



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97196510.2

[45] 授权公告日 2003 年 7 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1113100C

[22] 申请日 1997.5.16 [21] 申请号 97196510.2

[30] 优先权

[32] 1996. 5. 17 [33] US [31] 60/017,879

[32] 1997. 4. 25 [33] US [31] 08/845,295

[86] 国际申请 PCT/US97/08668 1997.5.16

[87] 国际公布 WO97/43433 英 1997.11.20

[85] 进入国家阶段日期 1999.1.18

[71] 专利权人 伊斯曼化学公司

地址 美国田纳西州

[72] 发明人 J·C·胡布斯

[56] 参考文献

EP207763A 1987.01.07 C12P17/04

EP292303A 1988.11.23 C12P17/14

审查员 赵学武

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 周慧敏

权利要求书 2 页 说明书 51 页

[54] 发明名称 用于制备抗坏血酸、2-酮-L-古洛糖酸及 2-酮-L-古洛糖酸酯的酶促方法

[57] 摘要

本发明的目的在于用于制备抗坏血酸、2-酮-L-古洛糖酸及 2-酮-L-古洛糖酸酯的有效、高产的方法。该方法包括将合适的起始原料与水解酶催化剂、比如蛋白酶、酯酶、脂肪酶或酰胺酶反应。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于制备抗坏血酸的方法，该方法包括将选自由 2-酮 (keto)-L-古洛糖酸和 2-酮 (keto)-L-古洛糖酸酯组成的组中的化合物与水解酶催化剂接触以生成抗坏血酸。
- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中所说的水解酶催化剂选自由蛋白酶、酯酶、脂肪酶和酰胺酶组成的组中。
3. 权利要求 2 的方法，其中所说的蛋白酶由选自由芽胞杆菌属或曲霉属组成的组的属中获得。
4. 权利要求 3 的方法，其中所说的蛋白酶由地衣形芽胞杆菌细菌
10 获得。
5. 权利要求 4 的方法，其中所说的蛋白酶为具有如 SEQ ID NO:1 所示序列的枯草蛋白酶。
6. 权利要求 2 的方法，其中所说的酯酶由猪肝提取物获得。
7. 权利要求 6 的方法，其中所说的酯酶为具有如 SEQ ID NO:2
15 所示序列的猪肝酯酶。
8. 权利要求 2 的方法，其中所说的脂肪酶由选自由曲霉属、毛霉菌属、假丝酵母属、假单胞菌属、腐质霉属、根霉属、色杆菌属、产碱杆菌属、地霉属和青霉属组成的组的属中获得。
9. 权利要求 8 的方法，其中所说的脂肪酶为具有如 SEQ ID NO:3
20 所示序列的 B 型南极洲假丝酵母脂肪酶。
10. 权利要求 2 的方法，其中所说的酰胺酶由青霉属获得。
11. 权利要求 10 的方法，其中所说的酰胺酶为青霉素酰基转移酶。
12. 权利要求 1 的方法，其中所说的水解酶催化剂含有一个活性
25 位点的丝氨酸残基。
13. 权利要求 12 的方法，其中所说的水解酶催化剂含有一个丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸的催化三联体。
14. 权利要求 1 的方法，其中在将所说化合物与所说水解酶催化剂接触之前，将所说化合物与溶剂一起形成溶液。
- 30 15. 权利要求 14 的方法，其中所说的溶剂选自由水、C₁ 至 C₆ 的醇及其混合物组成的组中。

16. 权利要求 1 的方法，其中将所说化合物与所说水解酶催化剂接触发生在 pH 介于 1.5 和 10 之间的情况下。

17. 权利要求 1 的方法，其中将所说化合物与所说水解酶催化剂接触发生在 5℃ 至 120℃ 的温度下。

5 18. 权利要求 1 的方法，其中在将所说化合物与所说水解酶催化剂接触之前，所说水解酶催化剂是由宿主生物体在体内天然表达的。

19. 权利要求 1 的方法，其中在将所说化合物与所说水解酶催化剂接触之前，将编码所说水解酶催化剂的基因序列插入宿主生物体中，并且培养所说的宿主生物体以在体内表达所说的水解酶催化剂。

10 20. 权利要求 19 的方法，其中所说的宿主生物体为柠檬泛菌。

21. 权利要求 18 或权利要求 19 的方法，其中所说的宿主生物体生产 2-酮-L-古洛糖酸。

用于制备抗坏血酸、2-酮-L-古洛糖酸及
2-酮-L-古洛糖酸酯的酶促方法

5

发明领域

本发明涉及用于制备抗坏血酸、2-酮(keto)-L-古洛糖酸(KLG)和 KLG 的酯的方法。更具体地说,本发明涉及酶催化剂在制备抗坏血酸、KLG 或 KLG 的酯中的用途。

发明背景

10 抗坏血酸、又名维生素 C 是一种必须存在于人类饮食中以预防坏血病并且已经鉴定为可以提高对传染的抗性的试剂的饮食因子。在商业方面,抗坏血酸例如用作营养添加物、固色剂、肉类和其它食品中的调味剂和防腐剂、面包生面团中的氧化剂、收获中的柑橘类水果的切除(abscission)以及分析化学中的还原剂。

15 一种用于制备抗坏血酸的通用方法使用了原始 Reichstein-Grossner 合成的改进方法(Reichstein 等, Helv. Chim. Acta, 17:311 (1934); Reichstein 的美国专利 2,301,811; 本文中所引用的所有文献逐一插入本文仅供参考)。在该方法中把葡萄糖源转化成抗坏血酸。在转化过程中生成了 KLG 的双丙酮化合物的中间体。

20 有几种两阶段方法用于制备抗坏血酸。在第一阶段中,通过发酵方法将葡萄糖或者转化为分离了的 KLG 的中间体(Sonoyama 等,应用与环境微生物学,43:1064-1069 (1982); Anderson 等,科学,230:144-149 (1985); Shinjoh 等,应用与环境微生物学,61:413-420 (1995))或者转化为 Reichstein-Grossner 合成的中间体、即 KLG
25 的双丙酮化合物。

把上述两种中间体之一转化为抗坏血酸的第二阶段是通过两条已经报道的路线中的一条路线进行的。第一条路线、即 Reichstein-Grossner 合成的后继步骤的改进需要多个步骤,由此在强酸条件下使中间体与甲醇发生酯化以生成甲基-2-酮-L-古洛糖酸(MeKLG)。然后使 MeKLG 与碱反应以生成金属抗坏血酸盐。最后,用酸化剂处理金属抗坏血酸盐以得到抗坏血酸。第二条路线为一

30

步法，该方法包括如最初在 Reichstein 的英国专利 466548 中公开、随后由 Yamazaki 改进 (Yamazaki, 日本农业化学协会杂志, 28:890-894 (1954) 与 化学文摘, 50:5992d) 并且再由 Yodice 改进 (WO 87/00839) 的酸催化 KLG 的成环。Yodice 的方法在商业上不受欢迎，因为它使用了大量的气态氯化氢、需要非常昂贵的加工设备并且生产出需要进一步纯化的抗坏血酸产品。

脂肪酶、即一组水解酶已经成功地用于一些有机酸酯的合成中。具体说来，脂肪酶已经用于其中的酯化剂为不可逆的醇的酯基转移作用，比如当醋酸乙烯酯用作酯化剂时 (Thiel, 今日催化, 517-536 (1994))。Gutman 等 (四面体通讯, 28:3861-3864 (1987)) 描述了一种使用猪胰脂肪酶作为催化剂由 γ -羟甲基酯制备简单的 5-元环内酯的方法。但是，Gutman 等 (四面体通讯, 28:5367-5368 (1987)) 随后报道了用 δ -羟甲基酯代替 γ -羟甲基酯并且使用同样的催化剂仅生产出聚合物。在 Sakashita 等的 EP 0 515 694 A1 中，抗坏血酸酯的合成 (在伯羟基上进行酰化) 包括在有脂肪酶存在的条件下在极性有机溶剂中使抗坏血酸与多种脂肪酸的活性酯 (即脂肪酸乙烯酯) 反应。

