

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2019年8月8日 (08.08.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/148494 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C07K 14/195* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 9/10* (2006.01) *C12P 41/00* (2006.01)  
*C12N 15/54* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/075272

(22) 国际申请日: 2018年2月5日 (05.02.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 凯莱英生命科学技术(天津)有限公司 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(72) 发明人: 洪浩(HONG, Hao); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。詹姆斯·盖吉(JAMES, Gage); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。卢江平(LU, Jiangping); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。徐幸福(XU, Xingfu); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。崔瑜霞(CUI, Yuxia); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张娜(ZHANG, Na); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。董学武(DONG, Xuewu); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。于文燕(YU, Wenyan); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。黄鑫(HUANG, Xin); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。郝明敏(HAO, Mingmin); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。马玉磊(MA, Yulei); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。程逸冰(CHENG, Yibing); 中国天津市经济技术开发区

第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。赵佳东(ZHAO, Jiadong); 中国天津市经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层, Beijing 100098 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: TRANSAMINASE MUTANT AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 转氨酶突变体及其应用

(57) Abstract: Provided are a transaminase mutant and an application thereof. The amino acid sequence of the transaminase mutant is formed after mutation of the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1, and mutated amino acid sites comprise a T7C+S47C site. The transaminase mutant having the mutated sites can be further prepared into an immobilized enzyme by means of immobilization technology, the activity and the stability of the immobilized enzyme are relatively high, and the immobilized enzyme can be recycled for a plurality of times, and is applicable to continuous flow reaction in a packed bed.

(57) 摘要: 提供了一种转氨酶突变体及其应用, 该转氨酶突变体的氨基酸序列是SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列发生突变的氨基酸序列, 突变的氨基酸位点包括T7C+S47C位点。具有上述突变位点的转氨酶突变体可以进一步通过固定化技术制备成固定化酶, 且其固定化酶的活力和稳定性较高, 能够被多次回收再利用, 适合应用于填充床连续流反应。



WO 2019/148494 A1

## 转氨酶突变体及其应用

### 技术领域

本发明涉及酶工程领域，具体而言，涉及一种转氨酶突变体及其应用。

### 背景技术

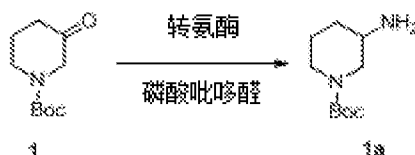
$\omega$ -转氨酶( $\omega$ -TA)属于转移酶类，同其他的转氨酶类一样，催化一个氨基与酮基互换的过程。大部分情况下 $\omega$ -转氨酶是指一类酶，只要某个酶催化的转氨反应中，反应的底物或产物中不含有 $\alpha$ -氨基酸，就可以称该酶为 $\omega$ -转氨酶。 $\omega$ -转氨酶以酮类化合物为原料，通过立体选择性地转氨基作用，可以高效生产手性胺。对映体手性胺是具有广泛生物活性的许多药物化合物的关键中间体(*ChemBioChem*. 9, 2008, 363-365, *Chem. Commun.* 46, 2010, 5569-5571, *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2011, 1479-1493)。因其底物相对廉价、产物纯度高的特点，受到研究人员越来越多的关注(*Green Chemistry*, 2017, 19, 2: 333-360.)。并且转氨酶已经显现出应用于生产手性胺的希望(*Organic Process Research & Development*, 2010, 14, 234-237)。

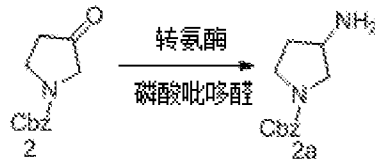
尽管使用转氨酶生产手性胺的进展已被高度关注，但酶促方法在放大生产应用中存在很多问题。如酶活性低及酶用量大导致发酵成本增加；易受反应体系中有有机溶剂的影响而变性失活等。

另外，在分离产品胺的过程中，只能通过使酶变性失活形成沉淀后除去并丢弃，无法再利用；或将产品用有机溶剂从水溶液中萃取出，酶继续存在于水溶液中，但此时由于pH及溶剂等众多苛刻条件的影响使酶失活，无法再利用。

现有技术中有报道通过固定化技术将酶进行固定化以提高酶的回收再利用的问题。然而，目前固定化技术在脂肪酶、青霉素酰化酶、淀粉酶等领域的研究较多，因为这些酶相比其他酶有更好的稳定性，固定化后酶活性的损失较低。而对于大部分转氨酶而言，其稳定性较差，尤其是当体系中存在有机相时，固定化操作过程中容易引起酶活损失，因而，对转氨酶的固定化的研究较少，适合连续化反应的固定化的转氨酶的研究更少。

对于能够催化下列底物1和底物2进行氨基转换反应的转氨酶而言，如果用游离的转氨酶催化该反应，游离酶不能回收，只能使用一次。且由于反应体系中酶蛋白的存在使得后处理乳化现象极其严重，产物分离困难。





若将所用转氨酶固定化后，理论上可以实现酶的回收利用，但现有的用于催化底物 1 或底物 2 的转氨酶固定化后的酶活回收率依旧很低。而且，由于现有的底物酮（氨基受体）大多都水溶性不好，无法在纯水相中进行连续化反应。若要实现连续化反应，则需要加入足够的有机助溶剂使底物溶解，但现有的转氨酶对温度、pH 及有机溶剂的耐受性差，有机溶剂易使其失活。因而也难以实现其固定化处理。

因此，需要对现有的能够催化上述底物的转氨酶进行改进，以改善其在有机溶剂等极端环境中稳定性差而应用受限的问题。

## 发明内容

本发明的主要目的在于提供一种转氨酶突变体及其应用，以解决现有技术中的转氨酶活性在极端环境中耐受性差而使得应用受限的问题。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种转氨酶突变体，该转氨酶突变体具有 SEQ ID NO: 1 所示序列发生氨基酸突变的序列，发生氨基酸突变的位点包括 T7C+S47C 位点。

进一步地，发生氨基酸突变的位点还包括如下任意一个或多个：M356L、F364L、C404L、M430L、R405E/A、K90G、K219T、K304D、K51R、A95P、E368P、Q346E、H333K、D371G、E246A、C328A、N412G、T402P、T107F/A、G110P、K69N、G201C、Q380L、K193I、I297L、R305H、F111Y、K190E 以及 A286T，其中“/”表示“或”。

进一步地，发生氨基酸突变的位点还包括如下任一种组合突变位点：K51R+W187Y、R405E+A95P、R405E+A95P+K304D、R405E+A95P+K304D+Q380L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E246A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107F、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+G110P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+A286T、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N、

R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C 及  
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T。

为了实现上述目的，根据本发明的第二个方面，提供了一种 DNA 分子，该 DNA 分子编码上述任一种转氨酶突变体。

根据本发明的第三个方面，提供了一种重组质粒，该重组质粒连接有上述任一种 DNA 分子。

根据本发明的第四个方面，提供了一种固定化转氨酶，该固定化转氨酶包括上述任一种转氨酶突变体。

进一步地，固定化转氨酶为转氨酶突变体的转氨酶交联酶聚集体；优选地，转氨酶突变体经沉淀得到转氨酶聚集体，转氨酶聚集体中游离的氨基、酚基、咪唑基或巯基进一步与交联剂交联得到的转氨酶交联酶聚集体，其中，交联剂选自戊二醛、N, N-亚甲基双丙烯酰胺、双马来酰亚胺及右旋糖苷中的任意一种；优选地，转氨酶交联酶聚集体为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的交联酶聚集体：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P、T7C+S47C+K51R+W187Y、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L；优选地，右旋糖苷的分子量为 6 KDa~200 KDa；优选地，转氨酶聚集体为转氨酶突变体经乙醇沉淀得到；优选地，转氨酶聚集体中游离的氨基与戊二醛交联得到转氨酶交联酶聚集体。

进一步地，固定化转氨酶为转氨酶包埋-交联固定化酶；优选地，转氨酶包埋-交联酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的包埋-交联固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L；优选地，转氨酶突变体中游离氨基与戊二醛形成席夫碱交联得到转氨酶交联酶，转氨酶交联酶包埋至聚丙烯酰胺凝胶网格中得到转氨酶包埋-交联固定化酶。

进一步地，固定化转氨酶为转氨酶突变体与载体共价连接的共价固定化酶；优选地，共价固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的共价固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、T7C+S47C+Q380L、T7C+S47C+R405E、

T7C+S47C+K51R+W187Y 、 T7C+S47C+ R405E+A95P+K304D 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、T7C+S47C+ R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T；优选地，载体为壳聚糖载体、树脂载体；更优选地，壳聚糖载体通过羟基和/或氨基与转氨酶突变体共价结合形成共价固定化酶；更优选地，树脂载体包括基质及与基质连接的官能团，基质选自苯乙烯和甲基丙烯酸酯共聚物、聚苯乙烯树脂以及聚甲基丙烯酸酯树脂中的任意一种，与基质连接的官能团选自 C2 短链氨基、C4 中链氨基、C6 长链氨基或环氧基；进一步优选地，树脂载体选自 ECR8309、ECR8315、EC-HFA、LX-1000HA、LX-1000EA、ECR8409、ECR8415、EC-EP、EC EP403、EXE119、LX-1000EP、Immobead-150A、Immobead-150P、Immobead350A、ECR8206、ECR8209、ECR8215 或 ECR8285。

进一步地，固定化转氨酶为转氨酶突变体与载体经金属离子螯合而成的螯合固定化酶；优选地，螯合固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的螯合固定化酶：T7C+S47C 、 T7C+S47C+A95P 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T；优选地，载体为多孔玻璃载体；进一步优选地，多孔玻璃载体为 EziG-101、EziG-102 或 EziG-103。

