的进行生长和诱导时 (Invitrogen), 基本上所有的克隆都具有表达 41kD 腈水解酶蛋白质的正向插入物。

[0146] 此外, 通过标准的 PCR 扩增了敏捷食酸菌 72W 腈水解酶基因, 使用标识为 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 的引物, 并根据厂商推荐, 将所得到的 DNA 产物克隆入 pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) 中, 以产生质粒 pNM18。用 pNM18 转化大肠杆菌 TOP10 产生的菌株用作为对照。除起始密码子由 GTG 变为 ATG 之外, pNM18 中的敏捷食酸菌 72W 腈水解酶“对照”序列和野生型敏捷食酸菌 72W 的编码序列相同, 利于在大肠杆菌中表达。

#### [0147] 实施例 2

##### [0148] 对敏捷食酸菌 72W 腈水解酶随机诱变文库筛选增加的腈水解酶活性

[0149] 将来自每个易错 PCR 文库的大约 5,000 个克隆涂布在补充有 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂上。使用机器人技术在 96-孔微量滴定板中进行高通量筛选。在单个克隆于补充有 50mg/L 氨苄青霉素和 1mM IPTG 的液体 LB 中在 37°C 200rpm 摇动培养 18h 后, 培养物在 37°C 下补充 10mM 3-羟基戊腈 (3-HVN), 持续 1h, 80Hz 线性振荡。通过滤出细菌终止反应, 并将要被分析的上清液密封在微量滴定板中并贮藏在 4°C 直到分析。通过质谱测定法 (APCI-MRM, 流动相 95% MeOH/5% H<sub>2</sub>O, 5mL/min; 注射针洗涤 50% MeOH/50% H<sub>2</sub>O, 每注射针 4mL/min) 测定产生的 3-羟基戊酸 (3-HVA)。鉴定了显示 3-HVN 转化超过对照 (大肠杆菌 TOP10/pNM18) 大约 5 倍的三个克隆, 并命名为大肠杆菌 TOP10/pNM18/B4、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9。

#### [0150] 实施例 3

##### [0151] 测定大肠杆菌 TOP 10/pNM18 (对照)、大肠杆菌 TOP 10/pNM18/B4、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 腈水解酶活性

[0152] 通过将含有 50mg/L 氨苄青霉素的 50mL 的 LB 培养基添加到无菌的 125mL 烧瓶中, 然后刮取冷冻的细胞原液入烧瓶中并在 37°C 和 200rpm 下温育所得到混合物 12-16h, 制备接种物。记录所得到培养物的光密度, 然后将 80% 甘油水溶液以 15% (v/v) 的终浓度添加, 并将所得到接种物的 14.3mL 等分试样添加到 50-mL 离心管中, 在使用前冷冻贮藏在 -80°C 下。向 4-L 无菌烧瓶中添加 1.80L 的 LB 肉汤、0.9mL 氨苄青霉素水溶液 (100mg/mL) 以及 1.8mL 的 IPTG 水溶液 (1.0M)。然后, 向该烧瓶中添加 87.5mL 的大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照)、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B4、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 或大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 接种物, 混合烧瓶的内含物, 并将所得到的混合物的 250-mL 等分试样转移到六个无菌 1-L 烧瓶的每一个中。培养物在 37°C 下以 200rpm 旋转混合温育 8h, 通过在 4°C 下离心收集来自每个烧瓶的细胞, 并冷冻贮藏在 -80°C 下。

[0153] 向装备有磁力搅拌条的 4-mL 玻璃管形瓶中添加 1.0mL 的 1.0M 3-羟基戊腈水溶液, 并再温控水浴中将管形瓶及其内含物平衡在 25°C。一边搅拌, 一边将预平衡至 25°C 的含有 400mg 湿细胞糊的 1.0mL 的 0.100M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 添加到管形瓶中。在预定时间, 取出样品 (0.100mL) 并与由 0.100mL 水、0.020mL 的 6.0N 乙酸和 0.200mL 的 0.20M 丁

酸钠水溶液 (HPLC 外标物) 组成的溶液混合。离心所得到的混合物, 并通过 HPLC 对所得到的上清液分析 3-羟基戊酸, 使用 Supelco LC-18-DB 柱 (15cmX4.6mm): 流动相: 10mM 乙酸钠 (NaOAc) 水溶液、10mM 乙酸 (AcOH)、7.5% (v/v) 甲醇。基于 3-羟基戊酸的产生速率, 测定中所使用的每一细胞糊的细胞干重 (dcw) 被用于测定大肠杆菌 TOP10/pNM18 (表 1)、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B4 (表 2)、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 (表 3) 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 (表 4) 的脲水解酶活性。大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照)、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B4、大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 相对脲水解酶活性的比较列于表 5 中。