因此，在现有技术中需要有生产下列物质的方法：(a) 由 KLG 或 KLG 的酯生产抗坏血酸或其金属盐，(b) 由 KLG 的酯生产 KLG 和 (c) 由 KLG 生产 KLG 的酯，所述方法具有高产率和高纯度、极少或者没有副产物产生并且在温和的条件下进行。因此，本发明主要的目的在于提供上述方法。

发明概述

本发明公开了在化学和生物学领域中的进步，其中用于制备抗坏血酸的方法包括使 KLG 或 KLG 的酯与水解酶催化剂接触。

在本发明的另一个实施方案中，用于生产 KLG 的方法包括在水溶液中使 KLG 的酯与水解酶催化剂接触。

在本发明的再一个实施方案中，用于由 KLG 生产 KLG 酯的方法包括使 KLG 的醇溶液与水解酶催化剂接触。醇溶液含有与将要制得的 KLG 酯的烷基部分相对应的醇。

在本发明的再一个实施方案中，用于由 KLG 的酯生产 KLG 的酯的方法包括使第一种 KLG 酯的醇溶液与水解酶催化剂接触。该醇溶液含

有与将要制得的第二种 KLG 酯的烷基部分相对应的醇。

发明详述

5 本发明的目的在于出乎意料地发现使用水解酶作为催化剂通过诱导 KLG 或 KLG 酯的闭环，可以由 KLG、或者更优选地可以由 KLG 的酯生成抗坏血酸。可以在熔化状态或者在溶液中进行用于生产抗坏血酸的方法。该方法也可以在体内或在体外进行。对体内方法而言，水解酶催化剂可以天然存在于宿主细胞中或者可以通过重组 DNA 方法引入到宿主细胞或者生物体中。

10 本发明的目的还在于出乎意料地发现 KLG 可以在可逆反应中通过在水溶液中使用水解酶作为催化剂使 KLG 的酯发生反应来制备。此外，本发明的目的在于出乎意料地发现 KLG 的酯可以通过使用水解酶作为催化剂在醇溶液中使 KLG 或另一种 KLG 的酯发生反应来制备。用于制备上述溶液的醇对应于将要制得的 KLG 的酯的烷基部分。

15 在本发明的方法中用作催化剂的水解酶可以从任何来源适宜的生物体中得到或者分离出来。其中包括的实例有、但却不限于植物、微生物以及动物，比如酵母、细菌、霉菌、真菌、鸟类、爬行动物、鱼类和哺乳动物。正如在酶命名（学术出版社，1992）中规定的那样，对本发明而言的水解酶通常被定义为 E.C. 3.-.-的酶类，并且这些酶可以通过商业途径得到。

20 优选的水解酶为那些能够影响含有羰基或者磷酸基团的分子水解的酶。更具体地说，优选的水解酶为能够影响在含有一个杂原子单键的羰基碳上发生水解的酶。这些含有一个杂原子单键的羰基碳的实例包括、但却不限于酯、硫酯、酰胺、酸、酰基卤及类似物。优选的水解酶包括 E.C. 3.1.-.-的酶类，它包括作用于酯键的水解酶、比如酯酶和脂肪酶；E.C. 3.2.-.-的酶类，它包括糖苷酶；E.C. 3.4.-.-的酶类，它包括肽的水解酶，比如蛋白酶；以及 E.C. 3.5.-.-的酶类，它包括作用于除肽键以外的键的酰胺酶。最优选的水解酶包括蛋白酶、酰胺酶、脂肪酶和酯酶。

30 最优选的水解酶含有活性位点的丝氨酸残基，它能够与 KLG 或 KLG 的酯进行酯化或者酯基转移作用。甚至更为优选的为那些含有丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸的催化三联体的水解酶。

优选的蛋白酶包括那些来源于芽胞杆菌属或曲霉属细菌的蛋白

酶。特别优选的蛋白酶为那些从地衣形芽胞杆菌细菌中得到的蛋白酶。优选的蛋白酶为那些与枯草蛋白酶之间至少具有 70% 的序列同源性的蛋白酶。与枯草蛋白酶具有序列同源性的蛋白酶用于洗涤剂工业中，因此可以方便地得到。更优选的为与枯草蛋白酶之间至少具有 80 % 序列同源性的蛋白酶，甚至更为优选的为与枯草蛋白酶之间至少具有 90 % 序列同源性的蛋白酶，特别是与枯草蛋白酶之间至少具有 95 % 序列同源性的蛋白酶。一种非常优选的蛋白酶为枯草蛋白酶自身，它具有由 Smith 等在《生物化学杂志》243:2184-2191 (1968) 中所描述的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 并且如下所示：

10

15

20

MMRKKSFWLG	MLTAFMLVFT	MAFSDSASAA	QPAKNVEKDY
IVGFKSGVKT	ASVKKDIIKE	SGGKVDKQFR	IINAAKAKLD
KEALKEVKND	PDVAYVEEDH	VAHALAQTVP	YGIPLIKADK
VQAQGFKGAN	VKVAVLDTGI	QASHPDLNVV	GGASFVAGEA
YNTDGNHGHT	HVAGTVAALD	NTTGVLGVAP	SVSLYAVKVL
NSSGSGTYSG	IVSGIEWATT	NGMDVINMSL	GGPSGSTAMK
QAVDNAYARG	VVVVAAAGNS	GSSGNTNTIG	YPAKYDSVIA
VGAVDSNSNR	ASFSSVGAEL	EVMAPGAGVY	STYPTSTYAT
LNGTSMASPH	VAGAAALILS	KHPNLSASQV	RNRLSSTATY
LGSSFYYGKG	LINVEAAAQ.		

为了方便读者，表 1 提供了以上以及在本说明书其余部分中使用的氨基酸简写形式的一览表。

表 1

氨基酸符号	三字母缩写	一字母
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

另外也包括在本发明范围之内的为与以上所示序列的对 1 至 6 个位点具有特异性的突变体、序列添加以及序列缺失相对应的蛋白酶。甚至更优选的为对应于以上所示枯草蛋白酶序列的对 0 至 2 个位点具有特异性的突变体的蛋白酶。

适用于本发明的酯酶包括那些由猪肝提取物中得到的酶。优选的酯酶为那些与猪肝酯酶之间至少具有 70% 序列同源性的酯酶，所述的猪肝酯酶具有由 Matsushima 等在《FEBS Lett.》293:37 (1991) 中所述的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 并且如下所示：

5

	MWLLPLVLTS	LASSATWAGQ	PASPPVVDTA	QGRVLGKYVS
	LEGLAFTQPV	AVFLGVPEAK	PPLGSLRFAP	PQPAEPWSFV
	KNTTSYPPMC	CQDPVVEQMT	SDLFTNFTGK	ERLTLEFSED
	CLYLNITYTPA	DLTKRGRLPV	MVWIHGGGLV	LGGAPMYDGV
10	VLAAHENFTV	VVVAIQYRLG	IWGFFSTGDE	HSRGNWGHLD
	QVAALHWVQE	NIANFGGDPG	SVTIFGESFT	AGGESVSVLV
	LSPLAKNLFH	RAISESGVAL	TVALVRKDMK	AAAKQIAVLA
	GCKTTTSAVF	TFVHCLRQKS	EDELDDTLTK	MKFLTLDLDFHG
	DQRESHPFLP	TVVDGVLLPK	MP EEILAEKD	FTFNTVPYIV
	GINKQEFQWL	LPTMMGFPLS	EGKLDQKTAT	SLLWKSYPPIA
15	NIPPELTPVA	TFTDKYLGGT	DDPVKKKDLF	LDLMGDVVFG
	VPSVTVARQH	RDAGAPTMY	EFQYRPSFSS	DKFTKPKTVI
	GDHGDEIFSV	FGFPLLKGDA	PEEEVSLSKT	VMKFWANFAR
	SGNPNGEGLP	HWPFTMYDQE	EGYLQIGVNT	QAAKRLKGEE
	VAFWNDLLSK	EAAKKPPKIK	HAEL.	

