[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02804363.4

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/55
C12N 9/18
C12N 1/21
C12P 13/00
//(C12P13/00,C12R1:010),
(C12P13/00,C12R1:41)

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1233832C

[22] 申请日 2002.1.31 [21] 申请号 02804363.4
[30] 优先权
[32] 2001.1.31 [33] EP [31] 01102214.2
[86] 国际申请 PCT/EP2002/001009 2002.1.31
[87] 国际公布 WO2002/061094 德 2002.8.8
[85] 进入国家阶段日期 2003.7.30
[71] 专利权人 隆萨股份公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 本诺·切尔瑞 乌韦·博恩朔伊尔
安娜·穆西德鲁斯卡
约瑟夫·韦尔朗 托马斯·齐默尔曼
审查员 陈中伟

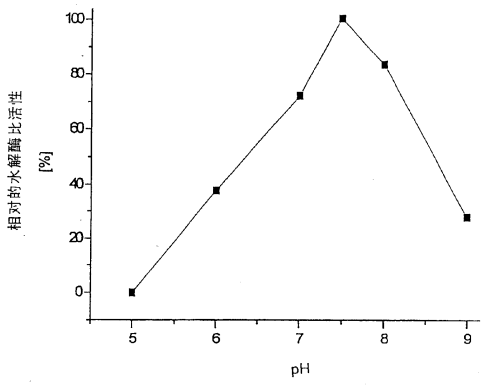
[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 高龙鑫 楼仙英

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 4 页

[54] 发明名称 制造 L-肉毒碱的微生物学方法

[57] 摘要

本发明涉及一种基于通式 I 甜菜碱的酯类制造 L-肉毒碱的方法，式中 R^1 和 R^2 代表氢或连接为一单键，而 R^3 则代表烷基、芳基或芳基烷基，该方法通过水解酶将上述甜菜碱的酯类转化为甜菜碱。然后，如此获得的甜菜碱再通过一种能将式 II 中的甜菜碱转化为 L-肉毒碱的微生物而转化为 L-肉毒碱。本发明还涉及将 4-丁基甜菜碱-甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱的水解酶和含有所述水解酶的微生物。



ISSN1008-4274

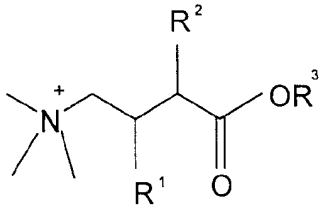
1、由保藏编号为 DSM 2938 的菌株 HK4、保藏编号为 DSM 2903 的菌株 HK13、保藏编号为 DSM 3225 的菌株 HK1331b 或保藏编号为 DSM 3944 的菌株 HK1349 获得，且将作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱的水解酶，其特征在于：

a）等电点 PI 为 4.15±0.30，以及

b）利用 SDS-PAGE 测定的分子量为 22.0±2.0Kda。

2、制造 L-肉毒碱的方法，该方法首先通过可将通式 I 所示的甜菜碱的酯类作为底物转化为甜菜碱的水解酶，或者通过含有该水解酶的微生物，将通式 I 所示的甜菜碱的酯类转化成相应的通式 II 所示的甜菜碱；然后，通过能将通式 II 所示的甜菜碱转化成 L-肉毒碱的微生物将该甜菜碱转化成 L-肉毒碱，

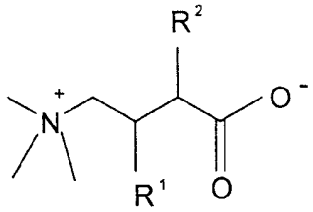
所述的通式 I 甜菜碱的酯类为



I

式中 R^1 和 R^2 表示氢或连接为一单键，而 R^3 为非取代或取代的 C_{1-10} 烷基，非取代或取代的芳基，或者是非取代或取代的芳基烷基，

所述的通式 II 甜菜碱为



II

式中 R^1 和 R^2 表示氢或连接为一单键。

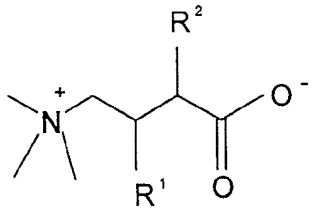
3、根据权利要求 2 所述的方法，其中水解酶是权利要求 1 的水解酶。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其中含有所述水解酶的微生物同时也是用于使所形成的通式 II 甜菜碱转化成 L-肉毒碱的微生物。

5、制造通式 II 甜菜碱的方法，其中，该方法通过使通式 I 所示的

甜菜碱的酯类发生水解的水解酶，或者通过含有该水解酶的微生物，将通式 I 所示的甜菜碱的酯类转化为相应的通式 II 所示的甜菜碱，

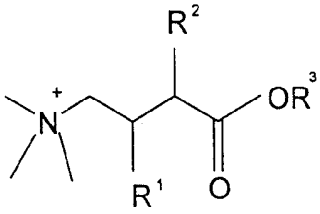
所述的通式 II 甜菜碱为



II

式中 R^1和 R^2表示氢或连接为一单键，以及

所述的通式 I 甜菜碱的酯类为



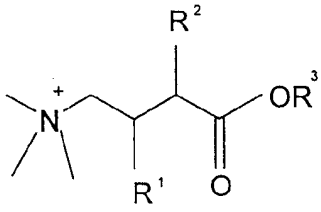
I

式中 R^1和 R^2表示氢或连接为一单键，而 R^3为非取代或取代的 C_{1-10}烷基，非取代或取代的芳基，或者是非取代或取代的芳基烷基。

6、根据权利要求 2 至 5 中任意一项所述的方法，其中通式 I 所示的甜菜碱的酯类在反应混合物中的重量体积比浓度保持在 10%以下。

7、根据权利要求 2 至 6 任意一项所述的方法，其中 PH 值在 6-8 的范围内，而温度在 15-50℃的范围内。

8、根据权利要求 2 至 7 任意一项所述的方法，其中采用了通式 I 所示的甜菜碱的酯类



I

式中 R^1和 R^2表示氢或连接为一单键，而 R^3则表示甲基。

9、水解酶在制造 L-肉毒碱的方法中用于将 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱。

10、含有可将 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱的水解酶的微生物在制造可进一步用于制造 L-肉毒碱的甜菜碱中的应用。

制造 L-肉毒碱的微生物学方法

技术领域

本发明涉及从甜菜碱的酯类制造 L-肉毒碱的方法。本发明还涉及将甜菜碱的酯类转化为相应的甜菜碱的水解酶，以及含有所述水解酶的重组微生物。

背景技术

L-肉毒碱是一种天然的、类似维生素的物质，它参与穿过线粒体膜运送脂肪酸的活动，因此能裂解脂肪酸。L-肉毒碱的用途是作为食品辅助剂。L-肉毒碱可以补偿体内自身的 L-肉毒碱的严重不足，例如在大负荷的运动量时。对婴儿来说，用 L-肉毒碱补充营养也是必要的。

人们已经知道采用许多生物技术方法来制造 L-肉毒碱。

EP-A-0 158 194 曾经描述过一种从 4-丁基甜菜碱（4-butyrobetaine）出发，利用微生物制造 L-肉毒碱的方法，该微生物可从 4-丁基甜菜碱和/或巴豆甜菜碱出发来生产 L-肉毒碱，而不使后者分解代谢。

WO-A-95/10613 也描述过一种利用微生物从 4-丁基甜菜碱和/或巴豆甜菜碱出发制造 L-肉毒碱的方法，该微生物是由一种 DNA 片段转化得到的，所述片段中含有一个或多个在丁基甜菜碱/巴豆甜菜碱的新陈代谢中为 L-肉毒碱生物合成的酶编码的基因 *bco*C、*bco*A/B 和 *bco*D。