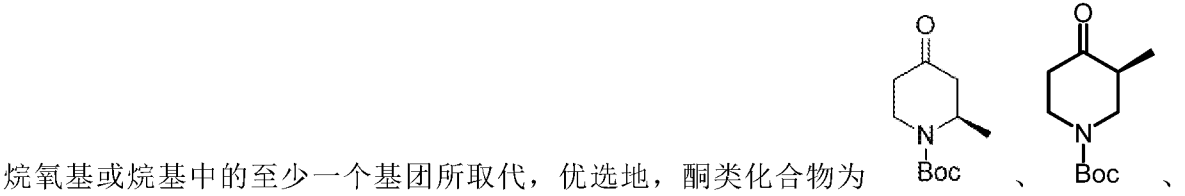
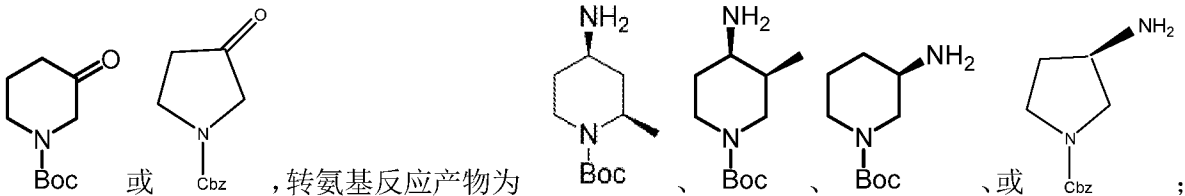
进一步地，固定化转氨酶为转氨酶突变体与载体经物理吸附结合的吸附固定化酶；优选地，吸附固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的共价固定化酶：T7C+S47C 、 T7C+S47C+A95P 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C；优选地，载体为树脂载体；更优选地，树脂载体包括基质及与基质连接的官能团，基质选自苯乙烯和甲基丙烯酸酯共聚物、聚苯乙烯树脂以及聚甲基丙烯酸酯树脂中的任意一种，与基质连接的官能团为十八烷基；进一步优选地，树脂载体选自 ECR8806、ECR1030、ECR1090、ECR1061、ECR1091、ECR8804、Immobead-EC1、Immobead-S60S、Immobead-S861、X17S0409、EXE120 或 Diaion。

根据本发明的第五个方面，提供了一种生产手性胺的方法，包括采用转氨酶对酮类化合物及氨基供体进行催化转氨基反应的步骤，转氨酶为上述任一种转氨酶突变体或上述任一种固定化转氨酶。

进一步地，转氨酶为上述任一种转氨酶突变体，上述方法为批次反应；优选批次反应的反应体系为水相反应体系。

进一步地，转氨酶为上述任一种固定化转氨酶，上述方法为连续化反应；优选连续化反应的反应体系为有机相反应体系。

进一步地，酮类化合物为  $R_1-C(=O)-R_2$ ，其中， $R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 C1~C8 烷基、C5~C10 环烷基、C6~C10 芳基或 C5~C10 杂芳基，或者  $R_1$  和  $R_2$  与羰基上的碳共同形成 C5~C10 杂环基、C5~C10 碳环基或 C5~C10 杂芳基，C5~C10 杂环基和 C5~C10 杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，C6~C10 芳基中的芳基、C5~C10 杂芳基中的杂芳基、C5~C10 碳环基中的碳环基或 C5~C10 杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、

烷氧基或烷基中的至少一个基团所取代，优选地，酮类化合物为 ，转氨基反应产物为 ；  
 优选地，氨基供体为异丙胺。

应用本发明的技术方案，通过对 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的转氨酶进行定向进化，筛选得到了一系列其酶活性和/或稳定性大大提高的转氨酶突变体，这些突变体的氨基酸序列是在 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的基础上发生突变的氨基酸序列，其中突变的氨基酸位点包括 T7C+S47C 位点。包含上述突变位点的转氨酶突变体，能够在相对极端的环境中应用。

## 具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

名称解释：

定点突变：是指通过聚合酶链式反应（PCR）等方法向目的 DNA 片段（可以是基因组，也可以是质粒）中引入所需变化（通常是表征有利方向的变化），包括碱基的添加、删除、点

突变等。定点突变能迅速、高效的提高 DNA 所表达的目的蛋白的性状及表征，是基因研究工作中一种非常有效的手段。

利用全质粒 PCR 引入定点突变是简单有效，且目前使用较多的手段。其原理是：一对包含突变位点的引物（正、反向），和模版质粒退火后用聚合酶“循环延伸”，（所谓的循环延伸是指聚合酶按照模版延伸引物，一圈后回到引物 5'端终止，再经过反复加热退火延伸的循环，这个反应区别于滚环扩增，不会形成多个串联拷贝。正反向引物的延伸产物退火后配对成为带缺刻的开环质粒。Dpn I 酶切延伸产物，由于原来的模版质粒来源于常规大肠杆菌，是经 dam 甲基化修饰的，对 Dpn I 敏感而被切碎，而体外合成的带突变序列的质粒由于没有甲基化而不被切开，因此在随后的转化中得以成功转化，即可得到突变质粒的克隆。突变质粒转化至宿主细胞，诱导表达出目标蛋白。

易错 PCR：意为易错条件下的 PCR，即容易使复制出的 DNA 序列出现错误的 PCR 技术，又称错配 PCR 或倾向错误 PCR。具体是指通过利用低保真度 TaqDNA 聚合酶和改变 PCR 反应条件，降低 DNA 复制的保真度，在新 DNA 链合成过程中增加碱基错配，从而使扩增产物出现较多点突变的一种体外诱导 DNA 序列变异的方法。

易错 PCR 是目前最简单、有效的基因体外随机诱变技术，其原理是：碱基的异构为错配提供了可能，组成 DNA 的 4 种碱基都有互变异构体存在，其中鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）3 种含氧碱基有酮式和烯醇式两种互变异构体。腺嘌呤（A）和胸腺嘧啶两种含氮碱基，有胺式、亚胺式两种互变异构体。G、C 和 T 主要以酮式结构存在，烯醇式结构的比率极低，A 和 T 两种含氮碱基上的氮原子主要以氨基（NH<sub>2</sub>）状态存在，以亚胺基（NH）状态存在的比率极低。不同同分异构体之间氢原子位置的不同及同一位置电子云偏离方向的不同，可使得碱基的配对形式发生改变，这样在复制后的子链上就可能出现错配。例如当胸腺嘧啶以酮式结构存在时，与腺嘌呤配对，而以烯醇式结构存在时，与鸟嘌呤配对，这样就出现了 A 能配上 C，T 能配上 G 的不稳定碱基对，从而造成错配。

在已知的几种耐热 DNA 聚合酶中，TaqDNA 聚合酶的错配率最高。Taq DNA 聚合酶是发现的耐热 DNA 聚合酶中活性最高的一种，具有 5'-3' 外切酶活性，不具 3'-5' 外切酶活性，因此在合成中对某些单核苷酸错配没有校正功能，所以比有 3'-5' 校对活性的 DNA 聚合酶发生错配的概率较高。DNA 聚合酶的保真性可以通过多种方法来降低，包括使用 4 种浓度不同 dNTP、添加 Mn<sup>2+</sup>、提高 Mg<sup>2+</sup> 浓度等。几种诱变方法导致扩增 DNA 链碱基变异的机理各不相同。MnCl<sub>2</sub> 是 DNA 聚合酶的诱变因子，加入 Mn<sup>2+</sup> 可以降低聚合酶对模板的特异性，提高错配率；4 种 dNTPs 浓度的不平衡可以提高碱基错误掺入的概率，实现错配；Mg<sup>2+</sup> 具有激活 Taq 酶的作用，增加 Mg<sup>2+</sup> 浓度，使之超过正常用量，能稳定非互补的碱基对；提高 Taq DNA 聚合酶用量、增加每个循环延伸时间，可以增加错配终端延伸的概率；降低起始模板浓度，会使后面 PCR 循环的变异模板比例增加。

固定化酶：是指在一定的空间范围内，其催化作用能反复和连续使用的酶。通常酶催化反应都是在水溶液中进行的，而固定化酶是将水溶性酶用物理或化学方法处理，使之成为不

溶于水的，但仍具有酶活性的状态。酶固定化之后，一般稳定性增加，易从反应体系中分离，易于控制，能多次使用，便于运输和储存，有利于自动化生产，但活性降低，使用范围减小。

固定化酶载体基质：指形成固定化酶载体骨架的材料。

本申请中，所涉及到的 1wt 均指转化 1g 底物需要 1g 转氨酶突变体重组湿细胞。

本申请中，所涉及的 1V 等于反应体系的体积/底物的质量。

本申请为了解决现有技术中的转氨酶活性在极端环境中耐受性差而使得应用受限的问题，本申请一种典型的实施方式对来源于紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) 的 R416T 位点发生突变的转氨酶进行了定向进化，得到了一种转氨酶突变体，该转氨酶突变体具有 SEQ ID NO:1 所示的序列发生氨基酸突变的序列，其中，发生氨基酸突变的位点包括 T7C+S47C 位点。在相对极端的环境下，R416T+T7C+S47C 位点发生突变的转氨酶突变的转氨酶活性较 R416T 突变体有明显提高。

以下将结合试验对上述技术方案和技术效果进行说明。

#### 一、对极端环境耐受性提高的突变体的筛选

本申请对来源于紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) 的氨基转移酶进行改造，得到酶活性提高的 R416T 突变体，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。该酶活性好，但是稳定性还不理想，为了提高该酶的稳定性，又以 R416T 突变体为模板，设计了五组双点突变，Q78C+A330C, V137C+G313C, A217C+Y252C, T7C+S47C, L295C+328C, 引物序列是利用 QuikChange Primer Design 网页设计得到。通过全质粒 PCR 的方式在突变体 R416T 上引入突变位点，以 pET-22b(+) 为表达载体，获得新的突变位点的突变质粒。

将突变质粒转化至大肠杆菌细胞内，在 25 °C，0.1 mM IPTG 的转氨酶诱导表达最佳条件下诱导过夜，然后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶。将突变菌株表达的酶液在 45-50 °C，pH 9.5，20% DMSO 的极端环境下处理 1 h 后，加入底物 1 或底物 2，使用 1 wt 的酶量继续在此条件下反应 16 h 后检测转化率。利用此方式筛选出稳定性提高的突变体，其中 T7C+S47C 位点的突变体 (R416T+T7C+S47C) 活性较 R416T 突变体有明显提高，在此条件下，R416T 催化的转化率为 15%，而突变体 R416T+T7C+S47C 催化的转化率为 72%。