[0154] 表 1

[0155] 大肠杆菌 TOP10/pNM18 脲水解酶活性 (对照)

[0156]

	OD(600nm)	OD(600nm)	3-HVN U/g
烧瓶	0h	8h	细胞干重
TOP10/pNM18-1	0.080	2.25	2.00
TOP10/pNM18-2	0.081	2.19	2.20
TOP10/pNM18-3	0.083	2.28	2.07
TOP10/pNM18-4	0.082	2.29	1.96
TOP10/pNM18-5	0.085	2.23	2.13
TOP10/pNM18-6	0.081	2.19	2.11
TOP10/pNM18 (平均)			2.08

[0157] 表 2

[0158] 大肠杆菌 TOP10/pNM18/B4 脲水解酶活性

	OD (600 nm)	OD (600 nm)	3-HVN U/g
烧瓶	0 h	8 h	细胞干重
TOP10/pNM18/B4-1	0.067	1.88	3.75
TOP10/pNM18/B4-2	0.078	2.05	3.78
TOP10/pNM18/B4-3	0.075	1.88	3.69
TOP10/pNM18/B4-4	0.080	1.84	3.83
TOP10/pNM18/B4-5	0.080	1.98	3.69
TOP10/pNM18/B4-6	0.085	1.79	3.25
TOP10/pNM18/B4 (平均)			3.67

[0160] 表 3

[0161] 大肠杆菌 TOP10/pNM18/B2 脲水解酶活性

[0162]

	OD(600nm)	OD(600nm)	3-HVN U/g
烧瓶	0h	8h	细胞干重
TOP10/pNM18/B2-1	0.086	1.82	13.62
TOP10/pNM18/B2-2	0.073	1.89	11.47
TOP10/pNM18/B2-3	0.088	2.13	12.83
TOP10/pNM18/B2-4	0.078	2.13	10.51
TOP10/pNM18/B2-5	0.085	2.13	11.67
TOP10/pNM18/B2-6	0.083	1.78	11.82
TOP10/pNM18/B2(平均)			12.0

[0163] 表 4

[0164] 大肠杆菌 TOP10/ρ NM18/H9 脲水解酶活性

[0165]

	OD(600nm)	OD(600nm)	3-HVN U/g
烧瓶	0h	8h	细胞干重
TOP10/pNM18/H9-1	0.095	2.89	16.32
TOP10/pNM18/H9-2	0.074	2.56	15.62
TOP10/pNM18/H9-3	0.090	2.51	15.84
TOP10/pNM18/H9-4	0.090	2.44	15.41
TOP10/pNM18/H9-5	0.100	2.46	14.41
TOP10/pNM18/H9-6	0.085	4.63	14.87
TOP10/pNM18/H9(平均)			15.4

[0166] 表 5

[0167] TOP10/pNM18 突变体脲水解酶活性总结

[0168]

	3-HVN U/g	脲水解酶活性, 相对于
菌株	细胞干重	TOP10/pNM18

TOP10/pNM18(对照)	2.08	1.0
TOP10/pNM18/B4	3.67	1.8
TOP10/pNM18/B2	12.0	5.8
TOP10/pNM18/H9	15.4	7.4

[0169] 实施例 4

[0170] 鉴定敏捷食酸菌 72W 脘水解酶中赋予增加的脘水解酶活性的突变

[0171] 使用核苷酸序列分析确定在 3 个克隆 (TOP10/pNM18/B4、TOP10/pNM18/B2 和 TOP10/pNM18/H9) 每一个中存在的具有增加的脘水解酶活性的突变,并推断相应的氨基酸改变。与 TOP10/pNM18 对照 (SEQ ID NOs :3 和 4) 相比, TOP10/pNM18/B2 和 TOP10/pNM18/H9 (SEQ ID NOs :5 和 6), 其是相同的, 具有一个氨基酸改变 (Thr210 改变为 Ala ;T210A), TOP10/pNM18/B4 (SEQ ID NOs :7 和 8) 具有 3 个氨基酸改变 (Tyr65 改变为 Cys (Y65C) ; Phe174 改变为 Ile (F174I) ;以及 Thr210 改变为 Ile (T210I))。这些改变都不包含在该酶的催化结构域中,或众多脘水解酶之间通常的保守区中,表明无法预测演绎出在这些特定残基处的改变会产生脘水解酶活性改善。如通过 SDS-PAGE 凝胶激光光密度分析所定量的,这些改变都不具有任何可检测到的对脘水解酶蛋白质的产生的影响。