20

25 酯酶更优选与以上所示的猪肝酯酶的序列之间至少具有 80% 的序列同源性、甚至更优选至少有 90% 的序列同源性、特别优选至少有 95% 的序列同源性。非常优选的为具有以上所示序列的猪肝酯酶。

另外也包括在本发明范围内的为与以上所示序列的对 1 至 6 个位点具有特异性的突变体、序列添加以及序列缺失相对应的酯酶。甚至更优选的为对应于以上所示猪肝酯酶序列的对 0 至 2 个位点具有特异性的突变体的酯酶。

30 优选的脂肪酶包括那些从猪和其它哺乳动物、微生物以及植物中

分离出来的酶。这包括、但却不限于从曲霉属、毛霉菌属、假丝酵母属、假单胞菌属、腐质霉属、根霉属、色杆菌属、产碱杆菌属、地霉属和青霉属得到的脂肪酶。优选的脂肪酶也包括胞外脂肪酶、比如角质酶 (cutinase)。更优选的脂肪酶与南极洲假丝酵母 (Candida Antartica) B 型脂肪酶之间至少具有 70% 的序列同源性、甚至更优选至少具有 80% 的序列同源性、愈加更优选至少具有 90% 的序列同源性、甚至更优选至少具有 95% 的序列同源性。一种非常优选的脂肪酶为南极洲假丝酵母 B 型脂肪酶自身, 它具有由 Uppenberg 等在《结构》2:293, 453 (1994) 中所述的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3) 并且如下所示:

	MKLLSLTGVA	GVLATCVAAT	PLVKRLPSGS	DPAFSQPKSV
	LDAGLTCQGA	SPSSVSKPIL	LVPGTGTTGP	QSFDNWIPL
	STQLGYTPCW	ISPPPFMLND	TQVNTEYMVN	AITALYAGSG
15	NNKLPVLTWS	QGGLVAQWGL	TFFPSIRSKV	DRLMAFAPDY
	KGTVLAGPLD	ALAVSAPSVW	QQTGTSALTT	ALRNAGGLTQ
	IVPTTNLYSA	TDEIVQPQVS	NSPLDSSYLE	NGKNVQAQAV
	CGPLFVIDHA	GSLTSQFSYV	VGRSALRSTT	GQARSADYGI
	TDCNPLPAND	LTPEQKVAAA	ALLAPAAAAI	VAGPKQNCEP
20	DLMPYARPFA	VGKRTC SGIV	TP.	

另外也包括在本发明范围内的为与以上所示序列的对 1 至 6 个位点具有特异性的突变体、序列添加以及序列缺失相对应的脂肪酶。甚至更优选的为对应于以上所示 B 型南极洲假丝酵母序列的对 0 至 2 个位点具有特异性的突变体的脂肪酶。

优选的酰胺酶包括那些从青霉菌属的细菌中分离出来的酰胺酶。更优选的酰胺酶与青霉素酰基转移酶之间至少具有 80% 的序列同源性。特别优选的酰胺酶为青霉素酰基转移酶, 它也称作青霉素酰胺水解酶 E.C.3.5.1.11 (Duggleby 等, 自然, 373:264-266 (1995))。

对于在其活性位点上含有丝氨酸的水解酶来说, 人们认为在 KLG 或 KLG 酯的反应中的第一步涉及通过由活性位点丝氨酸的 KLG 的酰化形成了 KLG-酶酯。人们认为分子内的闭环生成了抗坏血酸 (或其

盐)，而醇解则生成了 KLG 的酯、水解则生成了 KLG。

本发明的方法包括将 KLG 或者 KLG 的酯与水解酶接触以生成抗坏血酸。优选地，该反应是在有机溶剂系统、水溶剂系统或其混合物的条件下进行的。有机溶剂优选为 C_1-C_6 的醇。水溶剂系统或者水和有机溶剂混合的系统更为优选，这是因为抗坏血酸、KLG 以及 KLG 的酯通常更易溶于水溶剂系统中。对于在体外从 KLG 的酯生产抗坏血酸而言，优选水和有机溶剂混合的系统或者有机溶剂系统以便使能够生产出副产物 KLG 的竞争水解反应降到最低的程度。当使用完整细胞系统在体内生产抗坏血酸时，特别优选水溶剂系统。

在本发明的一个方面，抗坏血酸是由 KLG 或 KLG 的酯在有水解酶催化剂存在下，在体内在完整细胞以及完整生物体生产系统中生成的。在一个具体实施方案中，水解酶是由宿主生物体天然产生的。在另一个具体实施方案中，水解酶是通过重组 DNA 技术由宿主生物体产生的。例如，将编码水解酶的基因序列插入宿主生物体中，其中所述的宿主生物体可以是能够表达水解酶的微生物、植物或动物。培养产生水解酶的宿主生物体、即在有 KLG 或 KLG 的酯存在的情况下提供适于生长的营养和合适的环境以生产出抗坏血酸。优选的宿主生物体为柠檬泛菌 (*Pantoea Citrea*)，以前在如 Anderson 等的美国专利 5,008,193 中所公开的将其称为草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*)。

另外优选的宿主生物体为一种除了生产水解酶之外还生产 KLG 的生物体。具有代表性的生物体为来自泛菌属或葡萄糖杆菌属的生物体，比如 Shinjoh 等在《应用与环境微生物学》61:413-420 (1995) 中公开的生物体，以及如 Sonoyama 等在《应用与环境微生物学》43:1064-1069 (1982) 中公开的棒状杆菌属的生物体。

正如本文所使用的那样，重组 DNA 技术包括体外重组 DNA 技术、合成技术以及体内重组/遗传重组，并且该技术在现有技术中是众所周知的。例如可以参阅在下列文献中所述的技术：Maniatis 等，《分子克隆实验室手册》，冷泉港实验室，纽约 (1989)；Ausubel 等，《分子生物学通用实验方案》，Greene 出版协会与 Wiley Interscience，纽约 (1989)；Anderson 等，《科学》，230:144-149 (1985)；以及 Estell 等的美国专利 5,441,882。

为了从 KLG 的酯制备 KLG，使 KLG 的酯的水溶液与水解酶反应。在制备 KLG 中可以使用助溶剂并且优选 C-C₆的醇。

5 为了从 KLG 或者从 KLG 的其它酯制备 KLG 的酯，将起始原料溶于醇溶液中，其中的醇对应于将要制得的 KLG 的酯的烷基部分。从中可以得到优选的 KLG 酯的醇 ROH 的烷基部分 R 可以选自支链或直链的、饱和或不饱和的烷基、芳烷基、芳基以及取代的芳基。优选的 R 基团包括 C₁至 C₆的直链或支链的、饱和或不饱和的烷基。针对烷基部分衍生的甚至更优选的 KLG 的酯包括 MeKLG、乙基-KLG、正丙基-KLG、异丙基-KLG、正丁基-KLG、异丁基-KLG、t-丁基-KLG 以及正戊基-KLG。生成的最优选的 KLG 的酯为 MeKLG、这是因为它可以很方便地进行生产，以及丁基-KLG、这是由于在除去水分时可以便利地使用丁醇水的共沸物。在制备 KLG 的酯的过程中可以使用助溶剂并且优选水、C₁-C₆的醇或其混合物。

15 用于进行本发明的反应的优选温度为 5℃至 120℃。甚至更优选的温度为 25℃至 100℃，并且特别优选的温度为 38℃至 80℃。

用于本发明的方法的优选 pH 介于 1.5 和 10 之间，并且更优选的 pH 介于 3 和 10 之间。为了从 KLG 的酯制备抗坏血酸盐，特别优选的 pH 范围在 6 和 10 之间。为了制备呈游离酸形式的抗坏血酸，优选的 pH 在抗坏血酸的 pKa 下，并且更优选在 4.2 下。为了从 KLG 的酯制备 KLG，特别优选的 pH 范围介于 5 和 10 之间，这是因为在该 pH 范围内通常能提高酶协助的水解的速率。另一方面，为了生成呈质子化形式的 KLG，介于 1.5 和 2.5 之间的 pH 尤其合乎要求。最后，为了从 KLG 制备 KLG 的酯，特别优选的 pH 范围介于 3 和 6 之间。