进一步地，以 R416T+T7C+S47C 突变体为母本，设计了 33 对定点突变 (具体引物采用 QuikChange Primer Design 网页设计得到) (M356L、W360L、F364L、C404L、M430L、M438L、C445A、F449V、R405E、R405A、K90G、K190R、K219T、K304D、K51R、W187Y、K193E、K143R、N151M、S8P、A33P、A95P、E368P、Q346E、H333K、D371G、E246A、C328A、N412G、T402P、T107F、T107A、G110P)，经 QuikChange Primer Design 网页设计引物序列，利用定点突变手段，以 pET-22b(+) 为表达载体获得带有目的基因的突变质粒。将突变质粒转化至大肠杆菌细胞内，并在 25 °C、0.1 mM IPTG 的转氨酶诱导表达最佳条件下诱导过夜。然后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶。

将突变菌株表达的酶液在 30-45℃、pH 9.5-10、50% DMSO 的极端环境下处理 1 h 后、加入底物 1 或底物 2、继续在此条件下反应 16 h 后检测转化率。以此方式筛选出温度、pH 及有机溶剂耐受性增强的突变体。筛选结果为：突变位点在 M356L、F364L、C404L、M430L、R405E、R405A、K90G、K219T、K304D、K51R、A95P、E368P、Q346E、H333K、D371G、E246A、C328A、N412G、T402P、T107F、T107A、G110P 的突变体、对 30℃、pH9.5、50%DMSO 环境的耐受性较 R416T+T7C+S47C 突变体提高 8%-40%。某些突变体对 45℃、pH9.5、50%DMSO 环境的耐受性较 R416T+T7C+S47C 突变体提高 1.7 倍~2.1 倍、某些突变体对 40℃、pH10、50%DMSO 环境的耐受性较 R416T+T7C+S47C 突变体提高 3.7 倍~3.9 倍。

以 R416T+T7C+S47C 突变体为母本，定点突变所筛选到的分别在不同极端环境下耐受性得到提高的具体突变体见下表 1 和表 2。

表 1：定点突变所获的对 30℃、pH 9.5、50%DMSO 环境的耐受性提高的单点突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
母本 R416T+T7C+S47C	无	D371G	23%	T107F	36%
K90G	8%	T402P	25%	E368P	43%
K219T	9%	R405A	27%	C328A	39%
M430L	13%	E246A	29%	T107A	39%
K51R	14%	H333K	30%	R405E	41%
C404L	16%	A95P	31%	N412G	19%
M356L	18%	G110P	32%	Q346E	35%
F364L	18%	K304D	34%	-/-	-/-

表 2：定点突变所获的对 40℃、pH10、50%DMSO 环境的耐受性提高的单点突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	C328A	312%	A95P	387%
G110P	98%	D371G	286%	Q346E	409%
H333K	377%	T402P	326%	E368P	421%
T107A	342%	T107F	339%	R405E	369%
E246A	253%	-/-	-/-	-/-	-/-

为简单有效地筛选出更理想的突变体、本申请还采用易错 PCR 技术对 R416T+T7C+S47C 突变体进行随机突变。

本申请经易错 PCR 方法，将获得目的基因片段连接至 pET-22b 载体上，获得带有目的基因的突变质粒。将突变质粒转化至大肠杆菌细胞内，并在 25℃、0.1mMIPTG 的转氨酶诱导表达最佳条件下诱导过夜。最后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶。

将突变菌株表达的酶液在 30-45℃、pH9-10、有机溶剂浓度为 50%DMSO 或 35%MeOH 的极端环境下处理 1h 后，加入底物 1 或 2，继续在此条件下反应 16h 后检测转化率。以此方式筛选出对温度、pH 及有机溶剂耐受性增强的突变体。筛选结果显示：突变位点在 K69N、

G201C、Q380L、K193I、I297L、R305H、F111Y、K190E、A286T 的突变体对 30℃、pH9.5、50%DMSO 环境的耐受性较 R416T+T7C+S47C 突变体提高 16%-45%、某些突变体对 40℃、pH10、50%DMSO 环境的耐受性较 R416T+T7C+S47C 突变体提高 117%~537%、某些突变体对 30℃、pH8、35%MeOH 环境的耐受性较母本提高 233%~649%。

以 R416T+T7C+S47C 突变体为母本，易错 PCR 所筛选到的分别在不同极端环境下耐受性得到提高的具体突变体见下表 3 至表 5。

表 3：易错 PCR 所获对 30℃、pH9.5、50%DMSO 环境的耐受性提高的单点突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	K193I	38%
F111Y	16%	K190E	31%
Q380L	41%	R305H	43%
I297L	42%	A286T	45%
K69N	24%	G201C	28%

表 4：易错 PCR 所获对 40℃、pH10、50%DMSO 环境的耐受性提高的单点突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	Q380L	509%
K190E	191%	K193I	312%
F111Y	238%	I297L	537%
R305H	174%	K190E	191%
K69N	124%	G201C	117%

表 5：易错 PCR 所获对 30℃、pH 8、35% MeOH 环境的耐受性提高的单点突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	R305H	497%
F111Y	233%	I297L	576%
K190E	403%	K193I	579%
A286T	623%	Q380L	649%
K69N	288%	G201C	294%

为进一步进化出稳定性和耐受性更好的转氨酶，本申请将这些转氨酶稳定性和耐受性提高的位点进行多点组合突变，然后通过定向筛选的方法获得稳定性和耐受性进一步提高的多点突变体。

进行组合突变的突变位点来自于 K51R、W187Y、R405E、K90G、A95P、K304D、Q380L、E368P、Q346E、H333K、D371G、E246A、C328A、N412G、T402P、T107F、T107A、G110P、I297L、K69N、G201C、A286T。

该组合突变是对这些位点进行任意组合。具体而言，包括但不限于如下突变组合：  
 K51R+W187Y、R405E+A95P、R405E+A95P+K304D、R405E+A95P+K304D+Q380L、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E246A、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107F、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+G110P、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+  
 E368P+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+A286T、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N、  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C 及  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T。

将突变质粒转化至大肠杆菌细胞内，在 25°C、0.1mMIPTG 的转氨酶诱导表达最佳条件下诱导过夜。然后通过超声破碎细胞的方法获得粗酶。

在更极端的条件下，如 45°C、pH9.5-10、含 50%DMSO 或 35%MeOH 的环境下将酶液处理 1h 后，加入底物 1，继续在此条件下反应 16h，检测转化率。某些组合突变体对 40°C、pH10、50%DMSO 环境的耐受性较母本提高 231%~610%、某些组合突变体对 30°C、pH8、35%MeOH 环境的耐受性较母本提高 213%~990%、某些组合突变体对 45°C、pH8、40%MeOH 环境的耐受性较母本提高 3000%之多。具体的耐受性提高的组合突变体见下表 6 至表 8。

表 6：对 40°C、pH10、50%DMSO 环境的耐受性提高的组合突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	R405E+A95P	231%
K51R+W187Y	507%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E246A	298%
R405E+A95P+K304D	572%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A	334%
R405E+A95P+K304D+Q380L	562%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G	246%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	586%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P	323%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P	611%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107F	498%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	552%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A	573%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	563%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+G110P	317%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G	368%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	610%

表 7: 对 30℃、pH8、35%MeOH 环境的耐受性提高的组合突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A	783%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G	213%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A	837%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P	288%	K51R+W187Y	866%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G	354%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P	925%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	557%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	979%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	773%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	990%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	783%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	697%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N	596%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	623%

表 8: 对 45℃、pH8、40%MeOH 环境的耐受性提高的组合突变体。

突变位点	耐受性提高程度	突变位点	耐受性提高程度
R416T+T7C+S47C	无	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+A286T	3090%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	3100%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P	3000%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N	2889%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	2927%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	3010%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	2996%

## 二、对本申请的转氨酶突变体进行固定化

### 2.1 转氨酶交联酶聚集体 (CLEAs) 的制备

本申请中, 分别对母本 R416T+T7C+S47C 突变体、在母本突变体基础上筛选得到的单点突变体及组合突变体的转氨酶进行交联法固定, 制备转氨酶交联酶聚集体。

一般地, 交联酶聚集体的制备主要分两步进行: (1) 酶蛋白聚集沉淀体的形成; (2) 沉淀体之间的交联。

酶蛋白可以通过盐析法、等电点沉淀法、重金属盐沉淀法或有机溶剂沉淀法等方法凝聚沉淀, 得到酶蛋白沉淀体 (Aggregates)。一般情况下, 这种酶蛋白沉淀为可逆沉淀, 能重新在水溶液中溶解。

在蛋白沉淀后、加入交联剂使蛋白沉淀体间进一步通过共价键相连、形成水不溶性沉淀-交联酶聚集体。使用的交联剂为双功能或多功能试剂，双功能试剂有戊二醛、N,N-亚甲基双丙烯酰胺（MBA）、双马来酰亚胺等、多功能试剂右旋糖苷（分子量为 6 KDa~200 KDa）。酶蛋白的游离氨基、酚基、咪唑基及巯基均可参与交联反应。

制备固定化酶液的缓冲液中含有 0.4-1mg/mL 的 PLP、酶液 pH 为 7.0-8.0。制备酶蛋白沉淀所用的沉淀剂为乙醇、异丙醇和/或硫酸铵，沉淀剂终浓度为 90%。制备酶蛋白的交联聚集体所用的交联剂为 25%戊二醛溶液，戊二醛终浓度为 200mM-500mM。

制备的交联酶聚集体、可以直接使用过滤得到的含水交联酶在水相进行催化反应、或将含水的交联酶冻干得到干粉后再应用。冻干粉还可以应用于有机溶剂相中的反应。交联酶聚集体使用一次后、可以通过离心或过滤等方式回收后再使用，在与第一次使用相比，活力损失 <5% 的范围内统计重复使用次数，交联酶聚集体在水相反应中应用，与游离酶相比，活力回收 >80%，母本 R416T+T7C+S47C 可重复使用 3 次，而在母本基础上的单点突变体和/或组合突变体的重复使用次数较母本明显提高，其中最好的突变体的重复使用次数可达 13 次。