[0172] 实施例 5

[0173] 在苏氨酸残基 210 处的饱和诱变

[0174] 使用 QuikChange 位点定向诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA) 将 72W 脘水解酶第 210 位的苏氨酸残基改变为其他 19 种氨基酸的任何一种。根据厂商使用说明,使用简并寡核苷酸,并通过核苷酸测序测定证实所产生的密码子改变。通过使用非简并的寡核苷酸掺入期望的特定密码子改变,制备通过上述方法无法获得的任何密码子改变。例如,使用标识为 SEQ ID NO :9 (5' -CGAAGCCAACGCGACGGTCATGCGCTCGTACGCAATCGAAGG-3' ) 和 SEQ ID NO :10 (5' -CCTTCGATTGCGTACGAGCGCATGACCGTCGCGTTGGCTTCG-3' ) 的引物 (下划线核苷酸显示新的密码子) 获得 210Met (T210M)。

[0175] 测定所有 20 种酶变体的脘水解酶活性。除先前鉴定的 210Ala (T210A) 改善之外 (实施例 3 和 4), 对于 210Cys (T210C, SEQ ID NOs :11 和 12) 观察到相对于对照 (pNM18) 增加的活性 (表 6 和 7)。如通过 SDS-PAGE 分析所测定的, 210Cys 改变对脘水解酶蛋白质的产生没有可检测到的影响。我们发现在残基 210 处没有其他改变能产生脘水解酶活性改善; 对于脘水解酶活性, 某些改变没有效果 (例如, 210Val (T210V)), 并且某些改变具有有害的效果 (例如, 210Gly (T210G))。这些结果表明无法预测演绎出在残基 210 处任何给定突变的效果。

[0176] 表 6

[0177] 大肠杆菌 TOP10/pNM18/210Cys 脘水解酶活性

烧瓶	OD (600 nm) 0 h	OD (600 nm) 8 h	3-HVN U/g 细胞干重
TOP10/pNM18/210Cys-1	0.075	2.09	9.98
TOP10/pNM18/210Cys-2	0.086	2.07	11.79
TOP10/pNM18/210Cys-3	0.079	2.34	11.35
TOP10/pNM18/210Cys-4	0.083	2.08	11.57
TOP10/pNM18/210Cys-5	0.090	2.28	9.81
TOP10/pNM18/210Cys-6	0.085	2.16	11.09
TOP10/pNM18/210Cys (平均)			10.97

[0178] 表 7

[0180] 210Cys 突变体脲水解酶活性总结

[0181]

菌株	3-HVN U/g dcw	相对的脲水解酶活性
TOP10/pNM18(对照)	1.77	1.0
TOP10/pNM18/210Cys	11.0	6.2

[0182] 实施例 6

[0183] 大肠杆菌 TOP10/pNM18 细胞 (对照) 或大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 细胞在钙 - 交联的藻酸盐中的固定化

[0184] 向 4.0-L 无菌烧瓶中添加 1.80L 的 LB 肉汤、0.9mL 氨苄青霉素水溶液 (100mg/mL) 和 1.8mL 的 IPTG 水溶液 (1.0M)。然后, 向该烧瓶中添加 87.5mL 大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照) 或大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 接种物, 混合烧瓶内含物, 并将所得到混合物的 250-mL 等分试样转移到 7 个无菌 1-L 烧瓶的每一个中。在 37°C 下以 200rpm 旋转混合温育培养物 8h, 混合得到的细胞悬浮液, 在 40°C 离心收集细胞并贮藏于 -80°C。对于大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照), 在 600nm 处的平均起始 OD 为 0.133AU, 8h 后平均结束 OD 为 2.13AU, 产生 ca. 6g 细胞糊。对于大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9, 平均结束 OD 为 1.68AU, 产生 ca. 5g 细胞糊。