25 每种水解酶都具有最适温度、最适 pH 以及与活性有关的 pH 和温度范围。因此对给定的水解酶而言，适宜的 pH 和温度范围为可以为水解酶的活性创造条件并且避免使水解酶变性或失活的条件。对于可以发生变性的条件而言、比如高温或者使用变性溶剂（如甲醇或者类似物），可以要求进行最小量的测试以限定那些在一系列给定的条件下仍保持活性的水解酶。

30 下面的实施例是通过解释的方式提供的，并且这些实施例不打算限制所要求保护的本发明的范围。

实施例

在质子模式为 300MHZ 和碳模式为 75MHZ 下操作的 Varian Gemini 300 NMR 仪上记录质子和碳核磁共振 (NMR) 光谱。除非另作说明的以外, 所有的 NMR 光谱都以 0 百万分率 (ppm) 的四甲基硅烷 (TMS) 为基准并且以 ppm 记录峰的频率。使用紫外 (UV) 检测进行 HPLC (高效液相层析) 的分析。使用 Fisons VG 分析有限公司的 Autospec 质谱仪在 FD (场解吸) 模式下得到质谱 (MS)。

在本实验中使用的 KLG 是根据 Lazarus 等、Anderson 等在《科学》230:144-149 (1985) 中的方法通过发酵得到的, 并且通过浓缩和结晶进行纯化。另外, KLG 也可以根据本领域中众所周知的方法通过化学转化由 L-山梨糖制得 (例如参见 Reichstein 的美国专利 2,301,811)。甲基-2-酮-L-古洛糖酸的标准品可以从 Aldrich 化学公司 (稀有和特殊化学药品目录) 买到, 另外可以通过如下所述的与用于制备丁基-KLG 的方法类似的方法由 KLG 的酯化来制备。

水解酶样品是从商业来源得到的, 包括 Sigma 化学公司、Altus Biologics、重组生物催化公司、Boehringer Mannheim、Novo Nordisk、Genencor 国际公司、Thermogen 和 Fluka。

实施例 1

本实施例描述了丁基-2-酮-L-古洛糖酸的制备和纯化。

在氩气环境中将 KLG 水合物 (51.62 g) 装入一个 500 ml 的反应容器中。该反应器配备有一个连接到迪安-斯达克榻分水器上的 30.48 cm (12'') 的维格罗分馏柱。然后向反应器中装入正丁醇 (310 g) 和对甲苯磺酸 (2.3 g)。在适度真空的条件下 [大约 19.95 kPa (150 mm Hg)] 在搅拌下使反应混合物回流 (81-82℃)。持续回流共计 2 小时 40 分钟。不再继续加热。使反应冷却并在室温下保持大约 3 天。得到的晶体通过粗多孔玻璃过滤器过滤并用两份正丁醇 (139 g、随后为 37 g) 洗涤。将得到的固体 (24.4 g) 溶解在热的醋酸乙酯 (250 ml) 中, 并在室温下通过静置过夜进行重结晶。通过过滤分离出重结晶的丁基-KLG 并在真空下 [0.1995 kPa (1.5 mm Hg)] 干燥至恒重 (15.97 g) 来实现。

人们发现如此制得的丁基-KLG 在水中具有至少 50% 重量百分数的溶解度, 因为在 50% 重量百分数的情况下在所有的浓度下它都可以溶解在水中。本实施例重结晶的丁基-KLG 具有令人满意的质子和碳

NMR 光谱并且通过场解吸质谱测定给出了预测的分子量。

^1H NMR (DMSO, 数字式分辨率 = 0.11 Hz, 在半高度下的 TMS = 0.5 Hz): 6.49 (OH, d, $J = 1.4$ Hz), 4.96 (OH, d, $J = 5.0$ Hz), 4.84 (OH, d, $J = 4.8$ Hz), 4.78 (OH, d, $J = 7.4$ Hz), 4.17-4.0 (m, 2H), 3.5-3.2 (m, 约为 5H), 1.64-1.5 (m, 2H), 1.4-1.35 (m, 2H), 0.89 (CH_3 , t, $J = 7.3$).

^{13}C NMR (DMSO, 去偶的): 169.4, 96.3, 73.8, 72.8, 69.8, 64.5, 62.8, 30.0, 18.4, 13.5.

FDMS: $M = 250$

10 实施例 2

以下的方法用于说明在具体的 pH 和水溶剂组合物条件下酶的活性。

如下进行起始酶的筛选。把酶 (一般为 10 mg)、水性缓冲溶液 (一般为 860 微升 (ul) 或 550 ul)、0.2 M CaCl_2 水溶液 (10 ul)、
15 甲醇 (一般为 90 ul 或 400 ul) 和底物的水溶液 (一般为 90 ul 的丁基-KLG、其常用的浓度为 110,000 ppm) 加入 2 ml 聚丙烯离心管中。把得到的溶液简短地旋转一下并放置在 300 rpm、38°C 下的水浴摇床中 (通常处理 18 小时或者更长的时间)。在温育后, 将样品在 14,000 G's (14,000 倍的重力) 下离心 20 分钟以除去酶、取样 (300
20 ul) 并用蒸馏水稀释到 1 毫升。如果不在当天用 HPLC 进行分析的话, 在分析前冷冻样品。

在下面的表 2 中总结的是在丁基-KLG (BuKLG) 与多种水解酶在水/甲醇溶液中反应时的产物 (以及残留底物) 的 HPLC 数据。这些数据是以 KLG、MeKLG、抗坏血酸 (ASA) 和丁基-KLG 的百万分率报道的。报道值为 0 (零) 表明存在的物质的量低于仪器的检测阈值。在
25 给定的试验中, 标记为“无酶”的样品为对照物。这些对照物含有底物、但却不含酶, 因而可以代表实验和 HPLC 的本底数据。

表 2
针对丁基-KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 41 小时/38% 甲醇 - 水/0.1MES 缓冲溶液)

5	酶	测量的 , KLG pH	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)	
	ESL-001-01	5.8	1180	2352	766	4603
	ESL-001-02	5.6	704	1084	302	7736
	ESL-001-03	5.7	386	527	257	8931
	ESL-001-04	5.8	550	752	833	6229
10	ESL-001-05	5.9	456	684	469	7942
	ESL-001-06	5.6	547	661	129	8896
	ESL-001-07	5.7	311	755	489	6540
	无酶		108	325	33	10177
	无酶 (重复)		107	303	0	9459
	无酶		117	327	42	9878
	无酶 (重复)		103	269	2	8593
15	无酶		116	322	0	9473

表 2 说明由重组生物催化公司提供的水解酶 (ESL-001-01 至
20 ESL-001-07) 显示出在用吗啉代乙磺酸 (MES) 半钠盐缓冲的、将 pH
控制在 5.5 与 6 之间的 38% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化
为抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。这些水解酶为通过商业途径由重组生物
催化公司销售的重组酯酶以及来自嗜热生物体、商品名为 CloneZyme
(商标) 的脂肪酶。

25 实施例 3

下面的表 3 说明多种酰基转移酶、酯酶、脂肪酶和蛋白酶显示出
在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 为 4.8 至 5.8 的 38% 甲醇 - 水溶液中
把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。标明为 ChiroClec
(商标) 的酶为可以通过商业途径从 Altus Biologics 购得的结晶状
30 的交联酶。ChiroClec -CR 为来自皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*)
的脂肪酶, ChiroClec -BL 为枯草蛋白酶 (一种蛋白酶) 的结晶形式,
而 ChiroClec -PC 为来自葱头假单胞菌 (*Pseudomonas Cepacia*) 的