某些突变体的交联酶在含 35%甲醇的体系中反应可重复使用至少 6 次。突变体游离酶活性稳定性提高，固定化后酶活回收及重复使用次数也提高。

使用交联酶催化反应，反应后处理从水相中用有机溶剂萃取产品，乳化现象明显减轻。制备交联酶无需载体、成本低、使用交联酶催化反应、重复使用次数多、综合使用次数、酶用量减少、使用成本较游离酶低。交联酶冻干粉在 100%的有机相溶剂中反应，母本重复使用第二次时，其活性与第一次相比损失 >10%。而某些突变体的重复使用可达 5 次，活性与第一次相比损失 <5%。

## 2.2 转氨酶的包埋-交联固定化方法

CLEAs 无载体支撑，固定化酶颗粒小 (<10  $\mu\text{m}$ )，机械强度较差，过滤回收酶的过程中，酶容易板结，下次使用时不能很好地分散在反应体系中。为解决这一问题，可以结合交联和包埋两种技术先采用戊二醛作为交联剂，在含有酶液、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的混合液中，滴加戊二醛使其和自由酶形成希夫碱制得交联酶聚集体，加入引发剂过硫酸铵形成聚丙烯酰胺凝胶，而交联酶聚集体便被包埋至聚丙烯酰胺凝胶矩阵中，从而得到稳定的固定化酶。

本申请中，分别对母本 R416T+T7C+S47C 突变体、在母本突变体基础上筛选得到的单点突变体及组合突变体的转氨酶进行包埋-交联法固定，制备包埋-交联酶。

制备的包埋-交联酶，酶活回收 >80%，水相反应使用一次后、经过滤等方式极易回收后再使用，在与第一次使用相比，活力损失 <5% 的范围内统计重复使用次数，母本 R416T+T7C+S47C 可重复使用 8 次，而在母本基础上的单点突变体和/或组合突变体的重复使用次数较母本明显提高，其中最好的突变体的重复使用次数可达 18 次。

某些突变体的包埋-交联酶在含 35%甲醇的体系中反应可重复使用至少 12 次。后处理从水相中用有机溶剂萃取产品，乳化现象明显减轻。

### 2.3 转氨酶的吸附固定化方法

酶分子与水不溶性载体通过静电作用、氢键、疏水作用等方式吸附结合可制备得到吸附固定化酶。该方法条件温和，不易引起酶的变性，但在水溶液中酶很容易与载体脱离，无法回收再利用，因此吸附法制备的固定化酶主要应用于有机溶剂中的反应。

可用于吸附固定化酶的载体分为无机载体和高分子载体两大类。无机载体有活性炭、多孔玻璃、酸性白土、漂白土、高岭石、氧化铝、硅胶、膨润土、羟基磷灰石、磷酸钙、金属氧化物等；高分子载体有淀粉、谷蛋白、大孔型合成树脂、陶瓷等。

本申请所用载体为大孔合成树脂载体，包括基质以及可选的修饰该基质的官能团，其中，基质包括但不限于聚苯乙烯树脂、聚甲基丙烯酸酯树脂或苯乙烯与甲基丙烯酸酯的共聚物。除此之外，各类载体可经十八烷基官能团修饰。下表 9 所列为适用于本申请中转氨酶吸附固定化的载体。

表 9. 吸附型载体

载体名称	基质	官能团
Diaion	聚甲基丙烯酸酯	无
X17S0401	聚甲基丙烯酸酯	无
ECR8806	聚甲基丙烯酸酯	无
EXE120	聚甲基丙烯酸酯	十八烷基
ECR-1030	聚甲基丙烯酸酯	无
ECR-1090	聚苯乙烯	无

本申请将转氨酶与大孔树脂载体直接通过疏水键、氢键等物理方式结合。

分别对母本 R416T+T7C+S47C 突变体、在母本突变体基础上筛选得到的单点突变体及组合突变体的转氨酶进行物理吸附结合法固定。

制备酶液所用的缓冲液中含有 0.4-1mg/mL 的 PLP、缓冲液 pH 为 7.0-8.0、缓冲盐为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 、Tris-Cl 或硼酸-氢氧化钠。

制备得到的吸附固定化酶可以通过氮气吹干、真空干燥、冷冻干燥等方式进行干燥处理。

本申请将转氨酶以吸附的方式结合至上述载体，活力回收 >80%；在有机溶剂中反应，固定化酶经过滤或注射器吸出液体等方式回收，可重复使用。与第一次使用相比，活力损失 <5% 的范围内统计重复使用次数，对于某些突变体的固定化酶，可重复使用 6 次，活性损失 <5%。

### 2.4 转氨酶的共价固定化方法

酶的共价固定化，是酶蛋白的非必需基团与水不溶性载体通过共价键形成不可逆的连接，在温和的条件下能偶联的蛋白质基团包括：氨基、羧基、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、

酪氨酸的酚基、丝氨酸和苏氨酸的羟基。与载体共价结合的基团，通常不能是酶表现活力所必需的基团。

#### 2.4.1 共价固定化的酶载体

固定化酶载体可以是无机材料的如二氧化硅、玻璃、矿物质及硅藻土等、也可以是天然有机材料、如羧甲基纤维素、右旋糖苷、琼脂糖、果胶、壳聚糖等、还有非天然有机合成聚合物如聚苯乙烯树脂、聚甲基丙烯酸酯树脂、或苯乙烯与甲基丙烯酸酯的共聚物。这些载体还可以进一步官能团化、以利于同蛋白分子的结合、如在载体上加入氨基、羟基、环氧基、十八烷基等官能团。其中氨基和羟基官能团化的载体可以和酶蛋白分子通过离子键结合、氨基型载体还可以与酶蛋白共价结合、环氧基官能团的载体主要和酶蛋白通过共价键相连、十八烷基官能团的载体与酶分子通过疏水作用结合。载体可以采用任何形状或形式、如薄膜、管、片、珠、颗粒、芯片、光纤等。

本申请所用载体为壳聚糖、树脂以及多孔玻璃。

壳聚糖因其生物相容性好、形状可塑性高（可以做成凝胶、薄膜、纤维等形状）、无毒、以及易于被化学修饰等特点、可以作为酶固定化的载体(*Process Biochem*,2005; 40:2833-40)。壳聚糖本身可溶于水、需要先将其制备成水不溶性的载体颗粒、制备方法有溶剂蒸发法、乳化法、以及凝聚法等 (*Macromol Biosci*,2003; 3:511-20)。乳化法制得的载体颗粒较小且均一、通常为首选。壳聚糖分子中有活泼的羟基和氨基等、可将酶通过离子键、氢键和范德华力等作用吸附结合、但吸附作用弱、酶易脱落、常用交联剂甲醛、戊二醛等活化后再与酶共价结合。

本申请所用树脂载体，包括基质以及修饰该基质的官能团，其中，基质包括但不限于聚苯乙烯树脂、聚甲基丙烯酸酯树脂及苯乙烯和甲基丙烯酸酯共聚物。此类基质带有的合适的官能团包括但不限于短链氨基、长链氨基和环氧基。下表 10 所列为适用于本申请中转氨酶固定化的载体。

表 10:

载体名称	基质	官能团
ECR8309	聚甲基丙烯酸酯	短链氨基 (C2)
ECR8409	聚甲基丙烯酸酯	长链氨基 (C6)
ECR8285	聚甲基丙烯酸酯	环氧基

本申请将转氨酶与具有环氧基官能团的树脂直接通过共价键结合、与经戊二醛活化后的具有氨基官能团的树脂通过共价键结合。

#### 2.4.2 共价固定化的方法

本申请分别对母本 R416T+T7C+S47C 突变体、在母本突变体基础上筛选得到的单点突变体及组合突变体的转氨酶进行共价结合法固定。

制备酶液所用的缓冲液中含有 0.4-1mg/mL 的 PLP、缓冲液 pH 为 7.0-8.0、缓冲盐为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 、Tris-Cl 或硼酸-氢氧化钠。本申请所用壳聚糖分子量包括但不限于 300-500 KDa，通过乳化法制备载体，载体经戊二醛活化后，加入酶液，20℃ 孵育 6 h，过滤或离心后收集沉淀，沉淀用缓冲液润洗。

共价固定化至氨基型载体，首先将载体用戊二醛活化，再加入酶液，20℃ 孵育过夜，过滤收集沉淀，沉淀用缓冲液润洗。共价固定化至环氧基型载体，直接将酶液与载体混合，20℃ 孵育过夜，随后静置 20 h，过滤收集沉淀，沉淀用缓冲液润洗。

制备得到的固定化酶可以通过氮气吹干，真空干燥，冷冻干燥等方式进行干燥处理。

本申请将转氨酶以共价结合的方式固定化至上述载体，固定化至壳聚糖载体，活力回收为 50%-60%；固定化至短链氨基型载体，活力回收为 50%-70%；固定化至长链氨基型载体，活力回收为 70%-80%；固定化至环氧基型载体，活力回收为 40%-60%。突变体的固定化酶活性与母本固定化酶比，有明显提高。固定化酶经过滤或注射器吸出液体等方式回收，可重复使用。在与第一次使用相比，活力损失 < 5% 的范围内统计重复使用次数，对于某些固定化至壳聚糖载体的酶，可重复使用 3 次，活性损失 < 5%；固定化至短链氨基型载体，某些酶可以重复使用 5 次；固定化至长链氨基型载体，对于某些突变体的酶，重复使用次数可达 11 次；固定化至环氧基型载体，某些酶可以重复使用 6 次。突变体固定化酶的可重复使用次数比母本固定化酶明显提高。共价固定化后的某些转氨酶，在 100% 有机溶剂中可以发挥催化作用，一些突变体固定化后在有机溶剂中反应，重复使用 3 次，活性损失 < 5%。在 35% 甲醇溶液中发挥催化作用，一些突变体在固定化后，重复使用 5 次，活性损失 < 5%。

## 2.5 金属离子螯合固定化方法

多孔玻璃因其材质惰性、透水性好等特点、非常适用于做酶固定化的基质。玻璃及其孔道表面的硅烷醇基作为结合位点跟酶结合、实现固定化、但是传统玻璃其表面硅烷醇基密度有限而且分布不均、与酶结合位阻大、蛋白负载量低 (*Science*,2010,329,305-309、*JChromatogr*,1976,125,115-127)、而且容易使酶失活。在多孔玻璃内外表面覆盖一层有机聚合物薄膜、可形成更有利于酶固定化的环境 (*Langmuir*,2004,20,10639-10647)。聚合物薄膜可根据需要经进一步修饰、在表面加上适合于固定化的各种官能团。