[0185] 在 50°C 下, 一边快速搅拌, 一边缓慢地向装备有磁力搅拌条并含有 7.46g 蒸馏的去离子水的 100-mL 培养瓶中添加 0.413g 的 FMC BioPolymer Protanal® LF 10/60 藻酸盐。一边快速搅拌, 一边将混合物加热到 75-80°C, 直至藻酸盐完全溶解, 并在水浴中将所得到溶液冷却到 25°C。搅拌的同时向藻酸盐悬浮液添加 4.75g 大肠杆菌 (pNM18) 湿细胞糊 (23.7% 细胞干重) 和 2.37mL 蒸馏水, 或 4.97g 大肠杆菌 (pNM18/H9) 湿细胞糊 (22.6% 细胞干重) 和 2.15mL 蒸馏水。在 25°C 下, 搅拌的同时通过注射器将细胞 / 藻酸盐混合物逐滴添加到 80mL 的 0.20M 乙酸钙缓冲液 (pH 7.0) 中。在搅拌 2h 后, 将缓冲液从所得到珠子上轻轻倒出, 在 25°C 下重悬于 30mL 的 0.20M 乙酸钙缓冲液 (pH 7.0) 中。搅拌的同时, 在 25°C 下添加 0.61g 的 25wt% 戊二醛 (GA) 水溶液并与珠子混合 1.0h。接着, 向该悬浮液添加 2.42g 的 12.5wt% 聚氮丙啶 (PEI) (BASF Lupasol® PR971L, 平均分子量 ca. 750,000) 水溶液, 并在 25°C 下与珠子再混合 1h。然后在 25°C 下用 30mL 的 5mM 乙酸钙缓冲液 (pH 7.0) 洗涤交联的珠子两次, 并在 5°C 下贮藏于含有 1.0M 乙酸铵、4mM 乙酸钙和 10mM 碳酸氢铵的含水缓冲液 (pH 7.1) 中。



## [0186] 实施例 7

[0187] 藻酸盐-固定的大肠杆菌 TOP 10/pNM18/H9 或大肠杆菌 TOP10/pNM18(对照) 作为催化剂用于 3-羟基戊腈水解的比较

[0188] 在装备有高架搅拌器的 50-mL 夹套式反应器 (使用环流式温度水浴中控制温度) 放置 6.0g 如实施例 6 所述制备的 GA/PEI- 交联的大肠杆菌 TOP10/pNM18 细胞 / 藻酸盐珠子 (对照)。向该反应器中添加 13.4mL 蒸馏的去离子水、0.2mL 0.20M 乙酸钙缓冲液 (pH 7.0, 在反应混合物中 2.0mM 钙离子终浓度) 和 0.40mL (0.386g) 3-羟基戊腈 (0.400M 总浓度), 并在 35°C 下搅拌混合物。将样品 (0.200mL) 与 0.200mL 200mM 丁酸钠 (HPLC 外标物) 混合, 通过 HPLC 分析上清液。25h 后, 3-HVN 的转化率为 100%, 3-HVA 的产率为 100%。大肠杆菌 TOP10/pNM18 细胞 / 藻酸盐珠子催化剂 (对照) 的腈水解酶活性为 0.4493-HVN U/g 珠子。

[0189] 除催化剂是 6.0g 如实施例 6 所述制备的 GA/PEI- 交联的大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 细胞 / 藻酸盐珠子之外, 立即重复上述反应。19h 后, 3-HVN 的转化率为 100%, 3-HVA 的产率为 100%。大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 细胞 / 藻酸盐珠子催化剂的腈水解酶活性是 2.853-HVN U/g 珠子 (与对照相比, 6.35- 倍改善)。反应结束后, 将产物混合物从催化剂珠子上轻轻倒出, 并在 35°C 下将额外的 13.3mL 蒸馏的去离子水、0.2mL 0.20M 乙酸钙缓冲液 (pH 7.0, 2.0mM 在反应混合物中 2.0mM 钙离子终浓度) 和 0.40mL (0.386g) 3-羟基戊腈 (0.400M 总浓度) 与固定化的细胞催化剂混合。20h 后, 3-HVN 的转化率为 100%, 3-HVA 的产率为 100%。催化剂的腈水解酶活性是 2.99U/g 珠子。重复该循环操作总共 21 次连续反应, 对于每次反应, 将催化剂的腈水解酶活性和活性回收百分率列于表 11 中。对于反应 21 (表 8), 20h 后 3-HVN 的转化率为 100%, 3-HVA 的产率为 100%, 催化剂的腈水解酶活性是最初催化剂活性的 81%。

## [0190] 表 8

[0191] 在 35°C 下 0.40M 3-HVN 反应中, GA/PEI- 交联的大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 细胞 / 藻酸盐珠子的腈水解酶活性和催化剂活性回收百分率

[0192]

rxn #	3-HVN U/g 催化剂珠子	回收百分率	rxn #	3-HVN U/g 催化剂珠子	回收百分率
1	2.85	-	11	2.98	105
2	2.99	105	12	3.13	109
3	2.59	91	13	2.83	98
4	3.75	130	14	2.77	98
5	3.45	121	15	2.81	98
6	3.07	109	16	2.67	95
7	3.09	109	17	2.68	95
8	3.33	116	18	2.50	88
9	2.97	105	19	2.49	88
10	2.82	98	21	2.34	81