这两种方法都是有缺点的，那就是采用的起始原料 4-丁基甜菜碱和巴豆甜菜碱是很难获得的，因此这是合成 L-肉毒碱时费用昂贵的一个主要因素。于是 EP-B-0 360 222 描述了一种从 4-丁内酯（4-butyrolactone）出发制备 4-丁基甜菜碱的化学方法，其中 4-丁内酯首先利用 HCl 转化成 4-氯丁基甜菜碱（4-chlorobutyrobetaine），然后再用乙醇和三甲胺转化为 4-丁基甜菜碱-乙基酯。接下来，后者通过稀释的 NaOH 水解为 4-丁基甜菜碱，并利用电渗析法从未转化的 4-丁基甜菜碱-乙基酯分离出 4-丁基甜菜碱。

发明内容

本发明的目的就是提供一种制造 L-肉毒碱的方法，该方法中不必用甜菜碱作为原料。

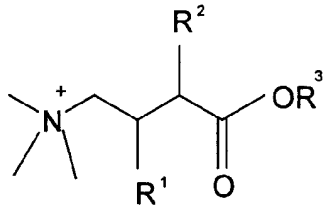
上述目的是用生物技术方法来解决的，其中所需要的 L-肉毒碱从甜菜

碱的酯类出发而制造。这是因为意外地发现了一种水解酶，此酶能将甜菜碱的酯类作为底物（substrate）加以利用，并将其水解为相应的甜菜碱，然后就可进一步转化为L-肉毒碱。

本发明涉及一种制造L-肉毒碱的生物技术方法，该方法首先利用一种水解酶，或者利用一种含有此类水解酶的微生物将通式 I 甜菜碱的酯类转化为通式II的甜菜碱；

其中，所述的水解酶可将作为底物的通式 I 甜菜碱的酯类转化为相应的甜菜碱；

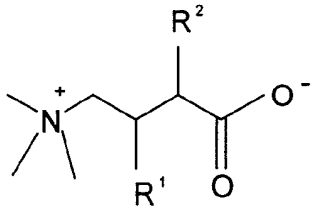
所述的通式I甜菜碱的酯类为：



I

其中R^1和R^2表示氢或连接成一单键，而R^3是未取代或取代的C_{1-10}烷基、未取代或取代的芳基，或是未取代或取代的芳基烷基，并且

所述的通式II甜菜碱为



II

式中R^1和R^2的含义与上相同；

经过转化后，再利用一种能将通式II的甜菜碱转化为L-肉毒碱的微生物的作用，将通式II的甜菜碱转变成L-肉毒碱。

这里和下面所说的C_{1-10}烷基，指的乃是直链和支链的烷基基团。C_{1-10}烷基的实例有甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、特丁基、戊基及其异构体、己基及其异构体、庚基及其异构体、辛基及其异构体、壬基及其异构体以及癸基及其异构体。优选的是C_{1-6}烷基，特别优选的是C_{1-4}烷基。烷基基团不发生取代，或被一个或多个羟基基团和/或卤原子取代。所谓卤素在这里和下文指的是氟、氯、溴、碘。具有其中R^3为非取代的C_{1-10}烷基的通式I甜菜碱的酯类，例子有4-丁基甜菜碱甲基酯、

4-丁基甜菜碱乙基酯、4-丁基甜菜碱丙基酯、4-丁基甜菜碱异丙基酯、4-丁基甜菜碱丁基酯、4-丁基甜菜碱特丁基酯和4-丁基甜菜碱异丁基酯、巴豆甜菜碱甲基酯、巴豆甜菜碱乙基酯、巴豆甜菜碱丙基酯、巴豆甜菜碱异丙基酯、巴豆甜菜碱丁基酯、巴豆甜菜碱特丁基酯和巴豆甜菜碱异丁基酯。具有其中 R^3 为取代的 C_{1-10} 烷基的通式 I 甜菜碱的酯类，例子有4-丁基甜菜碱 2-羟乙基酯、4-丁基甜菜碱 3-羟丙基酯、4-丁基甜菜碱 2，3-二羟丙基酯、4-丁基甜菜碱 2-氟乙基酯、巴豆甜菜碱 2-羟乙基酯、巴豆甜菜碱 3-羟丙基酯、巴豆甜菜碱 2，3-二羟丙基酯和巴豆甜菜碱 2-氯乙基酯。

所谓芳基在这里和下文中特别指的是单环或双环的芳香族基团，例如苯基、1-萘基或 2-萘基，它们可为非取代的，也可为取代的，例如被一个或多个硝基和/或卤原子所取代。具有其中 R^3 是非取代的或是取代的芳基的通式 I 甜菜碱的酯类，例子有：4-丁基甜菜碱苯基酯、4-丁基甜菜碱 4-硝基苯基酯、4-丁基甜菜碱 4-氯苯基酯、4-丁基甜菜碱 1-萘基酯、巴豆甜菜碱苯基酯、巴豆甜菜碱 4-硝基苯基酯、巴豆甜菜碱 4-氯苯基酯和巴豆甜菜碱 1-萘基酯。

所谓芳烷基在这里和下文中相应地是指用芳基取代的 C_{1-10} 烷基基团，尤其是 C_{1-6} 烷基基团，优选的则是 C_{1-4} 烷基残基，其中芳基仍具有上述意义，可为非取代的或者是取代的。优选的芳基烷基是苄基，其为未取代的，或在苯环上发生取代，例如用一个或多个硝基和/或卤原子进行取代。具有其中 R^3 为芳基烷基的通式 I 甜菜碱的酯类，例子有：4-丁基甜菜碱苄基酯、4-丁基甜菜碱 4-硝基苄基酯、4-丁基甜菜碱 4-氯苄基酯、巴豆甜菜碱苄基酯、巴豆甜菜碱 4-硝基苄基酯和巴豆甜菜碱 4-氯苄基酯。

优选采用的且包含在通式 I 之内的甜菜碱的酯类，有 4-丁基甜菜碱甲基酯、巴豆甜菜碱甲基酯、4-丁基甜菜碱乙基酯、巴豆甜菜碱乙基酯、4-丁基甜菜碱丙基酯、巴豆甜菜碱丙基酯、4-丁基甜菜碱 2，3-二羟基丙基酯、巴豆甜菜碱 2，3-二羟基丙基酯、4-丁基甜菜碱苯基酯、巴豆甜菜碱苯基酯、4-丁基甜菜碱苄基酯和巴豆甜菜碱苄基酯。特别优选的则是4-丁基甜菜碱甲基酯、巴豆甜菜碱甲基酯、4-丁基甜菜碱乙基酯、巴豆甜菜碱乙基酯、4-丁基甜菜碱 2，3-羟基丙基酯和巴豆甜菜碱 2，3-二羟

基丙基酯。最优选的是 4-丁基甜菜碱甲基酯和巴豆甜菜碱甲基酯。

在农杆菌（Agrobacferium）/根瘤菌（Rhizobium）属的微生物中意外地发现了一类水解酶，此类水解酶能将通式 I 甜菜碱的酯类，尤其是 4-丁基甜菜碱甲基酯和/或巴豆甜菜碱甲基酯作为底物转化为相应的甜菜碱，这在 EP-A-0158 194 和 WO-A-95/10613 中已经描述过了。新型能转变甜菜碱的酯类的水解酶未见报道，所以这也是本发明的目的。

根据本发明，例如从农杆菌/根瘤菌属的微生物中获得的水解酶，能够将作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱。它们的特征在于，等电点（PI，isoelekfrischen Pundt）为 4.15±0.30；以 SDS-PAGE 测定的分子量为 22.0±2.0Kda。

此类水解酶同分子量为 33Kda 的第二种水解酶一起共同存在于农杆菌/根瘤菌属的微生物中，但第二种水解酶不能转变甜菜碱。通过本领域技术人员熟知的方法，该类新的水解酶可从这些微生物中筛选出来并与 33KDa 的水解酶分离。