带有组氨酸标签的蛋白可以经固相金属亲和层析法进行纯化、蛋白中的组氨酸残基可以与螯合在水不溶性基质上的金属离子 ( $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ ) 经螯合作用相连、然后可用含咪唑的缓冲液将目标蛋白洗脱下来 (*Nature*,1975,258,598-599)。基于这项技术、可以将带有组氨酸标签的酶与末端螯合有金属离子的载体特异性螯合、达到固定化的目的、同时这种方法固定化特异性高、杂蛋白几乎不会被固定。

本申请所用的玻璃载体是经聚合物薄膜在多孔玻璃内外表面进行涂层，聚合物薄膜可以是亲水的如丙烯酸聚合物、半亲水的苯乙烯与丙烯腈聚合物和疏水的如氯甲基苯乙烯聚合物。薄膜表面经氨基修饰，再经 2,4-二羟基苯乙酮酰基化，而 2,4-二羟基苯乙酮的羟基再与金属离子螯合，从而通过 2,4-二羟基苯乙酮的手臂作用，一端与载体结合，另一端与金属离子螯合，

使得玻璃载体末端带有金属离子，可以与带有组氨酸标签的蛋白亲和结合，实现特异性固定化 (*ChemicalCommunications*,2014,50(65):9134-7)。螯合的金属离子包括但不限于为  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 。下表 11 所列为适用于本申请中转氨酶固定化的载体。

表 11:

载体名称	性质	金属离子
EziG-101	亲水	$\text{Fe}^{3+}$
EziG-102	半亲水	$\text{Fe}^{3+}$
EziG-103	疏水	$\text{Fe}^{3+}$

本申请分别对母本 R416T+T7C+S47C 突变体、在母本突变体基础上筛选得到的单点突变体及组合突变体的转氨酶进行共价结合法固定。

制备酶液所用的缓冲液中含有 0.4-1mg/mL 的 PLP、缓冲液 pH 为 7.0-8.0、缓冲盐为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、Tris-Cl 或硼酸-氢氧化钠。

共价固定化至多孔玻璃载体，直接将酶液与载体混合，20 °C 孵育 40-60 min，过滤收集沉淀，沉淀用缓冲液润洗。

制备得到的固定化酶可以通过氮气吹干，真空干燥，冷冻干燥等方式进行干燥处理。

本申请将转氨酶以螯合的方式结合至上述载体，活力回收约 70%-80%；固定化酶经过滤或注射器吸出液体等方式回收，可重复使用。在水相溶剂中反应，与第一次使用相比，活力损失 <5% 的范围内统计重复使用次数，对于某些突变体的固定化酶，可重复使用 12 次，活性损失 <5%；有机溶剂中反应，第一次使用相比，活力损失 <5% 的范围内统计重复使用次数，对于某些突变体的固定化酶，可重复使用 8 次。

### 三、固定化转氨酶的使用方法

本申请的固定化转氨酶可将底物 1 和底物 2 所示的氨基受体转化为对应的伯胺，所用的氨基供体为异丙胺。

本申请的固定化转氨酶可以在如下溶剂中应用：100%水溶液、含 20%-50%DMSO 的溶剂、含 35%甲醇的溶剂或 100%的水饱和有机溶剂(比如，可以是 100%水饱和甲基叔丁基醚或 100%水饱和乙酸异丙酯)。

本申请的固定化酶可以应用于搅拌形式的批次反应中，也适用于填充于管道反应器中的连续流反应。

批次搅拌反应操作方式为：将原料即氨基受体、氨基供体、固定化酶、辅酶 PLP 及溶剂一次性加入到反应容器中，通过机械搅拌的方式，反应 16 h 以上。反应结束后，通过过滤的方式将固定化酶回收，应用到下一轮的反应。

连续反应的操作方式为：将固定化酶填充到管式反应器中，将原料即氨基受体、氨基供体及辅酶 PLP 用合适的溶剂完全溶解配制成反应液，用柱塞泵将反应液以合适的流速注入到填充了固定化酶的管式反应器中，出口处用溶剂接收产品溶液。

连续反应操作时，溶剂可以为 35% 的甲醇溶液，或 100% 的水饱和甲叔醚。

下面将结合具体的实施例来进一步说明本申请的有益效果。

实施例一：突变体 30℃，pH9.5，50%DMSO 耐受性检测

将粗酶在 30℃，pH9.5，DMSO 浓度为 50% 的环境下处理 1h，然后在 10mL 的反应瓶中，加入 0.1g 底物 1，并加入 4eq 异丙胺盐酸盐和 0.6-1mgPLP (5'-磷酸吡哆醛)，再加入上述处理后的酶 5mg，在 30℃，pH9.5，DMSO 浓度为 50% 的环境恒温搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率，突变体反应数据如下表 12。

表 12:

突变位点	转化率 (%)	突变位点	转化率 (%)	突变位点	转化率 (%)
母本 R416T+T7C+S47C	67.7	K51R	77.5	T107F	92.3
M356L	80.4	A95P	88.6	T107A	94.4
F364L	80.4	E368P	97.1	G110P	89.2
C404L	78.7	Q346E	92.6	Q380 L	95.5
M430L	76.5	H333K	87.9	K193I	93.5
R405E	95.4	D371G	83.2	I297L	96.4
R405A	85.7	E246A	87.2	R305H	97.1
K90G	73.2	C328A	93.8	F111Y	78.6
K219T	73.9	N412G	80.5	K190E	88.7
K69N	83.9	G201C	86.7	G201C	86.7
K304D	90.9	T402P	84.3	A286T	98.2

实施例二：突变体 45℃，pH10，50%DMSO 耐受性检测

粗酶在 45℃，pH10，DMSO 浓度为 50% 的环境下处理 1h，然后在 10mL 的反应瓶中，加入 0.1g 底物 1，并加入 4eq 异丙胺盐酸盐和 0.6-1mgPLP (5'-磷酸吡哆醛)，再加入经上述处理后的酶 5mg，在 45℃，pH10，DMSO 浓度为 50% 的环境恒温搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率，突变体反应数据如下表 13。

表 13:

突变位点	转化率 (%)	突变位点	转化率 (%)
母本	13.7	R405E+A95P+K304D+Q380L	90.7

R416T+T7C+S47C			
R405E	64.3	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	94
A95P	66.7	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297	97.3
Q380L	83.5	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P	97.4
I297L	87.3	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	89.3
F111Y	46.3	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	90.8
R305H	37.6	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G	64.1
K190E	39.8	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A	59.4
K51R+W187Y	83.1	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P	57.9
R405E+A95P+K304D	92.1	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A	92.2
K69N	30.7	G201C	28.9
A286T	92.5	-/-	-/-

实施例三：突变体 30℃，pH8，35%甲醇耐受性检测

将粗酶在 30℃，pH8，35%MeOH 浓度的环境下处理 1h，然后在 10mL 的反应瓶中，加入 0.1g 底物 1，并加入 4eq 异丙胺盐酸盐和 0.6-1mgPLP (5'-磷酸吡哆醛)，再加入经上述处理后的酶 5mg，继续在 30℃，pH8，35%MeOH 浓度的环境恒温搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率，突变体反应数据如下表 14。

表 14:

突变位点	转化率 (%)	突变位点	转化率 (%)
母本 R416T+T7C+S47C	8.9	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	58.5
Q380L	66.7	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P	91.2
I297L	60.2	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	77.7
F111Y	28.6	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	78.2
R305H	53.1	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A	78.6
K190E	44.8	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A	83.4
K193I	60.4	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	97
R405E+A95P+K304D	86	A95P+R405E+K304D+Q380L+K90G+I297L+E368P+T107A	96
K69N	34.5	G201C	35.1
A286T	64.3	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107	70.9

		A + A286T	
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N	61.9	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	64.3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G	40.4	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P	34.5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G	27.8	-/-	-/-

#### 实施例四：突变体 45℃, pH8, 40%甲醇耐受性检测

将粗酶在 45℃, pH8, 40%MeOH 浓度的环境下处理 1h, 然后在 10mL 的反应瓶中, 加入 0.1g 底物 1, 并加入 4eq 异丙胺盐酸盐和 0.6-1mgPLP (5'-磷酸吡哆醛), 再加入经上述处理后的酶 5mg, 继续在 45℃, pH8, 40%MeOH 浓度的环境恒温搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率, 突变体反应数据如下表 15。

表 15:

突变位点	转化率 (%)	突变位点	转化率 (%)
母本 R416T+T7C+S47C	2.9	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+A286T	96.5%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297	98.2%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P	98%
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N	86.7	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	87.8
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	96%	R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	89.8

#### 实施例五：交联固定化

0.1g 酶粉用 2mL 磷酸缓冲液 (0.1MPB, pH7.0-8.0, 含 0.4-1mg/mL PLP(5'-磷酸吡哆醛)) 溶解, 冰水浴搅拌下缓慢加入 18mL 乙醇, 或 18mL 异丙醇, 或硫酸铵 (终饱和度 90%) 作为沉淀剂, 加毕, 搅拌 10min 后, 再加入 1.1~2.7mL25%戊二醛溶液 (终浓度 200-500mM), 冰水浴搅拌 30-40min 后离心或过滤, 沉淀用磷酸缓冲液洗 3 次后, 4℃ 保存, 可直接应用于水相反应。或将交联酶聚集体冻干, 冻干后得到的交联酶聚集体冻干粉可在水相和有机相反应中应用。

#### 实施例六：交联酶聚集体水相反应验活

在 10mL 的反应瓶中, 加入 0.3mLDMSO, 溶解 0.1g 底物 1, 并加入 4eq 异丙胺盐酸盐和 1.0mgPLP (5'-磷酸吡哆醛), 补加 0.1MPB7.0 至反应液终体积为 1mL, 再加入 5mg 酶或由 5mg 酶制备的交联酶聚集体湿酶或交联酶聚集体冻干粉, 在 45℃ 搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率, 反应数据如下表 16。