## [0193] 实施例 8

[0194] 大肠杆菌 FM5/pNM18(对照) 和 FM5/pNM18/H9 细胞的构建和发酵

[0195] 利用本领域众所周知的氯化钙方法, 用质粒 pNM18 (实施例 1) 和 pNM18/H9 (实施

例 2) 独立地转化大肠杆菌菌株 FM5(ATCC 53911)。

[0196] 在 14-L Braun Biostat C 发酵罐 (B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany) 中,于含有葡萄糖、氨水、酵母抽提物和盐的矿质培养基中制备产生腓水解酶。在发酵罐接种前,分别含有质粒 pNM18 和 pNM18/H9 的大肠杆菌菌株 FM5/pNM18(对照)和 FM5/pNM18/H9(如实施例 1 和 2 所述)在种子培养物中生长 10-20h。在规定时间内添加 IPTG,并在 IPTG 添加 24h 后收获细胞。

[0197] 发酵方案:以含有 80g 酵母抽提物、160g 酪蛋白氨基酸 (caseamino acids)、8.0g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、8.0g  $(NH_4)_2SO_4$  和 10mL Mazu DF204 消泡剂 (BASF Corporation, Mount Olive, NJ) 的 7.5L 起始批量的方式制备容器培养基。灭菌后,添加 369g 葡萄糖溶液 (60% w/w)、160mL 微量元素溶液 (表 9)、200mL  $PO_4$  溶液 (21.0g  $K_2HPO_4$  和的 11.0g  $KH_2PO_4$  溶于蒸汽灭菌的调节 pH 至 6.8 的 200mL  $diH_2O$  中) 和 100mg/L 氨苄青霉素。使用  $NH_4OH$  (40% w/v) 和 20% w/v  $H_2PO_4$  作为 pH 控制物。搅拌、通气、pH、压力、溶解氧浓度 (DO) 和温度的设定值如下表 10 所述。溶解氧浓度控制在 25% 空气饱和度,同时搅拌以首先开始增加需氧量并接着通气。500mL 种子培养物在 36°C、300rpm 下于 2-L 烧瓶中生长 10-20h 至  $> 2.0$  的  $OD_{\lambda = 550}$ 。在发酵罐中,20-300D 的培养物密度下,添加额外的 AMP 至 100mg/L。在对于 FM5/pNM18 35-400 $OD_{\lambda = 550}$  和对于 FM5/pNM18/H9 20-300 $OD_{\lambda = 550}$  下,对 FM5/pNM18(对照) IPTG 添加至 0.1mM,对 FM5/pNM18/H9 则添加至 1mM。葡萄糖进料开始在  $< 5g/L$ ,预定速率描述于表 11。如果葡萄糖累积超过 2g/L,则降低葡萄糖进料速率。IPTG 添加 24 小时后,将细胞冷却至 5-10°C 并通过离心收获。

[0198] 表 9

[0199] 微量元素溶液

[0200]

化学物质	浓度
柠檬酸	10g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.5g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.39g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.38g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.3g/L

[0201] 表 10

[0202] 发酵运转条件

[0203]

	初始设定值	最小	最大
搅拌器 (rpm)	400	400	850
气流 (slpm)	2	2	16
pH	6.8	6.8	6.8
压力 (kPa)	3.45	3.45	3.45
DO	25%	25%	25%
温度℃	36	36	36

[0204] 表 11

[0205] 葡萄糖进料方案

[0206]

时间 (h)	速率 (g/min)
0-4	0.27
4-16	0.55
16-End	0.42

[0207] 如实施例 3 所述测定大肠杆菌 FM5 转化体的 3-HVN 脲水解酶活性。在两次相同的发酵运转中产生的大肠杆菌 FM5 菌株的脲水解酶活性列于下表 12 中, 并与敏捷食酸菌 72W 和大肠杆菌 SS1001 (ATCC PTA-1177 ;US 6, 870, 038) 的脲水解酶活性比较。与敏捷食酸菌 72W 相比, 大肠杆菌 SS1001 脲水解酶催化剂改善 (先前所述的) 归因于改善的脲水解酶表达。与此相反, 与大肠杆菌 FM5/pNM18 (对照) 相比, 已证实的大肠杆菌 FM5/ρ NM18/H9 显著的改善归因于由酶结构修饰产生的改善的脲水解酶活性。与大肠杆菌 FM5/pNM18 (对照) 相比, 大肠杆菌 FM5/pNM18/H9 除大约 5.5 倍脲水解酶活性改善之外, 值得注意的是的大肠杆菌 FM5/pNM18/H9 的脲水解酶活性较大肠杆菌 SS1001 也高约 4.2 倍。