按照本发明的水解酶，除了转化 4-丁基甜菜碱甲基酯以外，往往还能转化其他属于通式 I 甜菜碱的酯类，例如将作为底物的巴豆甜菜碱甲基酯转化为相应的甜菜碱。

按照本发明的水解酶，是优选从农杆菌/根瘤菌属的微生物中获得的，特别是从农杆菌/根瘤菌的菌株 HK4（DSM2938）、HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）和 HK1349（DSM3944）。HK4（DSM2938）、HK13（DSM2903）和 HK1331b（DSM3225）菌株在 EP-A-0158 194 中已有描述。菌株 HK1349（DSM3944）也在 EP-B-0 543 344 中有所描述。菌株 HK4（DSM2938）为野生型，其他菌株则为 *bco*E 基因的突变体，而且 L-肉毒碱脱氢酶（dehydrogenas）属阴性。菌株 HK4（DSM2938）、HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）和 HK1349（DSM3944）不仅与农杆菌属的典型代表菌高度相似，而且也和根瘤菌属的典型代表菌高度相似，但却都不能清楚地划归于这些属内。因此所谓农杆菌/根瘤菌属的微生物指的是农杆菌属的微生物、根瘤菌属的微生物以及菌株 HK4（DSM2938）、HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）和 HK1349（DSM3944）。

根据布达佩斯条约将菌株 HK4（DSM2938）于 1984 年 4 月 3 日、菌株

HK13（DSM2903）于1984年2月23日、菌株HK1331b（DSM3225）于1985年2月8日，而菌株HK1349（DSM3944）于1991年11月1日在德国国营微生物细胞培养收集中心（Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）进行保藏，地址：Mascheroder Weg 1b，D-38124 Braunschweig，Germany。微生物HK1349（DSM3944）的保藏期按照延期请求保证到2031年11月1日。

其次，我们意外地发现，已知的水解酶，例如某些脂肪酶、酯酶和蛋白酶能将属于通式Ⅰ甜菜碱的酯类，特别是4-丁基甜菜碱甲基酯和/或巴豆甜菜碱甲基酯作为底物转化为相应的甜菜碱。本发明的方法中也能采用这些水解酶。

将4-丁基甜菜碱甲基酯转化为4-丁基甜菜碱的已知的水解酶的例子是酯酶、脂肪酶和蛋白酶，尤其是马肝酯酶（例如获自Roche氏诊断或Fluka）、猪肝酯酶（例如获自Roche氏诊断或Fluka）、ChirazymL2酯酶（例如获自Roche氏诊断或Fluka）、来自热链形芽孢杆菌（*Bacillus thermocatenulatus*）的脂肪酶（例如获自Roche氏诊断或Fluka）、来自南极念珠菌（*Candida antartica*）的脂肪酶（例如获自Roche诊断或Fluka）、枯草杆菌素（Subtilisin）A60蛋白酶（例如由Novo Nordisk获得）、来自萤光假单孢菌（*Pseudomonas fluorescens*）的PFEⅡ酯酶（DSM50106，Knalameyzer 等人：《应用环境微生物学》，1999，65，477-482）、来自萤光假单孢菌的PFEI 酯酶（Bornscheuer 等人：《生物工程杂志》，1998，60，105-111）以及来自淀粉酶产色链酶菌（*Streptomyces diastatochromogenes*）的SDE酯酶（例如由Julich精细化学制品公司获得，Bornscheuer等人：《生物工程通讯集》，1999，21，101-104，Tesch等人：《细菌学杂志》，1996，178，1858-1865）。

特别优选采用的水解酶是按照本发明的来自农杆菌/根瘤菌的新水解酶，来自热链形芽孢杆菌的脂肪菌，来自萤光假单孢菌的PFEⅡ酯酶（DSM50106）以及来自淀粉酶产色链酶菌的SDE酯酶。

通过水解酶形成的通式Ⅱ甜菜碱通过能够将其转化为L-肉毒碱的微生物进行转化。这种微生物已经在技术背景中提到过了。

适合微生物的例子为已经提及的农杆菌/根瘤菌属的微生物，特别是

菌株 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）以及含有质粒 PVK100q 的 HK1349（DSM8726）乃至假单孢菌属（*pseudomons*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）或埃希氏杆菌（*Escherichia*）属的微生物。有利的微生物是那些不使形成的肉毒碱发生分解代谢的菌株，尤其是肉毒碱-脱氢酶（dehydrogenase）为阴性者。

将甜菜碱的酯类转化为甜菜碱不仅需要使用游离的水解酶，而且最好是利用含有和表达上述水解酶的微生物。该类微生物可为天然产生的微生物，其中为水解酶编码的基因就是基因组的天然成分，也可以是通过为此类水解酶编码的 DNA 转化得到的重组微生物。

如果用一种含有水解酶的微生物对甜菜碱的酯类进行转化，而这种微生物同时又能将产生的甜菜碱转化为 L-肉毒碱，则这种微生物是很有益的。如此一来，含有水解酶的微生物是同时也将产生的甜菜碱转化为 L-肉毒碱的微生物。从而，从预定的通式 I 甜菜碱的酯类出发，用单一的微生物就能实现本发明的方法。有利的微生物还是那些使形成的肉毒碱不产生分解代谢的微生物，特别是肉毒碱-脱氢酶显阴性的菌株。

若甜菜碱的酯类的转化只是朝向甜菜碱一面，则微生物不能利用形成的甜菜碱而转变成肉毒碱也是有利的。

为水解酶编码的基因天然存在于其基因组中的微生物，其实例有农杆菌/根瘤菌、芽孢杆菌、假单孢菌（*Pseudomonas*）或链酶菌属（*Streptomyces*）。优选的微生物是农杆菌/根瘤菌属的微生物，尤其是菌株 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）或包括质粒 PVK100q 的 HK1349（DSM8726）和热链形芽孢杆菌（*Bacillus thermocatenulatus*）、萤光假单孢菌（*Pseudomonas flworescens*）或淀粉酶产色链酶菌（*Srteptomyces diastatochsowogenes*）菌株。

为生产重组微生物，可根据标准方法将编码上述本发明和已知水解酶的基因进行克隆。为此，该基因可先以一般方式分离，例如通过测定需要的水解酶中 N 末端的氨基酸序列，并且利用这些以 N 末端的氨基酸序列导出的 DNA-探针，使水解酶基因从相应的微生物的基因库中分离出来。然后，利用一般重组的含有分离基因的 DNA，优选线型的或环状的载体 DNA 转化适宜的宿主生物。这样获得的重组微生物可将水解酶基因按

照同源（homologous）重组而整合于基因组之中，或可作为使用染色体外成分而携带之。

转化优选使用的是自主复制的载体，例如表达载体，其含有在调节序列控制下为水解酶编码的序列，也就是说例如启动子，它位于水解酶基因的上游（upstream），且位于一个核糖体的连接点。启动子和核糖体连接点的选择，在于在常见的宿主中它们能起作用，可以表达基因。这样一个基因的表达按启动子的选择就能达到组成性或诱导性。照一般的方式，这些载体也携带一个选择性的标志基因（Marker-Gen），以证明实现转化后有载体存在于宿主体之中。在一种特定的实施形式中，表达载体能附带含有丁基甜菜碱/巴豆甜菜碱新陈代谢的基因，这在WO-A-95/10613中已有描述。此外，这种基因的转录可以通过自身启动子控制或其他适宜的启动子控制，自身启动子也能控制水解酶基因的转录。

适宜的启动子的例子有入噬菌体（Phagen Lambda）的P_L和P_R启动子（Schauter等人：《基因》，1987，52，279-283），P*trc*启动子（Amann等人：《基因》，1988，69，301-315），P_{Nm}和P_{St}启动子（Labes等人：《基因》，1990，89，37-46），P_{trp}启动子（Amann等人：《基因》，1983，25，167-178），P_{lac}启动子（Amann等人：《基因》，1983，25，167-178）以及P_{tac}启动子（Russel和Bennet：《基因》，1982，20，231-243）和Rhamnose启动子（Volss等人：《分子微生物学》，1996，21（5），1037-1047）。