表 16:

菌株编号	固定化形式	转化率 (%)	活力损失<5%的重
------	-------	---------	-----------

			复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	无	98.2%	1
	交联酶湿酶	92.3%	3
	交联酶冻干粉	86.2%	1
A95P	无	97.8%	1
	交联湿酶	98.2%	6
	交联酶冻干粉	92.7%	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	无	98.6%	1
	交联湿酶	97.9%	10
	交联酶冻干粉	97.3%	8
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	无	98.5%	1
	交联湿酶	98.3%	14
	交联酶冻干粉	98.5%	13
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	交联湿酶	98.3%	13
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T	交联湿酶	98.5%	14
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N	交联湿酶	98.0%	12
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	交联湿酶	98.3%	12
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P	交联湿酶	98.4%	11
K51R+W187Y	交联湿酶	98.2%	9
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	交联湿酶	98.5%	10
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A	交联湿酶	98.4%	10

#### 实施例七：交联酶有机相反应实验活

10mL 的反应瓶中，加入 1mL 水饱和甲基叔丁基醚，再加入 10mg 底物 1 及 4eq 异丙胺，然后加入由 10mg 酶粉制备的交联酶聚集体冻干粉，30℃ 搅拌 16h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 17。

表 17:

菌株编号	固定化形式	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	交联酶冻干粉	87.9%	1
A95P	交联酶冻干粉	90.3%	3

R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	交联酶冻干粉	90.6%	3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	交联酶冻干粉	94.7%	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	交联酶冻干粉	92.1%	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	交联酶冻干粉	90.9%	4

#### 实施例八：转氨酶包埋-交联固定化酶水相反应实验活

在 10 mL 的反应瓶中，加入 0.4 mL DMSO（DMSO 终浓度为 40%），溶解 0.1 g 底物 1，并加入 4 eq 异丙胺盐酸盐和 1.0 mg PLP（5'-磷酸吡哆醛），补加 0.1 M PB 7.0 至反应液终体积为 1 mL，再加入 5 mg 酶或由 5 mg 酶制备的包埋-交联固定化酶，在 45 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 18。

表 18:

突变位点	固定化形式	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	无	93.9	1
	包埋-交联固定化酶	54.9	8
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	无	97.8	1
	共价固定化酶	76.4	11
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	无	98.1	1
	包埋-交联固定化酶	98.0	11
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	无	97.5	1
	包埋-交联固定化酶	98.0	10
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	无	97.9	1
	共价固定化酶	97.6	18

#### 实施例九：转氨酶包埋-交联固定化酶 35% 甲醇水溶液中反应实验活

在 10 mL 的反应瓶中，加入 0.35 mL 甲醇（甲醇终浓度为 40%），溶解 0.1 g 底物 1，并加入 4 eq 异丙胺盐酸盐和 1.0 mg PLP（5'-磷酸吡哆醛），补加 0.1 M PB 7.0 至反应液终体积为 1 mL，再加入 10 mg 酶或由 10 mg 酶制备的包埋-交联固定化酶，在 30 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 19。

表 19:

突变位点	固定化形式	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	无	60.6	1
	包埋-交联固定化酶	54.9	6

R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	无	98.3	1
	共价固定化酶	76.4	9
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	无	98.5	1
	共价固定化酶	97.6	12

实施例十：转氨酶吸附固定化方法

向载体中入 4mL 含 0.4mg/mLPLP 的 PB 缓冲液(100mM, pH7.0), 同时加入 0.1g 酶, 20℃, 80 rpm 低速搅拌过夜。去上清, 沉淀用缓冲液清洗 3-4 遍, 去上清, 沉淀用氮气吹干, 或冷冻干燥法干燥, 4℃ 保存。

实施例十一：转氨酶吸附固定化酶有机相反应实验

在 10 mL 的反应瓶中, 加入 1 mL 水饱和甲基叔丁基醚, 再加入 10 mg 底物 1 及 4 eq 异丙胺, 然后加入由 20 mg 酶制备的固定化转氨酶, 30 ℃ 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率, 反应数据如下表 20。

表 20:

突变位点	固定化形式	载体	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	吸附固定化酶	Diaion HP2MG	64.3	2
		X17S0401	57.2	2
		EXE120	53.9	2
		ECR8806	60.2	3
		ECR1030	49.2	2
		ECR1090	43.8	1
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	吸附固定化酶	Diaion HP2MG	91.4	4
		X17S0401	89.2	4
		EXE120	90.7	4
		ECR8806	94.8	6
		ECR1030	79.9	3
		ECR1090	72.4	3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	吸附固定化酶	ECR8806	92.4	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E	吸附固定化酶	ECR8806	94.7	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G	吸附固定化酶	ECR8806	82.8	3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	吸附固定化酶	ECR8806	96.8	6

R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	吸附固定化酶	ECR8806	76.3	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	吸附固定化酶	ECR8806	81.5	5

#### 实施例十二：壳聚糖为载体固定化转氨酶

壳聚糖载体制备：5g 壳聚糖（分子量 300KDa-500KDa）加入到 250mL 1%乙酸溶液中，微波炉加热溶解，制得水相。300mL 甲苯与 2.2g 司盘 80，1.2mL 正己醇混匀，室温搅拌 2h，制得油相。将水相在搅拌下缓慢滴加至油相中，制得乳剂，再将乳剂倒入至 1.5L 12%NaOH 溶液中，搅拌 3h，加入 1L 乙醇，过滤，用纯化水彻底清洗滤饼，得到约 40g 湿载体，将湿载体浸泡在 140mL 纯水中，4℃ 保存。

活化载体：每毫升湿载体，加入 1.1mL 25%戊二醛（戊二醛终浓度 2.5%）。

固定化：向活化好的载体中加入 0.2g 酶，20-25℃ 搅拌 6h，清洗载体，离心，去上清，沉淀即为固定化酶，4℃ 保存。

#### 实施例十三：C6 型氨基型载体固定化转氨酶

活化载体：1g 载体 ECR8409 用 20mM 低离子强度的缓冲液清洗 1-2 遍，除去上清液，加入 4mL 2%戊二醛（由 20mM 低离子强度的缓冲液稀释试剂级 25%戊二醛配制），20℃，80rpm 活化 1h，用 20mM 的缓冲液清洗 1-2 遍，去上清。

固定化：向活化好的载体中入 4mL 含 0.4mg/mL LPLP 的 PB 缓冲液(20mM, pH7.0)，同时加入 0.1~0.2g 酶，20℃，80rpm 低速搅拌过夜。去上清，沉淀用缓冲液清洗 3-4 遍，去上清，沉淀用氮气吹干，或冷冻干燥法干燥，4℃ 保存。

#### 实施例十四：环氧基型载体固定化转氨酶

1g 载体 ECR8285 用 100 mM PB 缓冲液清洗 1-2 遍，除去清液，加入 4 mL Buffer（100 mM PB, pH7.0, 含 1 M NaCl），同时加入 0.1 g~0.2 g 酶，20℃，80 rpm 低速搅拌过夜（18-20 h），再于 4℃ 静置 20 h。去上清，沉淀用 Buffer 清洗 3-4 遍，用氮气吹干，4℃ 保存

#### 实施例十五：共价固定化转氨酶水相反应实验

在 10 mL 的反应瓶中，加入 0.4 mL DMSO（DMSO 终浓度为 40%），溶解 0.1 g 底物 1，并加入 4 eq 异丙胺盐酸盐和 1.0 mg PLP（5'-磷酸吡哆醛），补加 0.1 M PB 7.0 至反应液终体积为 1 mL，再加入 5 mg 酶或由 5 mg 酶制备的固定化转氨酶，在 45℃ 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 21。

表 21:

突变位点	固定化形式	载体	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数

母本 R416T+T7C+S47C	无	无	60.6	1
	共价固定化酶	壳聚糖	36.1	3
		ECR8309	32.8	2
		ECR8409	41.5	3
		ECR8285	31.7	2
A95P	无	无	97.8	1
	共价固定化酶	壳聚糖	65.2	3
		ECR8309	63.7	5
		ECR8409	78.4	6
		ECR8285	57.2	4
R405E+K90G+A95P+K304 D+Q380L	无	无	98.3	1
	共价固定化酶	壳聚糖	76.4	4
		ECR8309	72.1	5
		ECR8409	88.6	11
		ECR8285	69.2	6
R405E+K90G+A95P+K304 D+Q380L+I297L	无	无	98.5	1
	共价固定化酶	ECR8409	97.6	12
Q380L	无	无	97.8	1
	共价固定化酶	ECR8409	87.6	7
R405E	无	无	97.1	1
	共价固定化酶	ECR8409	89.5	6
K51R+W187Y	无	无	96.8	1
	共价固定化酶	ECR8409	83.3	6
R405E+A95P+K304D	无	无	97.6	1
	共价固定化酶	ECR8409	88.9	8
R405E+K90G+A95P+K304 D+Q380L+E368P	无	无	98.1	1
	共价固定化酶	ECR8409	90.3	11

实施例十六：共价固定化转氨酶 35%甲醇水溶液中反应实验活

在 10 mL 的反应瓶中，加入 0.35 mL 甲醇（甲醇终浓度为 40%），溶解 0.1 g 底物 1，并加入 4 eq 异丙胺盐酸盐和 1.0 mg PLP（5'-磷酸吡哆醛），补加 0.1 M PB 7.0 至反应液终体积为 1 mL，再加入 10 mg 酶或由 10 mg 酶制备的固定化转氨酶，在 30 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 22。

表 22:

菌株编号	固定化形式	载体	转化率 (%)	活力损失<5%的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	无	无	30.1	1
	共价固定化酶	ECR8409	23.7	2
		ECR8285	17.6	2
A95P	无	无	67.3	1
	共价固定化酶	ECR8409	47.7	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	无	无	83.7	1
	共价固定化酶	ECR8409	64.8	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	无	无	97.5	1
	共价固定化酶	ECR8409	92.3	5
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K	无	无	95.9	1
	共价固定化酶	ECR8409	90.8	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A	无	无	96.7	1
	共价固定化酶	ECR8409	93.1	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T	无	无	97.1	1
	共价固定化酶	ECR8409	93.3	5