脂肪酶。南极洲假丝酵母 B (*Candida Antartica*) (一种脂肪酶)、猪肝酯酶(一种水解酶)和芽胞杆菌属物种的蛋白酶均显示出特别高水平的活性。

表 3

针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选

(38℃ 处理 16 小时/38% 甲醇 - 水/0.1M MES 缓冲溶液)

酶	测量的 pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
5 猪肝酯酶	5.3	446	4377	294	5711
葱头假单胞菌脂肪酶	5.3	98	295	65	11355
猪胰脂肪酶	5.4	81	316	49	10709
皱褶假丝酵母脂肪酶	5.7	122	197	180	10689
10 α -胰凝乳蛋白酶	4.9	57	152	20	11174
青霉素酰基转移酶	5.6	83	1307	15	12007
黑色曲霉脂肪酶	5.7	302	541	55	12290
无酶	5.1	88	210	5	10393
无酶	5.1	87	199	1	11553
15 南极洲假丝酵母 'A' 脂肪酶	5.4	88	242	37	10670
解脂假丝酵母脂肪酶	5.3	91	92	5	11604
南极洲假丝酵母 'B' 脂肪酶	4.8	2915	6807	0	0
Humicola lanuginosa 脂肪酶	5	63	90	6	10191
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	4.8	2587	5386	9	1251
20 无酶	5.2	94	194	1	11552
ChiroCLEC-CR (干燥的)	5.1	113	222	2	10988
ChiroCLEC-BL (干燥的)	5.4	194	642	3	5123
ChiroCLEC-PC (葱头假单胞菌)	5.7	147	566	1	10471
25 德列马根霉脂肪酶	5.5	51	99	1	7392
雪白根霉脂肪酶	5.1	80	252	17	10453
米根霉脂肪酶	5.5	58	172	5	10873
粘稠色杆菌脂肪酶	5.5	433	187	1	10843
30 白地霉脂肪酶	5	33	407	7	10000
爪哇毛霉脂肪酶	5.5	33	167	97	9950
米曲霉蛋白酶	5.8	289	781	96	7429
Amano-脂肪酶	5.3	56	300	49	9143
35 PS30 (假单胞菌属)	5.6	74	167	93	11372
Amano-脂肪酶 AK (假单胞菌属)					

实施例 4

下面的表 4 说明多种酰基转移酶、酯酶、脂肪酶和蛋白酶显示出在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 为 5 至 5.8 的 38% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。猪肝酯酶、枯草蛋白酶 Carlsberg (一种蛋白酶)、芽胞杆菌属物种的蛋白酶、ChiroClec -BL 与南极洲假丝酵母 B 脂肪酶均显示出特别高水平的活性。

表 4

针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选

(38℃ 处理 47.5 小时/38% 甲醇 - 水/0.1M MES 缓冲溶液)

5	酶	测量的 pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
	猪肝酯酶	5.3	705	2720	246	1368
	葱头假单胞菌脂肪酶	5.5	77	288	46	6222
	猪胰脂肪酶	5.4	229	613	222	10899
10	皱褶假丝酵母脂肪酶	5.8	104	205	155	5417
	α -胰凝乳蛋白酶	5.1	82	248	54	6092
	青霉素酰基转移酶	5.8	100	1607	30	6192
	黑色曲霉脂肪酶	5.3	214	391	29	6470
	米赫毛霉脂肪酶	5.6	54	189	108	7041
15	ChiroCLEC-CR	5.5	115	218	99	3769
	枯草蛋白酶 Carlsberg	5.1	3072	47	0	0
	南极洲假丝酵母 A	5.4	166	316	35	5943
	解脂假丝酵母脂肪酶	5.7	150	166	0	6445
	南极洲假丝酵母 B	5.3	2210	3520	60	0
20	Humicola lanuginosa 脂肪酶	5.2	129	241	42	8017
	芽胞杆菌属物种的蛋白酶	5.3	3722	1940	29	38
	ChiroCLEC-BL 蛋白酶	5	3744	1724	54	634
	ChiroCLEC-PC 脂肪酶	5.7	108	196	5	4148
25	皱褶假丝酵母酯酶	5.6	70	309	61	6734
	L-1 (假单胞菌属)	5.4	90	336	11	7066
	L-2 (南极洲假丝酵母 B)	5.5	2622	3764	14	913
	L-3 (Candida cylindracea)	5.7	88	158	37	10343
	L-5 (南极洲假丝酵母 A)	5.5	153	665	42	4626
30	L-6 (假单胞菌属)	5.7	0	379	13	6183
	L-7 猪胰	5.8	94	884	120	5488
	L-8 (腐质霉属)	5.5	98	219	7	7299
	无酶	5.6	75	234	5	5508
	无酶	5.5	68	209	6	4968
	无酶	5.6	65	277	16	5320

实施例 5

下面的表 5 说明多种脂肪酶和蛋白酶显示出在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 为 5.7 至 6.1 的 38% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。在该表中根据与其它酶进行比较，

5 Prozyme 6（一种来自米曲霉的蛋白酶）、蛋白酶 2A（来自米曲霉）与 GC899（一种来自 Genencor 国际公司的商品洗涤剂蛋白酶）显示出更高水平的活性。

表 5
针对丁基 - KLG 的水解/甲酯分解进行酶的筛选
(38℃处理 19 小时/38%甲醇 - 水/0.1M MES 缓冲溶液)

酶	注释	测量的 pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
PS30 (假单胞菌属)	脂肪酶	5.9	83	213	32	10424
GC4 (白地霉)	脂肪酶	5.7	0	166	0	7475
AK (假单胞菌属)	脂肪酶	6	27	205	26	9815
G (青霉菌)	脂肪酶	5.8	0	0	0	9441
Newlase A (曲霉属)	蛋白酶	5.9	83	299	6	10368
蛋白酶 M (曲霉属)	蛋白酶	6	498	1054	281	6990
Prozyme 6 (曲霉属)	蛋白酶	6	1489	2259	0	4965
MAP10 (毛霉菌属)	脂肪酶	6.1	21	148	145	8968
无酶		5.9	71	169	22	9463
无酶		5.9	75	191	6	9391
无酶		5.9	79	196	7	9539
D (根霉属)	脂肪酶	5.7	44	156	3	8562
Newlase II (根霉属)	蛋白酶	5.9	36	164	12	9586
AY30 (假丝酵母属)	脂肪酶	6	0	192	33	8725
L-10 (假丝酵母属)	脂肪酶	5.7	0	0	0	9608
CES (假单胞菌属)	脂肪酶	5.8	52	296	42	9491
N (根霉属)	脂肪酶	5.8	78	404	27	9834
2A (蛋白酶, 曲霉属)	蛋白酶	6.1	937	1158	215	8951
猪胰脂肪酶		6	58	529	130	11114
脂肪酶 (Sigma-1754)	Fluka	5.8	57	98	47	9845
脂肪酶 (Sigma-1754)	脂肪酶	5.8	46	88	82	9428
脂肪酶 (Sigma-8525)	脂肪酶	5.9	178	222	60	9041
脂肪酶 (Sigma-1754)	脂肪酶	5.7	76	145	89	14257
脂肪酶 (Sigma-3126)	脂肪酶	5.9	90	415	130	12756
F-15 (根霉属)	脂肪酶	5.8	55	165	14	10262
Lipozyme (Novo-液态)	脂肪酶	6	82	122	160	9100
GC899 (蛋白酶)	蛋白酶	5.8	791	2735	312	11607

实施例 6

下面的表 6 说明多种脂肪酶和蛋白酶显示出在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 为 5.3 至 6 的 8.6% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。蛋白酶 M (米曲霉)、Prozyme 6 (一种来自米曲霉的蛋白酶)、蛋白酶 N (枯草蛋白酶) 与蛋白酶 2A (米曲霉) 均显示出特别高水平的活性。

表 6
针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 19 小时/8.6%甲醇 - 水/0.1M MES)