作为大肠杆菌(*Escherichia Coli*)的特异表达载体的例子有：pBR322（Bolivar等人：《基因》，1977，2（2），95-113）、pBLUESCRIPT-KS+®和pBLUESCRIPT-SK+®（Stratagene）、pUC18和pUC19（yannisch-Perron等人，《基因》，1985，33，103-119）、pK18和pK19（Pridmore：《基因》，1987，56，309-312）、pRK290X（Alvarez-Morales等人：《核酸研究》，14，4207-4227）和pRA95（例如来自Nycomed Pharma AS，Huidove，丹麦）和这些载体的衍生物，它们具有此类启动子、这样的核糖体的连接点和此类复制源点。

宿主类别特异性表达载体的例子，有对革兰氏阴性宿主生物特异的所谓“广谱宿主范围”载体，例如质粒pRK290（Ditta等人：《PNAS》，

1980，77，7347-7351）、pKT240（Bagdasarian 等人：《基因》，1983，26，273-282）、pGSS33（sharpe 等人：《基因》，1984，29，93-102）、pVK100（Knaus 和 Nester：《质粒》，1982，8，45-54）、pME285（Haas 和 ItohL：《基因》，1985，36，27-36）和这些载体的衍生物，它们具有启动子，核糖体连接点和复制源点。

适宜作宿主的微生物，能被编码需要的水解酶的 DNA 所转化，并且转化后能表达这种水解酶，于是使甜菜碱的酯类水解为甜菜碱。

优选的宿主是能从丁基甜菜碱和/或巴豆甜菜碱生产 L-肉毒碱的微生物。适宜的微生物有，如天然基因组中就携带参与丁基甜菜碱/巴豆甜菜碱新陈代谢用的基因。其中特别优选使形成的肉毒碱不分解代谢的宿主。它涉及到肉毒碱-脱氢酶呈阴性的那些菌株，例如不含 *bco*-基因或不含有完整 *bco*-基因的菌株。

适宜的宿主的例子有：农杆菌/根瘤菌、假单孢菌（Lindtstedt 等人：《细菌学杂志》，1970，101（3），1094-5）、无色杆菌（Naidu 等人：《J. Ind. Mircrodoiol. Biotechnol》，2001，26（5），309-315）或埃希氏杆菌属（Jung 等人：《高级生物化学》，英国/生物技术，1993，50，21-44）。这类特别优选的宿主是农杆菌/根瘤菌属的微生物，尤其是菌株 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944 或包含质粒 PVK100q 的 HK1349（DSM8726）。

一种重组微生物，其利用为本发明的水解酶编码的 DNA 进行转化，该水解酶将作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱。这种重组微生物在现有技术中尚无人知道，因此这也是本发明的目的所在。

一种重组微生物，其利用编码水解酶的 DNA 进行转化，该水解酶将作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱，所述的重组微生物能从 4-丁基甜菜碱的酯类生产 L-肉毒碱，而不使 L-肉毒碱发生分解代谢。该类微生物在现有技术中也是人所不清楚的，所以也是本发明的目的。

本发明突出的微生物是农杆菌/根瘤菌属的微生物，特别是农杆菌/根瘤菌菌株 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）或含有质粒 PVK100q 的 HK1349（DSM8726）以及假单孢菌属、无色杆菌

属或埃希氏杆菌属的菌株，它们都是用编码一种水解酶的 DNA 进行转化，并将 4-丁基甜菜碱-甲基酯水解成 4-丁基甜菜碱。特别地，被编码的水解酶乃是本发明的一种水解酶。

含有一种水解酶，使作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱，而且能够用于本发明的方法的优选微生物是：

a）农杆菌/根瘤菌属的微生物，优选的菌株为 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）或含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726），以及芽孢杆菌、假单孢菌或链霉菌等属的微生物，尤其是热链形芽孢杆菌、萤光假单孢菌或淀粉酶产色链霉菌等种类。

b)农杆菌/根瘤菌属的重组微生物，优选的菌株为 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）或含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726），以及假单孢杆菌、无色杆菌或埃希氏杆菌属的微生物，它们用为本发明的水解酶编码的 DNA 进行转化，使作为底物的 4-丁基甜菜碱-甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱。

c）农杆菌/根瘤菌属的重组微生物，优选的菌株有 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）或含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726），以及芽孢杆菌属，假单孢菌属或链霉菌属的微生物，特别是热链形芽孢杆菌、萤光假单孢菌或淀粉酶产色链霉菌，它们利用为一个已知的脂肪酶、酯酶或蛋白酶编码的 DNA 进行转化，使作为底物的 4-丁基甜菜碱甲基酯转化成 4-丁基甜菜碱，特别是来自热链形芽孢杆菌的脂肪酶，来自萤光假单孢菌（DSM50106）的 PFE II 的酯酶以及来自淀粉酶产色链霉菌的 SDE 酯酶。

微生物的培育可以在一种培养基中进行，该培养基必需含有适合的诱导剂以诱导丁基甜菜碱/巴豆甜菜碱新陈代谢的酶。通式 I 甜菜碱的酯类也可添加于培养基中以诱导水解酶。

微生物宿主可以是下列之一，例如农杆菌/根瘤菌菌株 HK13（DSM2903）、HK1331b（DSM3225）、HK1349（DSM3944）和含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726），在预先备好的“营养性酵母肉汤”（“Nutrient Yeast broth”）培养基中进行预培育，将 L-肉毒碱作为 4-丁基甜菜碱/L-肉毒碱新陈代谢的酶的诱导剂添加进去，然后再在含有甜菜碱，甘油

和 L-谷氨酸盐作为碳源的基本培养基中，继续培育。

本发明的方法优选这样实行：将通式 I 甜菜碱的酯类导入反应混合物内，使反应混合物中的这种甜菜碱的酯类的浓度保持在 10%（重量/体积）以下。

本发明两种优选的方法是在 PH 值位于 6-8 的范围内，温度位于 15-50℃的范围内，如在 25-35℃时进行的。

利用通式 I 的一个甜菜碱的酯按照本发明来制造 L-肉毒碱时，既可以用生长中的微生物，也可以用静止的微生物完成。优选本发明的方法是这样进行的：在制造 L-肉毒碱时可用晚期对数生长期的微生物，也可以用静止的微生物。获得的 L-肉毒碱按照标准方法进行加工。

按照本发明利用水解酶使 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱，在制造 L-肉毒碱的方法中，既可应用本发明的水解酶，也可应用具有这种性质的已知水解酶。优选的是应用本发明的水解酶以及已知的脂肪酶、酯酶和蛋白酶，使 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱，例如来自热链形芽孢杆菌的脂肪酶，来自萤光假单孢菌（DSM50106）的 PFE II 酯酶以及来自淀粉酶产色链霉菌的酯酶 SDE。

本发明使用的微生物，均含有一种水解酶，在制造 L-肉毒碱的方法中，使 4-丁基甜菜碱甲基酯转化为 4-丁基甜菜碱，所述方法既涉及应用天然产生的微生物，又涉及应用重组的微生物。

附图说明

图 1 是相对的水解酶比活性与 pH 的关系图，利用醋酸 4-硝基苯基酯析定法测定该比活性，水解酶来自 HK1349（DSM3944），50mM 的磷酸钠缓冲溶液，温度 25℃。

图 2 是相对的水解酶比活性与培育温度的关系图，利用醋酸 4-硝基苯基酯析定法测定该比活性，水解酶来自 HK1349（DSM3944），经 16 小时温育，温度 5-70℃，50mM 磷酸钠缓冲溶液，PH 值为 7.5。