#### 实施例十七：共价固定化转氨酶有机相反应验证

在 10 mL 的反应瓶中，加入 1 mL 水饱和乙酸异丙酯，再加入 10 mg 底物 1 及 4 eq 异丙胺，然后加入 20 mg 酶或由 20 mg 酶制备的固定化转氨酶，30 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率，反应数据如下表 23。

表 23:

菌株编号	固定化形式	载体	转化率 (%)	活力损失<5%的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	共价固定化酶	ECR8409	42.2	3
		ECR8285	23.7	2
A95P	共价固定化酶	ECR8409	55.1	3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	共价固定化酶	ECR8409	72.3	3
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	共价固定化酶	ECR8409	94.5	3

#### 实施例十八：共价固定化酶转氨酶填充床连续反应（以甲醇作为底物的助溶剂）

75 g 突变体 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L 固定化至 ECR8409 载体的固定化酶填充至反应器中，柱体积(CV)150 mL，用柱塞泵将 2 CV 缓冲液(0.1 M 的 PB7.0, 含 5 mg/mL PLP, 2 M 异丙胺盐酸盐)注入填充床中。将配制的反应液(0.5 M 底物 1, 2 M 异丙胺盐酸

盐, 5 mg/mL PLP, 35% MeOH) 用柱塞泵注入填充床, 40 °C 水浴, 流速 0.25 mL/min, 保留时间约 600 min, 转化率 > 98%, 连续操作 240 h, 转化率无降低。

#### 实施例十九: 玻璃载体整合固定化转氨酶

1 g EziG-101、EziG-101 或 EziG-103 多孔玻璃载体用缓冲液 (20 mM Tris-Cl 8.5) 清洗 1-2 遍, 除去上清, 向载体中加入 20 mL Buffer, 同时加入酶粉或酶液, 20 °C, 80 rpm 低速搅拌 1h, 去上清, 沉淀用 Buffer 清洗 3-4 遍, 过滤, 真空干燥, 4 °C 保存。

#### 实施例二十: EziG-101 多孔玻璃载体整合固定化转氨酶水相反应实验

在 10 mL 的反应瓶中, 加入 0.2 mL DMSO, 溶解 0.1 g 底物 1, 并加入 4 eq 异丙胺盐酸盐和 0.5 mg PLP (5'-磷酸吡哆醛), 补加 0.1 M PB 7.0 至反应液终体积为 1 mL, 再加入 0.1 g 酶粉或由 0.1 g 酶粉经 EziG-101 载体整合法制备的固定化酶, 在 45 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率, 反应数据如下表 24。

表 24:

突变体	固定化形式	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
母本 R416T+T7C+S47C	无	98.7	1
	整合固定化酶	98.2	4
A95P	无	98.5	1
	整合固定化酶	98.6	7
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L	无	98.4	1
	整合固定化酶	98.2	11
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	无	98.5	1
	整合固定化酶	98.2	12
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C	无	98.2	1
	整合固定化酶	98.0	12
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T	无	98.2	1
	整合固定化酶	98.2	12

#### 实施例二十一: 多孔玻璃载体整合固定化转氨酶有机相反应实验

在 10 mL 的反应瓶中, 加入 1 mL 水饱和甲基叔丁基醚, 再加入 10 mg 底物 1 及 4 eq 异丙胺, 然后加入 20 mg 酶或由 20 mg 酶制备的固定化转氨酶, 30 °C 搅拌 16 h。体系经 HPLC 检测转化率, 反应数据如下表 25。

表 25:

突变位点	固定化形式	载体	转化率 (%)	活力损失 < 5% 的重复使用次数
------	-------	----	---------	-------------------

母本 R416T+T7C+S47C	螯合固定化酶	EziG-101	69.8	4
		EziG-102	59.9	3
		EziG-103	68.1	4
R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L	螯合固定化酶	EziG-101	92.4	6
		EziG-102	89.2	6
		EziG-103	91.6	8

从以上实施例可以看出，本申请通过定向进化筛选得到的活性、稳定性、对温度、pH 及有机溶剂耐受性提高的突变体，不仅降低生产应用中的用酶量，而且大大提高了制备成各种固定化酶的可能性。而且，本申请通过上述定向进化后的转氨酶进行固定化（自身交联或与载体共价结合），实现固定化转氨酶在水相反应和有机相反应的应用，使酶与反应体系易于分离，并减少反应后处理过程中因残留酶蛋白而造成的乳化现象，同时固定化转氨酶突变体能够耐受各种极端环境，活性损失小，重复利用次数高，从而实现了底物 1 和底物 2 的连续化转氨反应。

以上所述仅为本申请的优选实施例而已、并不用于限制本申请、对于本领域的技术人员来说、本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内、所作的任何修改、等同替换、改进等、均应包含在本申请的保护范围之内。

## 权利要求书

1. 一种转氨酶突变体，其特征在于，所述转氨酶突变体具有 SEQ ID NO: 1 所示序列发生氨基酸突变的序列，所述发生氨基酸突变的位点包括 T7C+S47C 位点。
2. 根据权利要求 1 所述的转氨酶突变体，其特征在于，所述发生氨基酸突变的位点还包括如下任意一个或多个：M356L、F364L、C404L、M430L、R405E/A、K90G、K219T、K304D、K51R、A95P、E368P、Q346E、H333K、D371G、E246A、C328A、N412G、T402P、T107F/A、G110P、K69N、G201C、Q380L、K193I、I297L、R305H、F111Y、K190E 以及 A286T，其中“/”表示“或”。
3. 根据权利要求 1 所述的转氨酶突变体，其特征在于，所述发生氨基酸突变的位点还包括如下任一种组合突变位点：K51R+W187Y、R405E+A95P、R405E+A95P+K304D、R405E+A95P+K304D+Q380L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+D371G、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E246A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T402P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107F、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+G110P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+A286T、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N、R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C 及 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T。
4. 一种 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子编码权利要求 1 至 3 中任一项所述的转氨酶突变体。
5. 一种重组质粒，其特征在于，所述重组质粒连接有权利要求 4 所述的 DNA 分子。
6. 一种固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶包括权利要求 1 至 3 中任一项所述的转氨酶突变体。
7. 根据权利要求 6 所述的固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶为所述转氨酶突变体的转氨酶交联酶聚集体；

优选地，所述转氨酶突变体经沉淀得到转氨酶聚集体，所述转氨酶聚集体中游离的氨基、酚基、咪唑基或巯基通过与交联剂交联得到所述转氨酶交联酶聚集体，其中，所述交联剂选自戊二醛、N, N-亚甲基双丙烯酰胺、双马来酰亚胺及右旋糖苷中的任意一种；

优选地，所述转氨酶交联酶聚集体为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的交联酶聚集体：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A + A286T、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+K69N、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P、T7C+S47C+K51R+W187Y、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+C328A 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L；

优选地，所述右旋糖苷的分子量为 6 KDa~200 KDa；

优选地，所述转氨酶突变体经乙醇沉淀得到所述转氨酶聚集体；

优选地，所述转氨酶聚集体中游离的氨基与戊二醛交联得到所述转氨酶交联酶聚集体。

8. 根据权利要求 6 所述的固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶为转氨酶包埋-交联固定化酶；

优选地，所述转氨酶包埋-交联固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的包埋-交联固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A、T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E 及 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L；

优选地，所述转氨酶突变体中游离氨基与戊二醛形成席夫碱交联得到转氨酶交联酶，所述转氨酶交联酶包埋至聚丙烯酰胺凝胶网格中得到所述转氨酶包埋-交联固定化酶。

9. 根据权利要求 6 所述的固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶为所述转氨酶突变体与载体共价连接的共价固定化酶；

优选地，所述共价固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的共价固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、T7C+S47C+Q380L、T7C+S47C+R405E、T7C+S47C+K51R+W187Y、T7C+S47C+

R405E+A95P+K304D 、 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+E368P 、  
 T7C+S47C+ R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L 、 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L 、  
 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K 、 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A 及 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T;

优选地，所述载体为壳聚糖载体或树脂载体；

更优选地，所述壳聚糖载体通过羟基和/或氨基与所述转氨酶突变体共价结合形成所述共价固定化酶；

更优选地，所述树脂载体包括基质及与所述基质连接的官能团，所述基质选自苯乙烯和甲基丙烯酸酯共聚物、聚苯乙烯树脂以及聚甲基丙烯酸酯树脂中的任意一种，与所述基质连接的官能团选自 C2 短链氨基、C4 中链氨基、C6 长链氨基或环氧基；进一步优选地，所述树脂载体选自 ECR8309、ECR8315、EC-HFA、LX-1000HA、LX-1000EA、ECR8409、ECR8415、EC-EP、EC EP403、EXE119、LX-1000EP、Immobead-150A、Immobead-150P、Immobead350A、ECR8206、ECR8209、ECR8215 或 ECR8285。

10. 根据权利要求 6 所述的固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶为所述转氨酶突变体与载体经金属离子螯合而成的螯合固定化酶；

优选地，所述螯合固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的螯合固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、  
 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L 、 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L 、 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C 及 T7C+S47C+  
 R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T；

优选地，所述载体为多孔玻璃载体；

进一步优选地，所述多孔玻璃载体为 EziG-101、EziG-102 或 EziG-103。

11. 根据权利要求 6 所述的固定化转氨酶，其特征在于，所述固定化转氨酶为所述转氨酶突变体与载体经物理吸附结合的吸附固定化酶；

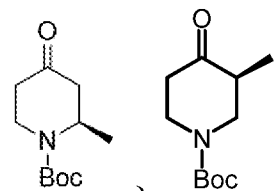
优选地，所述吸附固定化酶为在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列基础上含有如下氨基酸突变位点的转氨酶突变体的吸附固定化酶：T7C+S47C、T7C+S47C+A95P、  
 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L、  
 T7C+S47C+ R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+H333K、  
 T7C+S47C+ R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+Q346E、  
 T7C+S47C+ R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+N412G、

T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A  
 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+A286T  
 T7C+S47C+R405E+K90G+A95P+K304D+Q380L+I297L+E368P+T107A+G201C;