[0208] 表 12

[0209] 大肠杆菌 FM5 菌株与敏捷食酸菌 72W 以及大肠杆菌 SS1001 的 3-HVN 脲水解酶活性比较

	菌株	3-HVN U/g dcw
[0210]	敏捷食酸菌 72W	3.2
	大肠杆菌 SS1001	7.6
	大肠杆菌 FM5/pNM18-run1 (control)	5.98
	大肠杆菌 FM5/pNM18-run2 (control)	5.55
	大肠杆菌 FM5/pNM18/H9-run1	31.3
	大肠杆菌 FM5/pNM18/H9-run2	31.8

[0211] 实施例 9

[0212] 大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照) 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 水解 3-HBN 和 3-HVN 的脲水解酶活性比较

[0213] 根据实施例 3 所述方法,重复制备大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照) 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9,并如实施例 3 所述,对所得到的细胞测定水解 0.5M 3-羟基戊腈 (3-HVN) 或 0.5M 3-羟基丁腈 (3-HBN) 的脲水解酶活性 (表 13)。相对于大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照),大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 对 3-HBN 的脲水解酶活性是 ca. 1.9 倍。

[0214] 表 13

[0215] 大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照) 和大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9 水解 3-HBN 和 3-HVN 的脲水解酶活性

[0216]

	底物	U/g
菌株	(0.5M)	细胞干重
大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照)	3-HVN	1.94
大肠杆菌 TOP10/pNM18 (对照)	3-HBN	2.69
大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9	3-HVN	14.0
大肠杆菌 TOP10/pNM18/H9	3-HBN	5.2

[0217] 实施例 10

[0218] 72W 脲水解酶催化结构域的靶向饱和诱变

[0219] 根据厂商使用说明,使用简并寡核苷酸和位点定向诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA) 完成敏捷食酸菌 72W 脲水解酶 (SEQ ID NO:4) 催化结构域 (160G 161G 162L 163N 164C 165W 166E 167H 168F 169Q 170P 171L 172S 173K) 的那些在已知细菌脲水解酶中不普遍保守的残基 (下划线的) 中的饱和诱变。具体来说,构建 9 个小文库 (500-1000 个克隆),每个文库靶向各自的活性部位残基。如前所述 (实施例 2),对这些文库筛选增加的 3-HVN 脲水解酶活性。鉴定了 11 个克隆 (所有的都来自 168F (Phe168) 的小文库),每个克隆都证实具有超过对照 (pNM18) 大约 2-3 倍的 3-HVA 产生。使用核苷酸测序确定赋予增加的脲水解酶活性的特定密码子改变 (表 14)。尽管没有直接测定脲水解酶活性,但是

SDS-PAGE 分析测定每个突变体产生了基本上相同的脲水解酶蛋白质水平。因此,推断由突变体增加的 3-HVA 产生归因于酶增加的脲水解酶活性。

[0220] 表 14

[0221] 残基 168 饱和诱变改善总结

[0222]

第168位残基氨基酸	mM/hr 3-HVA	增加倍数
Phe (对照)	0.55	---
Lys (SEQ ID NOs:13 和 14)	1.38 (n=3)	2.5
Val (SEQ ID NOs:15 和 16)	1.39 (n=6)	2.5
Leu (SEQ ID NOs:17 和 18)	1.34 (n=2)	2.4

[0001]

## 序列表

- <110> E. I. duPont de Nemours and Company, Inc.  
Di Cosimo, Robert  
Payne, Mark  
O'Keefe, Daniel
- <120> 使用腈水解酶突变体生产 3-羟基羧酸
- <130> CL2584 PCT
- <160> 18
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 1  
gcgcatatgg ttctgtataa cagcaagttc c 31
- <210> 2  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 2  
atagatcct tatggctact ttgctgggac cg 32
- <210> 3  
<211> 1110  
<212> DNA  
<213> 敏捷食酸菌 72W
- <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1110)
- <400> 3  
atg gtt tgc tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
1 5 10 15  
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tgc atc ggc atc 96  
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
20 25 30

[0002]

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	144
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys 50 55 60	192
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu 65 70 75 80	240
ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys 85 90 95	288
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr 100 105 110	336
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat ccg Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg 115 120 125	384
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly 130 135 140	432
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly 145 150 155 160	480
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met 165 170 175	528
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser 180 185 190	576
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr 195 200 205	624
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser 210 215 220	672
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp 225 230 235 240	720
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr 245 250 255	768
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag	816

[0003]

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu 260 265 270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys 275 280 285	864
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser 290 295 300	912
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile 305 310 315 320	960
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg 325 330 335	1008
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly 340 345 350	1056
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa cgg gtc cca gca Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala 355 360 365	1104
aag tag Lys	1110
<210> 4 <211> 369 <212> PRT <213> 敏捷食酸菌 72W	
<400> 4	
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu 1 5 10 15	
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile 20 25 30	
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys 50 55 60	
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu 65 70 75 80	