图 3 是由 HK1349（DSM3944）获得的水解酶的 SDS PAGE 凝胶分析，分子量为 22Kda（B 和 C 组分）和 33Kda（A 组分）。析测通过活性染色和考马斯亮蓝染色（coomassie-Blue plus）进行。

图 4 是由 22Kda 水解酶（C 组分）和 33Kda 水解酶（A 组分），利用 phastsystems（Amershani phasmacia）测定的等电点（PI）。析测通过活

性染色和考马斯亮蓝（coomassie-Blue）染色。

具体实施方式

以下结合附图对本发明展开进一步的说明。所采用的试剂和分析方法如下所列：

培养基

微量元素溶液

乙二胺四醋酸（EDTA）	500mg/L
$FeSO_4 \times 7H_2O$	200mg/L
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	10mg/L
$MgCl_2 \times 4H_2O$	3mg/L
H_3BO_3	30mg/L
$CaCl_2 \times 6H_2O$	20mg/L
$CuCl_2 \times 2H_2O$	1mg/L
$NiCl_2 \times 2H_2O$	2mg/L
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	3mg/L

该溶液在121℃和1bar超压下高温蒸汽灭菌30分钟。

维生素溶液

盐酸维生素 B_6	10μg/L
维生素 B_2	5μg/L
尼克酰胺（Nicotinamide）	5μg/L
盐酸维生素 B_1	5μg/L
生物素（Biotin）	2μg/L
D-泛酸钙盐	5μg/L
4-氨基苯甲酸	5μg/L
叶酸	2μg/L
维生素 B_{12}	5μg/L

该溶液过滤消毒。

溶液B

$MgCl_2 \times 6H_2O$	16g
$CaCl_2 \times 2H_2O$	580mg
$FeCl_3 \times 6H_2O$	32mg

将上述成分溶于蒸馏水（1L）中。该溶液用浓盐酸（2~3 滴）混合，然后在 121℃和 1bar 超压下高温蒸汽灭菌 30 分钟。

（A+N）溶液

$(NH_4)_2SO_4$	20g
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	25g
KH_2PO_4	10g
NaCl	30g

将各成分溶于蒸馏水（1L）中。溶液在 121℃和 1bar 的超压下高温蒸汽灭菌 30 分钟。

基本培养基

微量元素溶液	0.5mL
溶液 B	12.5mL

将各成分用 450mL 的蒸馏水填满，如果需要的话添加入一种或多种碳一源，而 PH 值则用 NaOH 调整至 7.0。该溶液在 121℃和 1bar 超压下高温灭菌 30 分钟，冷却至 45℃，并且同下列溶液混合：

（A+N）溶液	50.0mL
维生素溶液	0.5mL。

基本培养基琼脂平板

微量元素溶液	0.5mL
溶液 B	12.5mL

将各成份用蒸馏水（450mL）添满，加入琼脂（7.5 克），如果需要，可加入一种或多种碳源，PH 值用 NaOH 调至 7.0。溶液在 121℃和 1bar 超压下高温蒸汽灭菌 30 分钟，冷却至 45℃，并同下列溶液相混合：

（A+N）溶液（45℃）	50.0 mL
维生素溶液	0.5 mL。

将还热的（45℃）的溶液注入培养皿（Petrischale）（20-25 mL 溶液/每台培养皿）内。

分析

采用HPLC测定丁基甜菜碱甲基酯(BBMe)、丁基甜菜碱乙基酯(BBEt)、丁基甜菜碱和L-肉毒碱时要具备下列条件：HPLC：水LC-Module I Plus；柱：Hamilton PRP-X200 250×4.1mm；流速：1.3mL/min；析测：电导率。丁基甜菜碱和L-肉毒碱用5mM $HCLO_4$在乙腈：水=1：24（v/v）中洗脱。丁基甜菜碱（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）用5mM $HCLO_4$在乙腈：水=1：4（v/v）中洗脱。

利用膜层析分离法测定丁基甜菜碱甲基酯(BBMEe)和丁基甜菜碱时，需要具备下列条件：纤维素平板；流动相：丁醇：醋酸：水=8:4:2(v/v/v)；析测：碘蒸汽。

测定水解酶活性时需在光度上采用醋酸4-硝基苯基酯析定法。此法系将蛋白质溶液（900μL）用一个醋酸4-硝基苯基酯（二甲基亚砜中浓度为10mM；100μL)溶液在25℃下混合。当水解酶形成的4-硝基苯酚（$\varepsilon=15\times10^3\times M^{-1}cm^{-1}$）的吸收值在410nm进行测量。1单位（U）相当于每分钟释放的4-硝基苯酚的量（μmol）。采用的蛋白质溶液的蛋白质含量按厂商指导利用二甘氨酸（BCA，Bicin choninic Acid）蛋白质检测试剂盒（Pierce）进行测定。水解酶的比活性按U/mg蛋白质估定，而且相当于每分钟释放出的mg蛋白质的4-硝基苯酚（μmol）的量。

测定水解酶的分子量是利用二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）完成的（缓冲液:Tris(0.025M)，甘氨酸（0.192M）、二烷基硫酸钠(0.1%(w/v)；PH8.4，堆积凝胶：10mA，分离凝胶：25mA）。析测时采用考马斯亮蓝染色法和活性染色法。活性染色的步骤如下：凝胶在复性溶液（Renaturierungslosung）（Triton×(0.5%（W/V））中，在Tris×HCl缓冲液（0.1M；PH7.5）内于250℃下温育30分钟。另外，将醋酸1-萘酯溶液（10mL）和速红（Fast Red）溶液（10mL）倾入。水解酶染色后大约30分钟呈现红棕色。醋酸1-萘酯溶液的制法如下：将醋酸1-萘酯(4mg)溶解在丙酮(1.0mL)中，并用Tris×HCl缓冲液(0.1M；PH7.5）填满至10mL。速红溶液的制法如下：将速红（10mg）溶解在Tris×HCl缓冲液（0.1M；PH7.5；10mL）内。

实施例 1

在含有丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和三丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）分别作为唯一碳源的培养基中，HK4（DSM2938）菌株的生长反应

将 HK4（DSM2938）菌株放在基本培养基琼脂平板上，添加 0.4%（w/v）甜菜碱作为唯一的碳源，单菌落划线接种后，在 30℃下培育 48-72 小时。为了培养琼脂平板上获得的菌株的单个菌落，在含有丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）分别作为唯一碳源的基本培养基中进行接种，并在 30℃和 140upm 下培育 48-96 小时。

对照试验中的 HK4（DSM2938）菌株在同样条件下培育，但是加的是丁基甜菜碱，而不是丁基甜菜碱的酯类作为唯一的碳源。

表 1

	1.0% (w/v) BBMe	0.2% (w/v) BBEt	1.0% (w/v) BBEt	1.0% (w/v) 丁基甜菜碱
菌株	生长[OD_{650}]			
HK4	0.76			
HK4		0.23		
HK4			0.76	
HK4				7.0

HK4（DSM2938）菌株在含有丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）分别作为唯一碳源的基本培养基中生长。然而 HK4（DSM2938）菌株在以丁基甜菜碱的酯类作为唯一碳源时的生长，用以丁基甜菜碱作为唯一碳源的生长相比，显然要小很多。

实施例 2

利用 HK13（DSM2903）和 HK1349（DSM3944）菌株将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）转化为丁基甜菜碱和 L-肉毒碱，时间：74 小时

将 HK13（DSM2903）和 HK1349（DSM3944）菌株接种在各自的营养性

酵母肉汤（Nutrient yeast broth）的预培养基（10mL）中，加入L-肉毒碱(0.05%(w/v))作为L-肉毒碱新陈代谢的诱导剂，并在30℃和140upm下培育2天。预培养（0.01mL）是在基本培养基（10mL）中进行的，它另含有0.02%（w/v）甜菜碱，0.05%（v/v）的甘油，0.50%（w/v）的L-谷氨酸盐或者0.75%（w/v）的丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）或0.75%（w/v）的丁基甜菜碱乙基酯（BBEt），接种并在30℃和140upm下培育。40小时后，两种培养物的光密度OD_{650}大约为9.0，而培养物则处于静止阶段。再继续34小时后取出试样。将细胞离心（11000upm，5分钟），并利用HPLC检测丁基甜菜碱、L-肉毒碱和未转化的丁基甜菜碱的酯类的含量。结果列于表2。