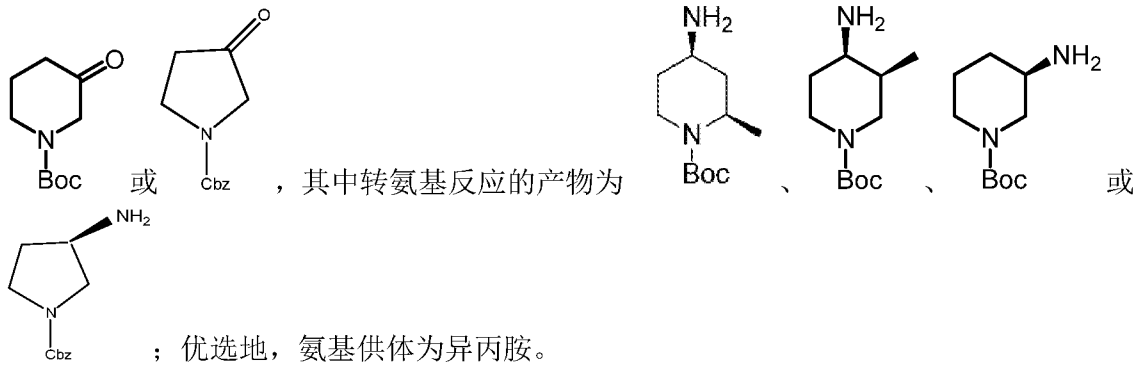
优选地，所述载体为树脂载体；

更优选地，所述树脂载体包括基质及与所述基质连接的官能团，所述基质选自苯乙烯和甲基丙烯酸酯共聚物、聚苯乙烯树脂以及聚甲基丙烯酸酯树脂中的任意一种，与所述基质连接的官能团为十八烷基；进一步优选地，所述树脂载体选自 ECR8806、ECR1030、ECR1090、ECR1061、ECR1091、ECR8804、Immobead-EC1、Immobead-S60S、Immobead-S861、X17S0409、EXE120 或 Diaion HP2MG。

12. 一种生产手性胺的方法，包括采用转氨酶对酮类化合物及氨基供体进行催化转氨基反应的步骤，其特征在于，所述转氨酶为权利要求 1 至 3 中任一项所述的转氨酶突变体或权利要求 6 至 11 中任一项所述的固定化转氨酶。
13. 根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述转氨酶为权利要求 1 至 3 中任一项所述的转氨酶突变体，所述方法为批次反应；优选所述批次反应的反应体系为水相反应体系。
14. 根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述转氨酶为权利要求 6 至 11 中任一项所述的固定化转氨酶，所述方法为连续化反应；优选所述连续化反应的反应体系为有机相反应体系。
15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的方法，其特征在于，所述酮类化合物为  $R_1-C(=O)-R_2$ ，其中， $R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 C1~C8 烷基、C5~C10 环烷基、C6~C10 芳基或 C5~C10 杂芳基，或者  $R_1$  和  $R_2$  与羰基上的碳共同形成 C5~C10 杂环基、C5~C10 碳环基或 C5~C10 杂芳基，所述 C5~C10 杂环基和 C5~C10 杂芳基中的杂原子各自独立地选自氮、氧和硫中的至少一种，所述 C6~C10 芳基中的芳基、C5~C10 杂芳基中的杂芳基、C5~C10 碳环基中的碳环基或 C5~C10 杂环基中的杂环基各自独立地未被取代或被卤素、烷氧基



或烷基中的至少一个基团所取代，优选地，所述酮类化合物为



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/075272

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 14/195(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 41/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; TWABS; HKABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; WANFANG DATABASE; WEB OF KNOWLEDGE; 转氨酶, 突变体, 紫色杆菌, 青紫色杆菌, transaminase, aminotransferase, omega-transaminase, aspartate aminotransferase, mutant, Chromobacterium violaceum; 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL; 关于SEQ ID NO:1的序列检索, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System+GenBank+EMBL; sequence search on SEQ ID NO. 1.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016298092 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 13 October 2016 (2016-10-13) see entire document	1-12
A	Karim Engelmark Cassimjee et al. "Chromobacterium Violaceum ω-transaminase Variant Trp60Cys Shows Increased Specificity for (S)-1-phenylethylamine and 4'-substituted Acetophenones, and Follows Swain-Lupton Parameterisation" <i>Organic &amp; Biomolecular Chemistry</i> , Vol. 10, 31 December 2012 (2012-12-31), ISSN: 1477-0520, pp. 5466-5470, see entire document	1-12
A	CN 104894148 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 September 2015 (2015-09-09) see entire document	1-12
A	CN 106676142 A (ASYMCHEM PHARMACEUTICALS (TIANJIN) CO., LTD. ET AL.) 17 May 2017 (2017-05-17) see entire document	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2018

Date of mailing of the international search report

07 November 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing  
100088  
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2018/075272**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102341494 A (CODEXIS INC.) 01 February 2012 (2012-02-01) see entire document	1-12
<hr/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/075272

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/075272**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2016298092	A1	13 October 2016	EP	3085776	A1	26 October 2016
				KR	101869432	B1	20 June 2018
				KR	20160120673	A	18 October 2016
-----							
CN	104894148	A	09 September 2015	None			
-----							
CN	106676142	A	17 May 2017	None			
-----							
CN	102341494	A	01 February 2012	EP	2385983	A2	16 November 2011
				IL	249285	A	28 September 2017
				US	2010209981	A1	19 August 2010
				EP	2385983	A4	24 July 2013
				US	8470564	B2	25 June 2013
				WO	2010081053	A3	20 January 2011
				US	2017073651	A1	16 March 2017
				US	2013266994	A1	10 October 2013
				US	2015210988	A1	30 July 2015
				US	9512410	B2	06 December 2016
				SG	172891	A1	29 August 2011
				US	2018201911	A1	19 July 2018
				WO	2010081053	A2	15 July 2010
				EP	2385983	B1	20 December 2017
				IL	213950	A	29 December 2016
				DK	2385983	T3	12 February 2018
				IL	213950	D0	31 August 2011
				IL	249285	D0	31 January 2017
				HU	E036104	T2	28 June 2018
				US	9944909	B2	17 April 2018
US	9029106	B2	12 May 2015				
EP	3354727	A1	01 August 2018				
CN	102341494	B	15 October 2014				
-----							

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/075272

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 14/195(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 41/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRSABS; TWABS; HKABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库; WEB OF KNOWLEDGE; 转氨酶, 突变体, 紫色杆菌, 青紫色杆菌, transaminase, aminotransferase, omega-transaminase, aspartate aminotransferase, mutant, Chromobacterium violaceum; 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL: 关于SEQ ID NO:1的序列检索。</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2016298092 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOP FOUND YONSEI UNIV) 2016年 10月 13日 (2016 - 10 - 13) 参见全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Karim Engelmark Cassimjee等. "Chromobacterium violaceum ω-transaminase variant Trp60Cys shows increased specificity for (S)-1-phenylethylamine and 4'-substituted acetophenones, and follows Swain-Lupton parameterisation" Organic &amp; Biomolecular Chemistry, 第10卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: 1477-0520, 第5466-5470页, 参见全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104894148 A (浙江科技学院) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 参见全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106676142 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司等) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	US 2016298092 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOP FOUND YONSEI UNIV) 2016年 10月 13日 (2016 - 10 - 13) 参见全文	1-12	A	Karim Engelmark Cassimjee等. "Chromobacterium violaceum ω-transaminase variant Trp60Cys shows increased specificity for (S)-1-phenylethylamine and 4'-substituted acetophenones, and follows Swain-Lupton parameterisation" Organic & Biomolecular Chemistry, 第10卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: 1477-0520, 第5466-5470页, 参见全文	1-12	A	CN 104894148 A (浙江科技学院) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 参见全文	1-12	A	CN 106676142 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司等) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文	1-12
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	US 2016298092 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOP FOUND YONSEI UNIV) 2016年 10月 13日 (2016 - 10 - 13) 参见全文	1-12															
A	Karim Engelmark Cassimjee等. "Chromobacterium violaceum ω-transaminase variant Trp60Cys shows increased specificity for (S)-1-phenylethylamine and 4'-substituted acetophenones, and follows Swain-Lupton parameterisation" Organic & Biomolecular Chemistry, 第10卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: 1477-0520, 第5466-5470页, 参见全文	1-12															
A	CN 104894148 A (浙江科技学院) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 参见全文	1-12															
A	CN 106676142 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司等) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文	1-12															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 10月 30日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 11月 7日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>王慧梅</p> <p>电话号码 62416241</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102341494 A (科德克希思公司) 2012年 2月 1日 (2012 - 02 - 01) 参见全文	1-12

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a.  作为国际申请的一部分提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式  
 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))  
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/075272

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2016298092	A1	2016年 10月 13日	EP	3085776	A1	2016年 10月 26日
				KR	101869432	B1	2018年 6月 20日
				KR	20160120673	A	2016年 10月 18日
-----							
CN	104894148	A	2015年 9月 9日	无			
-----							
CN	106676142	A	2017年 5月 17日	无			
-----							
CN	102341494	A	2012年 2月 1日	EP	2385983	A2	2011年 11月 16日
				IL	249285	A	2017年 9月 28日
				US	2010209981	A1	2010年 8月 19日
				EP	2385983	A4	2013年 7月 24日
				US	8470564	B2	2013年 6月 25日
				WO	2010081053	A3	2011年 1月 20日
				US	2017073651	A1	2017年 3月 16日
				US	2013266994	A1	2013年 10月 10日
				US	2015210988	A1	2015年 7月 30日
				US	9512410	B2	2016年 12月 6日
				SG	172891	A1	2011年 8月 29日
				US	2018201911	A1	2018年 7月 19日
				WO	2010081053	A2	2010年 7月 15日
				EP	2385983	B1	2017年 12月 20日
				IL	213950	A	2016年 12月 29日
				DK	2385983	T3	2018年 2月 12日
				IL	213950	D0	2011年 8月 31日
				IL	249285	D0	2017年 1月 31日
				HU	E036104	T2	2018年 6月 28日
				US	9944909	B2	2018年 4月 17日
				US	9029106	B2	2015年 5月 12日
				EP	3354727	A1	2018年 8月 1日
				CN	102341494	B	2014年 10月 15日
-----							

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)