[0004]



Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile

[0005]

305	310	315	320
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg	325	330	335
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly	340	345	350
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala	355	360	365

Lys

<210> 5  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 突变的脲水解酶 B2 和 H9

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 5	
atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggc gac gac egt atg egt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336

[0006]

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100	105 110
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115	120 125
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130	135 140
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145	150 155 160
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165	170 175
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tgc tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180	185 190
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195	200 205
gtc gcc cgc tgc tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tgc	672
Val Ala Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210	215 220
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac	720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	
225	230 235 240
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac	768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr	
245	250 255
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag	816
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu	
260	265 270
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag	864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys	
275	280 285
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tgc egg cct gac glg ctg tgc	912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser	
290	295 300
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att	960
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile	
305	310 315 320
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga	1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg	
325	330 335

[0007]

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
                   340                                  345                                  350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa cgg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
                   355                                  360                                  365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 6  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的脲水解酶 B2 和 H9

<400> 6

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1                                  5                                  10                                  15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
                   20                                  25                                  30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
                   35                                  40                                  45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
                   50                                  55                                  60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65                                  70                                  75                                  80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
                   85                                  90                                  95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
                   100                                  105                                  110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
                   115                                  120                                  125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
                   130                                  135                                  140

[0008]

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Ala Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

[0009]

Lys

<210> 7  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变的脲水解酶 B4

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 7  
 atg gtt tog tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15  
 ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30  
 atc gaa gaa get gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45  
 gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60  
 tgc agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
 Cys Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80  
 ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95  
 atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336  
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110  
 ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg 384  
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125  
 cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc 432  
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140  
 aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt 480  
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

[0010]

gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag atc atg atg Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Ile Met Met	528
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tgc tgg ccg gcg atg tcc Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	576
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	624
195 200 205	
gtc atc cgc tgc tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tgc Val Ile Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	672
210 215 220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	720
225 230 235 240	
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr	768
245 250 255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu	816
260 265 270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys	864
275 280 285	
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tgc cgg cct gac gtg ctg tgc Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser	912
290 295 300	
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile	960
305 310 315 320	
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg	1008
325 330 335	
ctg cga caa gcg get gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly	1056
340 345 350	
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala	1104
355 360 365	
aag tag Lys	1110

&lt;210&gt; 8

[0011]

<211> 369  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 突变的腓水解酶 B4  
  
 <400> 8  
  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1                   5                   10                   15  
  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
                   20                   25                   30  
  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
           35                   40                   45  
  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
       50                   55                   60  
  
 Cys Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65                   70                   75                   80  
  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
                   85                   90                   95  
  
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
           100                   105                   110  
  
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
           115                   120                   125  
  
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
       130                   135                   140  
  
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145                   150                   155                   160  
  
 Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Ile Met Met  
           165                   170                   175  
  
 Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
           180                   185                   190  
  
 Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr

[0012]



195	200	205
Val Ile Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser		
210	215	220
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp		
225	230	235
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr		
245	250	255
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu		
260	265	270
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys		
275	280	285
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser		
290	295	300
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile		
305	310	315
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg		
325	330	335
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly		
340	345	350
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala		
355	360	365

Lys

- <210> 9
- <211> 42
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 引物

<400> 9  
 cgaagccaac ggcagcgtea tgcgctcgta cgcaatcgaa gg

<210> 10		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引物		
<400> 10		
ccttcgattg cgtacgagcg catgaccgtc gcgttggctt cg		42
<210> 11		
<211> 1110		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Thr210 改变为 Cys 的突变的腈水解酶		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1).. (1110)		
<400> 11		
atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag		48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu		
1                            5                            10                            15		
cgc gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc		96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile		
20                            25                            30		
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa		144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu		
35                            40                            45		
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag		192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys		
50                            55                            60		
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta		240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu		
65                            70                            75                            80		
ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa		288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys		
85                            90                            95		
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat		336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr		
100                            105                            110		
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg		384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg		
115                            120                            125		

[0014]

cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly 130 135 140	432
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly 145 150 155 160	480
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met 165 170 175	528
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser 180 185 190	576
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr 195 200 205	624
gtc tgc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg Val Cys Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser 210 215 220	672
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp 225 230 235 240	720
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr 245 250 255	768
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu 260 265 270	816
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys 275 280 285	864
get gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser 290 295 300	912
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile 305 310 315 320	960
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg 325 330 335	1008
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly 340 345 350	1056
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca	1104