酶	注释	测量的 pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
PS30 (假单胞菌属)	脂肪酶	5.9	341	163	157	8363
GC4 (白地霉)	脂肪酶	5.9	424	0	8	4192
AK (假单胞菌属)	脂肪酶	6	295	432	125	8255
G (青霉菌)	脂肪酶	5.8	253	323	0	7678
Newlase A (曲霉属)	蛋白酶	5.7	692	302	126	13408
R-10 (青霉菌)	脂肪酶	6	527	208	583	5570
蛋白酶 M (曲霉属)	蛋白酶	6	3650	2262	328	1696
Prozyme 6 (曲霉属)	蛋白酶	5.3	7207	694	0	0
MAPI0 (毛霉菌属)	脂肪酶	6	369	0	231	8334
无酶		5.8	378	239	132	8272
无酶		5.8	380	205	19	8582
无酶		5.8	382	295	43	8785
D (根霉菌)	脂肪酶	5.9	595	326	76	11656
Newlase II (根霉菌)	蛋白酶	5.9	323	212	28	8535
AY30 (假丝酵母属)	脂肪酶	5.9	330	249	254	10195
L-10 (假丝酵母属)	脂肪酶	5.8	302	69	55	11057
AP12 (曲霉属)	脂肪酶	6	1448	738	129	7730
CES (假单胞菌属)	脂肪酶	5.9	197	252	0	8092
N (根霉菌)	脂肪酶	6	582	348	61	9598
N (蛋白酶, 芽胞杆菌属)	蛋白酶	5.7	1572	1289	26	1822
2A (蛋白酶, 曲霉属)	蛋白酶	5.7	5891	616	160	764

猪胰脂肪酶	Fluka	5.8	890	791	158	5284
脂肪酶 (Sigma-1754)	脂肪酶	5.9	283	116	148	6196
脂肪酶 (Sigma-1754)	脂肪酶	6	348	189	415	8098
脂肪酶 (Sigma-8525)	脂肪酶	6	326	93	15	4112
脂肪酶 (Sigma-1754)	脂肪酶	6	300	150	154	8057
脂肪酶 (Sigma-3126)	脂肪酶	5.8	787	488	99	8829
F-15 (根霉属)	脂肪酶	5.9	218	124	0	8682
Lipozyme (Novo-液态)	脂肪酶	5.8	380	95	101	7251
GC899(蛋白酶)	蛋白酶	5.6	3354	1765	201	6991

实施例 7

下面的表 7 说明多种酰基转移酶、酯酶、脂肪酶和蛋白酶显示出在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 约为 5 至 6 的 8.6% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。南极洲假丝酵母 B
5 脂肪酶、猪肝酯酶与芽胞杆菌属物种的蛋白酶均显示出特别高水平的活性。

表 7
针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 19 小时/8.6%甲醇 - 水/0.1M MES)

酶	注释	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG
L-1 (假单胞菌属)	脂肪酶	137	116	47	7601
L-2 (南极洲假丝酵母 B)	脂肪酶	5249	1921	0	768
L-3 (Candida cylindracea)	脂肪酶	183	64	107	6920
L-4 (假单胞菌属)	脂肪酶	239	163	88	9957
L-5 (南极洲假丝酵母 A)	脂肪酶	278	344	0	6245
L-6 (假单胞菌属)	脂肪酶	90	219	15	6613
L-7 (猪胰)	脂肪酶	1007	575	106	5392
L-8 (腐质毒属)	脂肪酶	209	70	150	7957
无酶		168	152	6	8753
无酶		152	144	3	8233
无酶		170	137	18	8157
ESL-001-01	重组生物催化公司的酶	1271	906	375	4635
ESL-001-02		883	329	332	5949
ESL-001-03		290	123	447	7333
ESL-001-04		511	161	306	6207
ESL-001-05		364	124	299	6402
ESL-001-06		329	117	118	6934
ESL-001-07		0	122	430	15752
猪肝酯酶		2726	3731	423	10
葱头假单胞菌脂肪酶		241	109	224	9135
猪胰脂肪酶		333	291	314	7888
皱褶假丝酵母脂肪酶		296	86	451	8697
无酶		153	116	8	8234

α -胰凝乳蛋白酶	330	1076	65	3855
青霉素酰基转移酶	187	1248	157	8110
无酶	100	73	3	5296
无酶	144	113	7	8106
黑色曲霉脂肪酶	479	72	84	8455
米赫毛霉脂肪酶	229	278	156	8620
ChiroClEC-CR	233	155	11	7569
枯草蛋白酶	4463	93	0	4428
南极洲假丝酵母 A	215	0	175	7573
解脂假丝酵母脂肪酶	198	62	92	8445
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	4920	642	13	72
ChiroCLEC-BL 蛋白酶	2860	1233	135	4051
ChiroCLEC FC 脂肪酶	127	62	2	5653
皱褶假丝酵母酯酶	178	120	225	9382
蛋白酶				
脂肪酶				
脂肪酶				

实施例 8

- 下面的表 8 说明多种酰基转移酶、酯酶、脂肪酶和蛋白酶显示出在用 MES 缓冲溶液缓冲的、pH 约为 5.8 至 6.2 的 8.6% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。猪肝酯酶、
- 5 南极洲假丝酵母 B 脂肪酶、芽胞杆菌属物种的蛋白酶和轻度交联的结晶状枯草蛋白酶 (ChirClec-BL) 均显示出特别高水平的活性。

表 8
针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 21 小时/8.6%甲醇 - 水/0.2M MES)

酶	注释	pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
猪肝酯酶		5.8	2373	4167	717	83
葱头假单胞菌脂肪酶		5.9	173	169	25	7384
猪胰脂肪酶		5.9	303	320	78	6860
皱褶假丝酵母脂肪酶		5.9	260	112	271	7351
α -胰凝乳蛋白酶		5.9	506	1239	146	4707
青霉菌酰基转移酶		6	176	1172	98	5392
黑色曲霉脂肪酶		5.9	493	259	84	6364
米赫毛霉脂肪酶		5.9	243	283	54	7067
无酶		5.9	198	173	2	7137
无酶		5.9	216	153	0	7115
无酶		5.9	223	154	1	7319
南极洲假丝酵母 'A' 脂肪酶		5.9	222	142	148	6683
解脂假丝酵母脂肪酶		6	721	123	25	6721
南极洲假丝酵母 'B' 脂肪酶		5.9	2708	709	20	28
Humicola lanuginosa 脂肪酶		5.9	176	129	10	7215
芽胞杆菌属物种的蛋白酶		5.8	5553	603	0	33
ChiroCUEC-CR (干燥的)		6.1	229	170	2	7191
ChiroCUEC-BL (干燥的)		5.9	4293	1282	6	1376
ChiroCUEC-PC (葱头假单胞菌 - 干燥的)		6.1	240	268	2	7539

德列马根霉脂肪酶	6	178	0	0	0	7097
雪白根霉脂肪酶	6.2	178	181	61	61	7102
米根霉脂肪酶	6.1	159	119	26	26	7611
粘稠色杆菌脂肪酶	6	415	181	2	2	7275
白地霉脂肪酶	6.1	146	122	6	6	6140
爪哇毛霉脂肪酶	6.2	167	95	141	141	7422
米曲霉蛋白酶	6.1	2193	1462	39	39	2904
皱褶假丝酵母酯酶	5.8	129	132	17	17	7164

实施例 9

下面的表 9 说明对前述实施例中高活性的酶检测其活性的统计再现性。在严格控制 pH 的条件下比较来自上述实施例的 8 种酶，它们均被鉴定为显示出特别高水平的活性。在重新进行分析的过程中，所有以前鉴定的具有高水平活性的酶均保持了高水平的活性。这些酶显示出在用 0.2 M MES 缓冲溶液缓冲的、pH 约为 5.6 至 6 的 8.6% 甲醇 - 水溶液中把丁基 - KLG 明显地转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。在该比较实施例中，南极洲假丝酵母 B 脂肪酶、猪肝酯酶与芽胞杆菌属物种的蛋白酶均显示出特别高水平的活性。猪肝酯酶显示出对酯基转移作用以及明显地转化为抗坏血酸的选择性。