作为对照试验，丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）在相同的培养基和相同的条件下储存，但不加细胞。在这种状态下未观察到将丁基甜菜碱的酯类转化为丁基甜菜碱的水解酶。

表2

菌株	起始原料		反应混合物				
	BBMe[a] [mmol/L]	BBEt[a] [mmol/L]	BBMe [mmol/L]	BBEt [mmol/L]	BB[b] [mmol/L]	L-肉毒碱 [mmol/L]	总量[c] [mmol/L]
HK13		43.1	—	26	7	11	44
HK13	46.9		28	—	15	< 6	< 49
HK1349		43.1	—	26	6	10	42
HK1349	46.9		27	—	13	9	49

a. 0.75%（w/v）BBME=46.9mmol/l；0.75%（w/v）BBEt=43.1mmol/l。

b. BB=丁基甜菜碱

c. 总量＝BBMe＋BBEt＋丁基甜菜碱＋L-肉毒碱

菌株HK13（DSM2903）和HK1349（DSM3944）在74小时内大约转化40%的丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）。在丁基甜菜碱甲基酯的转化过程中，产生丁基甜菜碱的比例高于L-肉毒碱的比例，而在丁基甜菜碱乙基酯转化的过程中，则产生的L-肉毒碱的比例高于丁基甜菜碱的比例。

实施例 3

利用菌株 HK13（DSM2903），含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726）和 HK1331b（DSM3225），将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）转化为丁基甜菜碱和 L-肉毒碱，时间为 144 小时

将菌株 HK13（DSM2903），含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726）和 HK1331b（DSM3225），按照实施例 2 的类似方式进行培育，但基本培养基不是含有 0.75%（w/v），而是含有 0.90%（w/v）丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）或丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）。含有质粒 pVK100q 的菌株 HK1349（DSM8726）的预培养基另外还含有四环素（10μg/mL）。52 小时后，培养物光密度 OD_{650} 大约为 10.0，而培养物也处于静止阶段。再继续 92 小时后，取出试样。将细胞离心处理（11000upm，5 分钟），利用 HPLC 检测上清液中丁基甜菜碱、L-肉毒碱和未转化的丁基甜菜碱的酯类的含量。

将 HK13（DSM2903），含有质粒 pVK100q 的 HK1349（DSM8726）和 HK1331b（DSM3225）菌株分别在 144 小时内转化大约 50%的丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱乙基酯（BBEt）形成丁基甜菜碱和 L-肉毒碱。

实施例 4

水解酶在菌株 HK1349（DSM3944）的细胞提取液中的特性

4.1 菌株 HK1349（DSM3944）的细胞提取液的制备

将菌株 HK1349（DSM3944）的接种物（0.2mL）接种到另外含有 0.2%（w/v）甜菜碱、1.0%（w/v）L-谷氨酸盐和 0.2%（w/v）丁基甜菜碱的基本培养基（25mL）中，并在 30℃和 140rpm 下培育至 OD_{650nm} 达 3.0-7.0。这样获得的预培养物（2mL）又被接种到另外含有 0.2%（w/v）甜菜碱、1.0%（w/v）L-谷氨酸盐和 0.2%（w/v）的丁基甜菜碱的基本培养基（1.5L）中，并在 30℃和 140rpm 下培育至 OD_{650nm} 3.0-7.0。将培养物离心处理（3500upm；30 分钟；16℃），再将细胞重悬浮于 50mM 磷酸钠缓冲液（150mL；PH7.5）中。这样获得的细胞悬浮液的 OD_{650nm} 为 37。

4.2 检测细胞中存在的水解酶

依照实施例 4.1 获得的细胞悬浮物（HK1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，

50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5）经过离心处理（4000rpm；10 分钟；40℃），并且利用醋酸 4-硝基苯基酯对上清液（supernatant）的水解酶比活性进行析定。在第二次实验中，按照 4.1 获得的细胞悬浮物（HK1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5），用超声波在冰浴冷却下处理 10 分钟进行消化，使细胞碎片离心脱出（4000rpm；10 分钟；4℃），利用醋酸 4-硝基苯基酯析测法对上清液的水解酶比活性进行测定。水解酶的最高比活性（0.31U/mg 蛋白质）被视为 100%看待。结果列于表 3。水解酶活性存在于细胞内。

表 3

上清液	相对水解酶活性[%]
全细胞	45
细胞消化后	100

按照实施例 4.1 获得的细胞悬浮物（HK1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5）用超声波处理 10 分钟，在冰浴冷却下进行消化（digest），利用不同的去污剂（detergent）温育（5%（v/v）去污剂，30 分钟；25℃），并将碎片离心脱去（4000rpm，10 分钟；4℃）。利用醋酸 4-硝基苯基酯析定法测定上清液中水解酶比活性。水解酶的最高比活性（0.30U/mg 蛋白质）被视为 100%看待。结果列于表 4。用 Triton X-114 进行观察发现水解酶的最高比活性。

表 4

细胞消化后的上清液并用下列去污剂处理	相对的水解酶比活性[%]
—	70
SDS	26
Triton X-114	100
Triton X-100	64
Tween 80	80
溶菌酶	64

4.3 分子量测定

利用 SDS-PAGE 析测表 3 列举的上清液以及表 4 列举的用 Triton

X-114 或用溶菌酶（Lysozyme）处理的上清液。在所有的上清液中都发现了 22Kda 水解酶和 33Kda 水解酶。

4.4 底物特异性的测定

按照实施例 4.1 获得的细胞悬浮液（KH1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5），用超声波处理 10 分钟后在冰浴冷却下进行消化，通过 Triton X-114（5%（v/v）；30 分钟；25℃）进行培育，然后离心（4000rpm；10 分钟；40℃），冻干上清液。将冻干的上清液（100mg）溶解于磷酸钠缓冲液（50mM；PH7.5；1.0mL）中，并加入 37℃下的醋酸乙酯、丁酸乙酯和丁酸甲酯的乳液中（利用 Uhratruax 在含有 2%（W/V）阿拉伯胶的蒸馏水中将 5%（V/V）的酯乳化；20mL）的乳液。酯类水解释放出的酸用 NaOH（0.01M）通过 PH 计进行滴定。1U（单位）相当于每分钟释放的酸量（μmol）。最高的水解酶比活性（0.039U/mg 蛋白质）被视为 100%看待。结果列于表 5。

表 5

底物	水解酶比活性 [U/mg 蛋白质]	相对的水解酶比活性 [%]
醋酸乙酯	0.039	100
丁酸乙酯	0.028	72
丁酸甲酯	0.038	97

4.5 最佳 PH 值的测定

将按照实例 4.4 获得的冻干上清液（100mg）溶解于磷酸钠缓冲液中（50mM；PH7.5；1.0mL）。这种溶液（50μL）用不同 PH 值（50mM；PH5.0-9.0；850μL）的磷酸钠缓冲液进行稀释，并在 25℃与醋酸 4-硝基苯基酯（10mM 在二甲基烷基亚砜，100μL）相混合。水解产生的 4-硝基苯酚（$\varepsilon = 15 \times 10^3 \times M^{-1}cm^{-1}$）在 410nm 下测定。结果示于图 1。最佳 PH 值为 7.5。

4.6 温度标定性的测定

按照实例 4.1 获得的细胞悬浮物（HK1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5），通过用超声波处理 10 分钟后在冰浴冷却下消化，再用 Triton X-114（5%（v/v）30 分钟；25℃）进行温育，然