[0015]

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 12  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Thr210 改变为 Cys 的突变的腓水解酶

<400> 12

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

[0016]

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Cys Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1110

[0017]

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Phe168 改变为 Lys 的突变的腈水解酶  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)  
  
 <400> 13  
 atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15  
  
 ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tgc atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30  
  
 atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45  
  
 gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60  
  
 tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tgc ttg gag cta 240  
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80  
  
 ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95  
  
 atc gca ctc gtc atg ggc tat tgc gag cgg gaa gcc gga tgc cgc tat 336  
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110  
  
 ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg 384  
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125  
  
 cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc 432  
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140  
  
 aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt 480  
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160  
  
 gga ttg aac tgc tgg gaa cat aaa caa ccg ctc agc aag ttc atg atg 528  
 Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Lys Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175  
  
 tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tgc tgg ccg gcg atg tcc 576  
 Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser

[0018]

180	185	190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr			624
195	200	205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser			672
210	215	220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp			720
225	230	235	240
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr			768
245	250	255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu			816
260	265	270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys			864
275	280	285	
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser			912
290	295	300	
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile			960
305	310	315	320
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg			1008
325	330	335	
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly			1056
340	345	350	
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala			1104
355	360	365	
aag tag Lys			1110

<210> 14  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Phe168 改变为 Lys 的突变的脲水解酶

[0019]

<400> 14

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Lys Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

[0020]



Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 15  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Phe168 改变为 Val 的突变的脲水解酶

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 15  
 atg gtt tgc tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

48

[0021]

cgc gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile 20 25 30	96
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	144
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys 50 55 60	192
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu 65 70 75 80	240
ggt gac gac cgt atg cgt cgc etc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys 85 90 95	288
atc gca ctc gtc atg ggc tat teg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr 100 105 110	336
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat ccg Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg 115 120 125	384
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly 130 135 140	432
aac gga acc gat ttc etc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly 145 150 155 160	480
gga ttg aac tgc tgg gaa cat gtt caa ccg ctc agc aag ttc atg atg Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met 165 170 175	528
tac agc etc ggt gag cag gtc cac gtt gca tog tgg ccg gcg atg tcc Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser 180 185 190	576
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr 195 200 205	624
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser 210 215 220	672
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa aog ttc tgc etc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp 225 230 235 240	720
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac	768

[0022]

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr 245 250 255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu 260 265 270	816
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys 275 280 285	864
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser 290 295 300	912
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile 305 310 315 320	960
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg 325 330 335	1008
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly 340 345 350	1056
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala 355 360 365	1104
aag tag Lys	1110
<210> 16	
<211> 369	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Phe168 改变为 Val 的突变的腓水解酶	
<400> 16	
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu 1 5 10 15	
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile 20 25 30	
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	

[0023]

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

[0024]

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
355 360 365

Lys

<210> 17  
<211> 1110  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Phe168 改变为 Leu 的突变的脲水解酶

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1110)

<400> 17  
atg gtt tgg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
1 5 10 15  
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tgg atc ggc atc 96  
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
20 25 30  
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc ggc agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
35 40 45  
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60  
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tgg ttg gag cta 240  
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu

[0025]

65	70	75	80	
ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa				288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys				
	85	90	95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tgc gag cgg gaa gcc gga tgc cgc tat				336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr				
	100	105	110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg				384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg				
	115	120	125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac gcc gaa ggc				432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly				
	130	135	140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt				480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly				
	145	150	155	160
gga ttg aac tgc tgg gaa cat cta caa ccg ctc agc aag ttc atg atg				528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met				
	165	170	175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tgc tgg ccg gcg atg tcc				576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser				
	180	185	190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg				624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr				
	195	200	205	
gtc acc cgc tgc tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tgc				672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser				
	210	215	220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac				720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp				
	225	230	235	240
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac				768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr				
	245	250	255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat get gag				816
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu				
	260	265	270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag				864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys				
	275	280	285	
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tgc cgg cct gac gtg ctg tgc				912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser				
	290	295	300	

[0026]

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile 305 310 315 320	960
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg 325 330 335	1008
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly 340 345 350	1056
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala 355 360 365	1104
aag tag Lys	1110
<210> 18 <211> 369 <212> PRT <213> 人工序列	
<220> <223> Phe168 改变为 Leu 的突变的胰水解酶	
<400> 18	
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu 1 5 10 15	
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile 20 25 30	
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys 50 55 60	
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu 65 70 75 80	
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys 85 90 95	
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr 100 105 110	

[0027]

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly

[0028]



340

345

350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
355 360 365

Lys