表 9
针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理19小时/8.6%甲醇 - 水/0.2M MES 缓冲溶液)

酶	注释	pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
N 蛋白酶	蛋白酶	6	700	1166	297	5435
南极洲假丝酵母 B	脂肪酶	5.8	4347	2207	283	0
猪肝酯酶	酯酶	5.9	1947	4258	650	0
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	5.6	5137	745	55	0
ChiroClec - BL (干燥的)	枯草蛋白酶	5.8	3485	1235	215	3045
Prozyme-6	蛋白酶	5.8	3405	1518	73	1624
蛋白酶 M	蛋白酶	6	554	668	271	6329
2A 蛋白酶	蛋白酶	5.9	1585	1501	153	3954
无酶	蛋白酶	6	135	149	14	8170
无酶		5.9	136	127	16	8418
无酶		6	142	133	13	8570

实施例 10

下面的表 10 比较了除有机溶剂的浓度更高以外其它与实施例 9 中相同的酶。南极洲假丝酵母 B 和芽胞杆菌属物种的蛋白酶显示出特别高水平的活性，这是因为在用 0.2 M MES 缓冲溶液缓冲的、pH 约为 5.6 至 6.2 的 38% 甲醇-水溶液中它们显示出把丁基-KLG 明显地转

5 转化成抗坏血酸、MeKLG 和 KLG。对猪肝酯酶而言，与实施例 9 所示的结果相比，尽管其活性仍很显著、但却观察到活性有所下降。

表 10
针对丁基 - KLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 19 小时/38%甲醇 - 水/0.2M MES 缓冲溶液)

酶	注释	pH	KLK	MeKLK	ASA	BuKLK (ppm)
N 蛋白酶	蛋白酶	5.9	176	1144	126	8153
南极洲假酵母 B	脂肪酶	5.8	1701	5710	213	199
猪肝酯酶	酯酶	6	203	1654	173	7030
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	5.6	3194	4032	182	213
ChiroClec - BL (干燥的)	蛋白酶	5.8	1261	1693	102	5572
Prozyme-6	蛋白酶	6	350	1268	47	7517
蛋白酶 M	蛋白酶	6.2	141	408	199	9400
2A 蛋白酶	蛋白酶	6.1	178	626	90	8666
无酶	蛋白酶	6	69	221	8	9418
无酶		5.9	61	189	7	8790
无酶		6	63	203	9	9367

实施例 11

下面的表 11 比较了除将 pH 缓冲到大约 5.2 以外其它与实施例 9 中相同的酶。南极洲假丝酵母 B 和猪肝酯酶显示出特别高水平的活性，这是因为在用 0.2 M 吡啶/吡啶 盐酸化物缓冲溶液缓冲的、pH 5 约为 4.9 至 5.3 的 8.6% 甲醇 - 水溶液中它们显示出把丁基 - KLG 明显地转化成 MeKLG 和 KLG。对芽胞杆菌属物种的蛋白酶而言，与实施例 9 相比，尽管其活性仍很显著，但却观察到活性有所下降。

表 11
针对 BUKLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃ 处理约 19 小时/8.6%甲醇-水/0.2M 吡啶/吡啶鎓盐酸化物)

酶	注释	pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG (ppm)
N 蛋白酶	蛋白酶	5.2	87	237	47	8320
南极洲假丝酵母 B	脂肪酶	4.9	3460	3097	53	0
猪肝酯酶	酯酶	5.2	1613	5787	37	390
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	5.1	1613	2473	70	3757
ChiroClec-BL(干燥的)	蛋白酶	5.1	987	1360	67	5603
Prozyme-6	蛋白酶	5.2	700	840	7	6470
蛋白酶 M	蛋白酶	5.3	187	357	0	8387
2A 蛋白酶	蛋白酶	5.2	480	643	0	7523
无酶		5.3	97	0	153	9750
无酶		5.2	73	0	80	9547

实施例 12

下面的表 12 比较了除有机溶剂的浓度更高以外其它与实施例 11 中相同的酶。南极洲假丝酵母 B 显示出特别高水平的活性，这是因为在用 0.2 M 吡啶/吡啶 盐酸化物缓冲溶液缓冲的、pH 约为 4.7 至 5.1 的 38% 甲醇 - 水溶液中它显示出把丁基 - KLG 明显地转化成 MeKLG 和 KLG。与实施例 9 和 11 相比，所有酶均显示出活性有所下降。

表 12
针对 BUKLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃ 处理约 19 小时/H 4.9/38%甲醇-水)

酶	注释	pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG
N 蛋白酶	蛋白酶	4.8	0	0	17	9093
南极洲假丝酵母 B	脂肪酶	4.7	1953	6470	0	5373
猪肝酯酶	酯酶	4.9	47	197	0	11750
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	4.9	333	2113	30	10043
ChiroClec - BL (干燥的)	蛋白酶	4.9	97	447	7	10950
Prozyme-6	蛋白酶	4.9	0	113	3	12730
蛋白酶 M	蛋白酶	5.1	73	203	0	15887
2A 蛋白酶	蛋白酶	5	67	150	0	13920
无酶		4.9	87	13	27	11753

实施例 13

下面的表 13 比较了除将 pH 缓冲到大约 2.3 以外其它与实施例 9 和 11 中相同的酶。对于在用 0.2 M 磷酸盐缓冲溶液缓冲的、pH 约为 2.3-2.7 的 8.6% 甲醇-水溶液中把丁基-KLG 转化成抗坏血酸、
5 MeKLG 和 KLG 而言，与实施例 9 和 11 相比，所有测试的酶均显示出活性有所下降。

表 13
针对 BUKLG 的水解/甲醇分解进行酶的筛选
(38℃ 处理 20 小时/8.6%甲醇-水/pH 2.3 0.2M 磷酸盐缓冲溶液)

酶	注释	pH	KLG	MeKLG	ASA	BuKLG
N 蛋白酶	蛋白酶	2.4	203	0	3	8980
南极洲假丝酵母 B	脂肪酶	2.4	397	323	0	8463
猪肝酯酶	酯酶	2.4	417	93	0	9500
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	2.3	347	0	0	10987
ChiroClec-BL(干燥的)	蛋白酶	2.3	387	0	0	10580
Prozyme-6	蛋白酶	2.4	440	0	0	12357
蛋白酶 M	蛋白酶	2.6	137	333	0	12237
2A 蛋白酶	蛋白酶	2.7	163	347	0	10600
无酶		2.3	487	0	0	10417
无酶		2.3	413	0	0	9897
无酶		2.3	407	0	0	9873

实施例 14

下面的表 14 比较了在将 pH 缓冲到大约 6 时实施例 9 和 11 的前 5 种酶催化 KLG 酯化为甲基 KLG (MeKLG) 的能力或其催化 KLG 的环闭合以生成抗坏血酸的能力。与实施例 9 和 11 相比均观察到低水平的
5 活性。

表 14
针对 KLG 的甲醇分解进行酶的筛选
(38℃处理 19 小时/8.6%甲醇-水/0.2M MES 缓冲溶液)

酶	注释	pH	KLg	MeKLg	ASA	BuKLg
N 蛋白酶	蛋白酶	6	3791	0	0	0
南极洲假丝酵母 B	脂肪酶	6	4258	0	0	0
猪肝酯酶	酯酶	6	4393	0	0	0
芽胞杆菌属物种的蛋白酶	蛋白酶	6	4099	0	0	0
ChiroClec - BL(干燥的)	枯草蛋白酶	6.1	3270	0	0	0
无酶		6	4340	0	0	0
无酶		6	3295	0	0	0
无酶		6	4029	0	0	0