后离心处理（4000rpm；10 分钟；4℃）。上清液在 5-70℃的温度范围内温育 16 小时。温育后以醋酸 4-硝基苯基酯析定法测定水解酶的比活性。结果示于图 2。水解酶比活性随着温度的升高而降低。在 30℃下经过 16 小时培育仍存在有大约 85%的最初活性，在 45℃下培育 16 小时大约还有 50%的最初活性，在 50℃下培育 16 小时则只存在大约 35%的最初活性。

实施例 5

菌株 HK1349（DSM3944）的水解酶的纯化

按照实施例 4.1 获得的细胞上清液（HK1349（DSM3944），OD_{650nm} 37，50mM 磷酸钠缓冲液，PH7.5）通过用超声波处理 10 分钟后在冰浴冷却下进行消化，再用 Triton X-114（5%（v/v）；30 分钟；25℃）进行温育，然后离心处理(4000rpm;10 分钟;4℃)。利用凝胶过滤(Sephacryl™S-200，100cm³；洗脱剂：磷酸钠缓冲液（50mM；PH7.5），流速：1mL/分钟）对上清液的样品（10mL）进行纯化。

在单个馏分（2mL）中，水解酶比活性是利用醋酸 4-硝基苯基酯析定法来测定的。利用 SDS-PAGE 分析具有水解酶活性的馏分。只含分子量为 33Kda 的水解酶馏分（馏分 A）结合在一起。只含有分子量为 22Kda 的水解酶馏分，根据 SDS-PAGE“不纯”的馏分（馏分 B）结合在一起，而且含有分子量为 22Kda 的水解酶馏分，根据 SDS-PAGE 为“较纯”馏分（馏分 C）也结合在一起。“较纯”馏分中异蛋白的含量低于“不纯”馏分。在馏分 A、B 和 C 中，需重新利用醋酸 4-硝基苯基酯析定法测定水解酶比活性，并重新利用 SDS-PAGE 分析这些蛋白质溶液。结果列于表 6 和图 3。

表 6

蛋白质溶液	水解酶比活性 [U/mg 蛋白质]
上清液	0.080
馏分 A	0.122
馏分 B	0.260
馏分 C	0.199

利用超过滤法浓缩含有 33Kda 水解酶的馏分 A 和含有 22Kda 水解酶的馏分 C。22Kda 水解酶和 33Kda 水解酶的等电点通过 PhastSystem

（Amersham Pharmacia）按厂商指示测定。利用 PH 梯度为 3-9 的凝胶法来分析馏分 A 和馏分 C。结果示于图 4。馏分 C 另用 PH 梯度为 4-6.5 的凝胶法进行分析。析测操作类似于SDS-PPAGE。33Kda的水解酶等电点(PI)为 6.58，而 22Kda 水解酶的等电点（PI）为 4.15。

实施例 6

利用馏分 A 和馏分 C 将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）转化为丁基甜菜碱

取自实施例 5(1.0mL)的馏分 C 利用 Centricons 离心机(2mL,10Kda; 5000rpm; 60min; 4℃）将最初体积浓缩至 1/10。由丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）（50μmol）和磷酸钠缓冲液（50mM; PH7.5; 500μL）组成的反应溶液与浓缩的馏分 C（100μL）在 37℃下混合。将丁基甜菜碱甲基酯转化为丁基甜菜碱是利用薄层色层分离法定性进行的。

在 1 小时内，可以观测到馏分 C 的 22Kda 的水解酶能将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）转化为丁基甜菜碱，而在 60 小时内转化达大约 15%（估计）。

同样地，将实施例 5 的馏分 A 浓缩，并用丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）进行反应。馏分 A 的 33Kda 水解酶并不能将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）转化为丁基甜菜碱。

实施例 7

利用酯酶 PFE I、PFEII 和 SDE 将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）水解为丁基甜菜碱

与实施例 6 的方法类似，利用来自萤光假单孢菌（Bornscheuer）等人，《生物工程杂志》，1998，60，105-111）的 PFE I、来自萤光假单孢菌（DSM50106，Khalameyer 等人《应用环境微生物学》，1999，65，477-482）的酯酶 PFEII 以及来自淀粉酶产色链酶菌（例如由 Julich Fine Chemicals 获得的，Bornscheuer 等人《生物工程通讯>1999,21,101-104，Tesch 等人《细菌学杂志》1996，178，1859-1865》酯酶 SDE（各约 6mg）对丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）进行转化。

所有三种酯酶均将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）水解，其中酯酶 PFE II显示的活性最高。酯酶 PFE II 和 SDE 在 1 小时可以观测到丁基甜菜碱甲基酯已经转化为丁基甜菜碱。

实施例 8

利用可购买到的水解酶将丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）水解为丁基甜菜碱

由丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）（1.0%（w/v））溶于由磷酸钾缓冲液（10mM；PH7.0；20ml）组成的反应溶液与不同的水解酶（10-15mg 或 20μL）在 25℃下混合。利用一个 PH 探针对反应混合液的 PH 值追踪 24 小时。通过水解形成丁基甜菜碱的水解酶，PH 值应降低。反应中能够观察到 PH 值的下降，在反应混合物中丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）和丁基甜菜碱的含量利用 HPLC 测定。结果列于表 7。来自热链形芽孢杆菌（Roche 氏诊断）的酯肪酶、猪肝的酯酶（从 Fluka 和 Roche 氏诊断获得）将大部分丁基甜菜碱甲基酯（BBMe）转化为丁基甜菜碱。来自热链形芽孢杆菌的酯肪酶已经被克隆出来（Schmid-Dannert 等人，《生物化学、生物物理学通报》1996，1301，105-114）。

表 7

水解酶	BBMe [μmol/mL]	丁基甜菜碱 [μmol/mL]
—	78.1	1.6
猪肝酯酶（Fluka）	68.9	5.9
热链形芽孢杆菌脂肪酶（Roche 氏诊断）	71.1	6.3
猪肝酯酶（Roche 氏诊断）	71.2	5.9
枯草杆菌酶 A60（Novo Nordisk）	73.8	2.5
手关节炎酶(Chirazyme) L2（Roche 氏诊断）	171.8	4.6

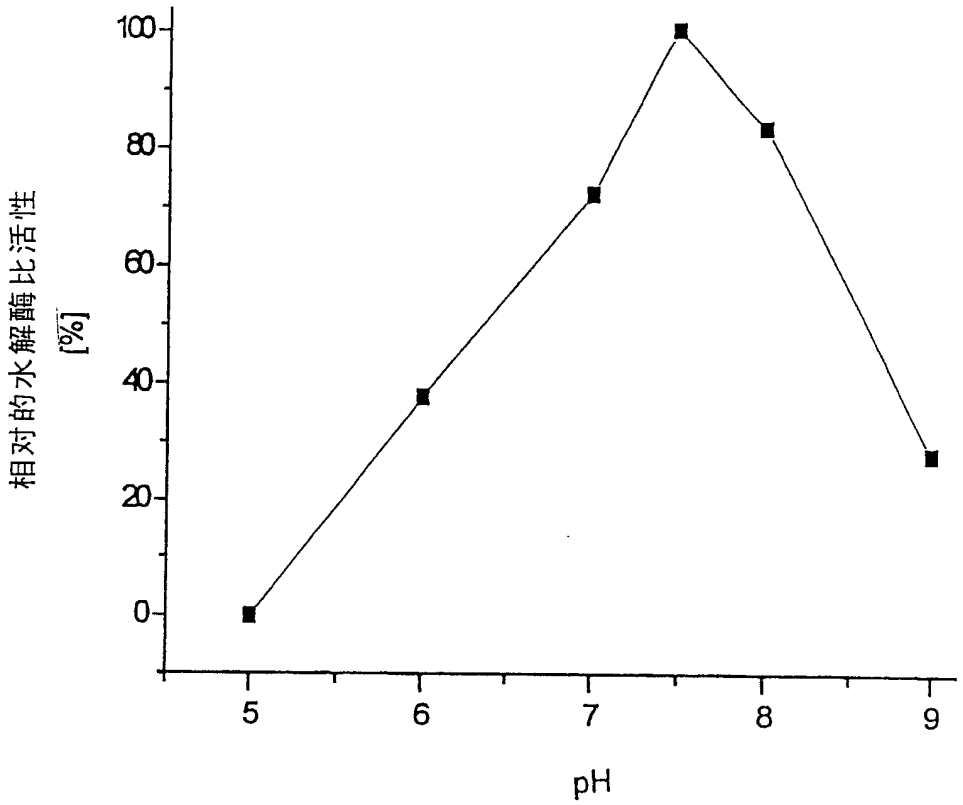


图 1

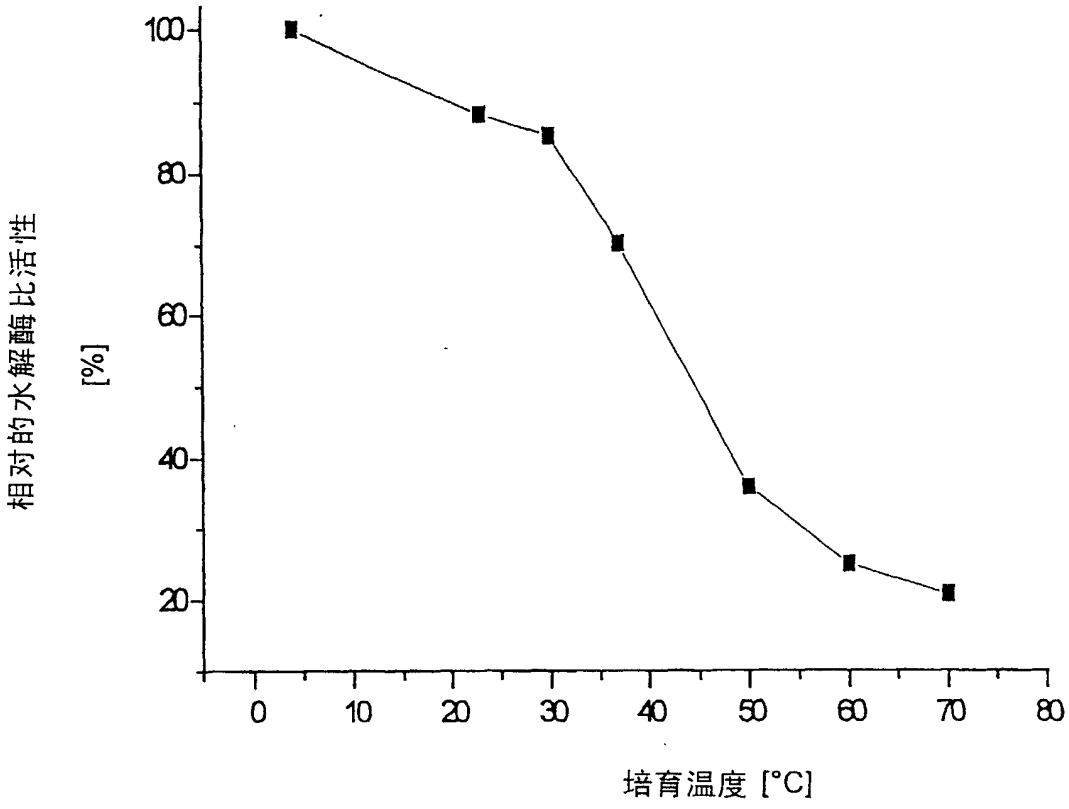
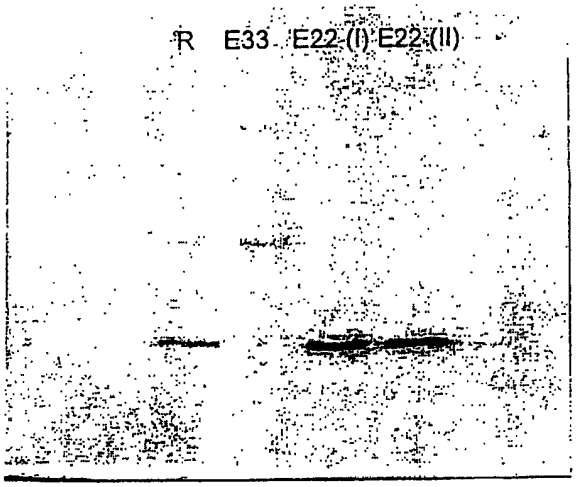


图 2



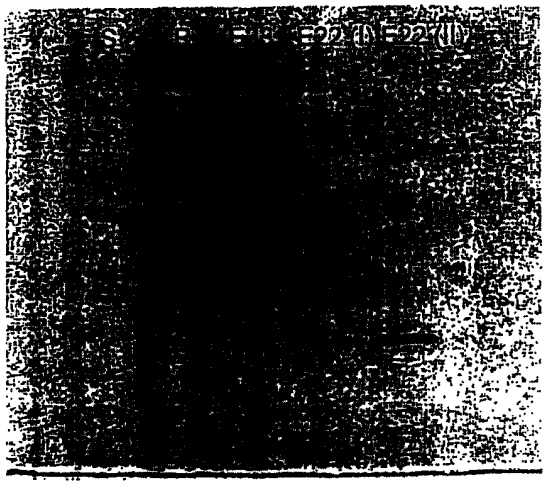
R: 上清液

E33: 馏分 A

E22 (I): 馏分 B

E22 (II): 馏分 C

析测：活性染色



S: 标准

R: 上清液

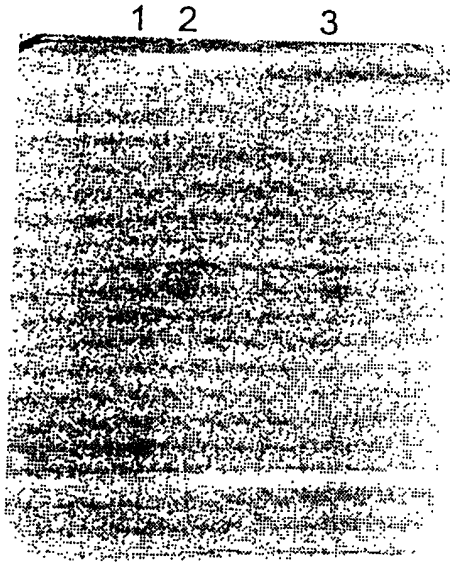
E33: 馏分 A

E22 (I): 馏分 B

E22 (II): 馏分 C

析测： 考马斯亮蓝和活性染色

图 3

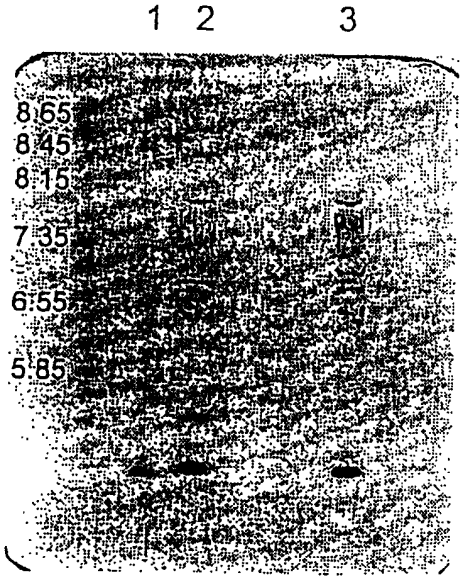


1: 馏分 C

2: 馏分 A

3: 上清液

析测：活性染色



1: 馏分 C

2: 馏分 A

3: 上清液

析测：活性染色考马斯亮蓝染色

图 4