实施例 15

- 下面的表 15 说明了在 pH 为 3-3.2 的 8.6% 甲醇水溶液中使用南极洲假丝酵母 B 脂肪酶作为催化剂由 KLG 生产 MeKLG。选取该缓冲溶液作为 KLG 及其钠盐的混合物（约为 1/9）。前三项包括酶催化剂并且
- 5 且在相同的条件下一式三份。随后的三项也一式三份，并且除没有酶存在之外其它与前三项的条件相同。前三项显示出在有南极洲假丝酵母 B 脂肪酶的情况下 KLG 明显地酯化为 MeKLG。随后的三项说明在没有南极洲假丝酵母 B 脂肪酶的情况下没有进行上述转化。

表 15
针对 KLG 的酯化进行酶的筛选在 38℃ 下处理
68 小时/在水相中含 8.6%的甲醇/缓冲溶液 = KLG+NaKLG

酶	注释	pH	KL	MeKL	ASA	BuKL
南极洲假丝酵母 B	8.6% MeOH+KL	3.1	9227	460	0	0
南极洲假丝酵母 B	8.6% MeOH+KL	3.1	9303	530	0	0
南极洲假丝酵母 B	8.6% MeOH+KL	3.2	9213	413	0	0
无酶	8.6% MeOH+KL	2.9	9530	0	0	0
无酶	8.6% MeOH+KL	2.9	9477	0	0	0
无酶	8.6% MeOH+KL	2.9	9600	0	0	0

实施例 16

本实施例说明在进行 HPLC 分析的条件下抗坏血酸的缓慢分解。通过在水中溶解 KLG、MeKLK、抗坏血酸 (ASA) 和丁基 - KLG 至合适的浓度来制备 HPLC 样品的标准品。把这些标准品样品放入管形瓶中、
5 装满并密封，在室温下储存，并定期进行分析。根据标准品的面积响应来标定 HPLC，其中在标准品制备完毕之后应尽可能快地将其注入 HPLC 中。下面的表 16 显示出 50、100 和 500 ppm 的 KLG、MeKLK、抗坏血酸和丁基 - KLG 标准品在制备样品后的 0 时（标定时间）、在大约 6.5 小时以及在大约 12 小时时记录的响应。

表 16

5	制备的量		发现的量			
	时间 (分钟)		KLG	MeKLG	ASA	BuKLG
	0	50ppm 标准品	51	51.4	53.4	50.6
	400		39.9	47.7	28.3	42.7
	715		52	43	0	38.2
10	0	100 ppm 标准品	102	103	107	101
	400		94.3	106.8	96.6	100.1
	715		81.8	90.2	57.2	94.2
	0	500 ppm 标准品	510	514	534	506
	400		479	496	487	512
	715		493	495	473	499

15

对于其它的标准品、尤其是针对 100 ppm 或者更低浓度的标准品而言，抗坏血酸的响应在整个时间范围内是非线性的。假定在 HPLC 分析之前对实施例 2-16 的处理包括在 38℃ 下、在水浴摇床上处理大约 16 小时或者更长的时间，那么由此可见生成的抗坏血酸的实际水平要高于报道值。

具体地参考本发明优选的具体实例已经对本发明进行了详细的描述，但应当了解的是可以在本发明的精神和范围内实现变化和改

25

进。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: Hubbs, John C.

(ii) 发明名称: 用于制备抗坏血酸、2-酮-L-古洛糖酸
5 及 2-酮-L-古洛糖酸酯的酶促方法

(iii) 序列数: 3

(iv) 通讯地址:

(A) 收信人: Eastman 化学公司

(B) 街道: 邮政信箱 511

10 (C) 城市: Kingsport

(D) 州: 田纳西

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 37662-5075

(v) 计算机可读形式:

15 (A) 存储媒体类型: *

(B) 计算机: *

(C) 操作系统: *

(D) 软件: *

(vi) 目前申请资料:

20 (A) 申请号: *

(B) 申请日: *

(C) 分类: *

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: US 60/017,879

25 (B) 申请日: 1996 年 5 月 17 日

(viii) 律师/代理人资料:

(A) 姓名: Cheryl J. Tubach

(B) 登记号: *

(C) 参考/案件目录号: 70432

30 (ix) 电信资料:

(A) 电话: 423-229-6189

(B) 传真: 423-229-1239

(2) SEQ ID NO:1 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 379 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met
1 5 10 15

Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys Ser Gly Val
35 40 45

Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys Asp Ile Ile Lys Glu Ser Gly Gly Lys
50 55 60

Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala Lys Leu Asp
65 70 75 80

Lys Glu Ala Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val Ala Tyr Val
85 90 95

Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly
100 105 110

Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly
115 120 125

Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His
130 135 140

Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
165 170 175

Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val
180 185 190

Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr
195 200 205

Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
210 215 220

Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
225 230 235 240

Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
245 250 255

Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
260 265 270

Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
275 280 285

Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
290 295 300

Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr
305 310 315 320

Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
325 330 335

Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
340 345 350

Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
355 360 365

Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
370 375

(2) SEQ ID NO:2 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 584 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```

Met Trp Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ala Thr
  1           5           10          15

Trp Ala Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly
  20          25          30

Arg Val Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Phe Thr Gln
  35          40          45

Pro Val Ala Val Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly
  50          55          60

Ser Leu Arg Phe Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val
  65          70          75          80

Lys Asn Thr Thr Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Asp Pro Val Val
  85          90          95

Glu Gln Met Thr Ser Asp Leu Phe Thr Asn Phe Thr Gly Lys Glu Arg
 100          105          110

Leu Thr Leu Glu Phe Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr
 115          120          125

Pro Ala Asp Leu Thr Lys Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile
 130          135          140

His Gly Gly Gly Leu Val Leu Gly Gly Ala Pro Met Tyr Asp Gly Val
 145          150          155          160

Val Leu Ala Ala His Glu Asn Phe Thr Val Val Val Val Ala Ile Gln
 165          170          175

```

Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser
180 185 190

Arg Gly Asn Trp Gly His Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val
195 200 205

Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile
210 215 220

Phe Gly Glu Ser Phe Thr Ala Gly Gly Glu Ser Val Ser Val Leu Val
225 230 235 240

Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His Arg Ala Ile Ser Glu Ser
245 250 255

Gly Val Ala Leu Thr Val Ala Leu Val Arg Lys Asp Met Lys Ala Ala
260 265 270

Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys Lys Thr Thr Thr Ser Ala
275 280 285

Val Phe Thr Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys Ser Glu Asp Glu Leu
290 295 300

Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Leu Thr Leu Asp Phe His Gly
305 310 315 320

Asp Gln Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Pro Thr Val Val Asp Gly Val
325 330 335

Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala Glu Lys Asp Phe Thr
340 345 350

Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln Glu Phe Gly
355 360 365

Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly Lys Leu
370 375 380

Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr Pro Ile Ala
385 390 395 400

Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Phe Thr Asp Lys Tyr
405 410 415

Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu Asp
420 425 430

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
435 440 445

Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln Tyr
450 455 460

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Phe Thr Lys Pro Lys Thr Val Ile
465 470 475 480

Gly Asp His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu
485 490 495

Lys Gly Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met
500 505 510

Lys Phe Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly
515 520 525

Leu Pro His Trp Pro Phe Thr Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu
530 535 540

Gln Ile Gly Val Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu
545 550 555 560

Val Ala Phe Trp Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro
565 570 575

Pro Lys Ile Lys His Ala Glu Leu
580

(2) SEQ ID NO:3 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 342 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3: NO:3:

Met Lys Leu Leu Ser Leu Thr Gly Val Ala Gly Val Leu Ala Thr Cys
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly
 50 55 60

Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe
 85 90 95

Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile
 100 105 110

Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr
 115 120 125

Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro
 130 135 140

Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr
 145 150 155 160

Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala
 165 170 175

Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu
180 185 190

Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr
195 200 205

Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu
210 215 220

Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val
225 230 235 240

Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln
245 250 255

Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln
260 265 270

Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala
275 280 285

Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala
290 295 300

Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro
305 310 315 320

Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys
325 330 335

Ser Gly Ile Val Thr Pro
340