[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/55
C12N 11/08 C12N 9/80
C12P 41/00 C12P 13/04

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00810510.3

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1175108C

[22] 申请日 2000.6.17 [21] 申请号 00810510.3
[30] 优先权
[32] 1999.7.20 [33] DE [31] 19933362.9
[86] 国际申请 PCT/EP2000/005586 2000.6.17
[87] 国际公布 WO2001/005982 德 2001.1.25
[85] 进入国家阶段日期 2002.1.17
[71] 专利权人 阿温提斯作物科学有限公司
地址 德国法兰克福
[72] 发明人 K·巴奇
审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 利用分离的重组酶通过酶促拆分由其外消旋 N－乙酰－D,L－衍生物制备 L－氨基酸的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种由其外消旋的 N－乙酰－D，L－衍生物制备蛋白原的或非蛋白原的 L－氨基酸，特别是 L－膦丝菌素的方法。该方法的特征在于：(a)利用分离的重组酶通过酶促拆分选择性地脱去相应的 L－氨基酸的 N－乙酰－L－衍生物的乙酰基，而相应的 D－氨基酸的 N－乙酰－D－衍生物的乙酰基则不被脱去，和(b)从未脱去乙酰基的 N－乙酰－D－衍生物和/或不完全脱去乙酰基的 N－乙酰－L－衍生物中分离制得的脱去乙酰基的 L－氨基酸。

ISSN1008-4274

1. 一种由其外消旋的 N-乙酰-D，L-衍生物制备蛋白原的或非蛋白原的 L-氨基酸的方法，该方法包括:

（a）使用浓度为 50mM 至 1500mM 的外消旋的 N-乙酰-D，L 衍生物，

（b）利用分离的重组马尿酸水解酶通过酶促拆分选择性地脱去相应的 L-氨基酸的 N-乙酰-L 衍生物的乙酰基，而相应的 D-氨基酸的 N-乙酰-D 衍生物的乙酰基则不被脱去，和

（c）从未脱去乙酰基的 N-乙酰-D-衍生物和/或不完全脱去乙酰基的 N-乙酰-L 衍生物中分离制得的脱去乙酰基的 L-氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其用于由外消旋的 N-乙酰-D，L-膦丝菌素制备 L-膦丝菌素（L-PPT）。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其用于由其相应的 N-乙酰-D，L 衍生物制备 L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸。

4. 如权利要求 1 至 3 中的任意一项权利要求所述的方法，其中利用来源于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或来源于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物对映体选择性地制备一种或多种 L-氨基酸。

5. 如权利要求 1 至 3 中的任意一项权利要求所述的方法，其中利用来源于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或来源于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物对映体选择性地制备 L-膦丝菌素，L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸。

6. 如权利要求 1 至 3 中的任意一项权利要求所述的方法，其中制备的重组马尿酸水解酶以固定化的形式被使用。

7. 一种或多种马尿酸水解酶在由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物对映体选择性地制备一种或多种 L-氨基酸中的用途。

8．一种或多种马尿酸水解酶在由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍

生物对映体选择性地制备 L-膦丝菌素，L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸中的用途。

9. 来源于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或来源于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶在由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物对映体选择性地制备一种或多种 L-氨基酸中的用途。

10. 来源于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或来源于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶在由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物对映体选择性地制备 L-膦丝菌素，L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸中的用途。

利用分离的重组酶通过酶促拆分由其外消旋 N-乙酰-D,L-衍生物制备 L-氨基酸的方法

背景技术

以前只记载了通过用来源于大肠杆菌的青霉素 G 酰基转移酶裂解苯乙酰膦丝菌素以高纯度和高产率来拆分制备非蛋白原的氨基酸 L-PPT(L-膦丝菌素)(DE-A-3048612)。然而，苯乙酰-PPT 的合成比 N-Ac-PPT 的合成更复杂、成本更高。但是，青霉素 G 酰基转移酶对脂族酰基不具有特异性，因而对 N-Ac-PPT 也不具有特异性。其它已知的酰基转移酶对 N-Ac-PPT 同样不具有或只具有很低的底物特异性，并且以前只被用于不需要酶纯化的微生物的生物转化中(例如，DE-A-2939269 中所描述的)。由于这个原因，只能获得很低的空间/时间产率。专利申请 EP-A-0382113 公开了利用酰基转移酶 1 对 N-Ac-PPT 羧酸酯进行的 L-特异性裂解。然而，这种酶甚至对游离羧酸也不具有特异性因而在底物的制备过程中需要一个作为附加合成步骤的酯化步骤。

专利申请 DE-A-19652284 记载了从土壤样品中特异性分离对 N-乙酰氨基酸，优选的是对 N-乙酰膦丝菌素(N-Ac-PPT)具有特异性的微生物脱乙酰酶，以及来源于寡养单胞菌属某种和食酸丛毛单胞菌的相应基因的克隆。

基于发现的序列同源性和进行的底物特异性试验，所述脱乙酰酶可能属于马尿酸水解酶类(EC3.5.1.32),它的天然底物是 N-苯甲酰甘氨酸，一种具有芳族 N-酰基功能的氨基酸衍生物。因此有趣的是这些酶也能接受 N-乙酰化氨基酸，特别是 N-乙酰膦丝菌素作为底物，这些底物是具有脂族 N-酰基功能的氨基酸衍生物。专利申请 DE-A-2939269 和 DE-A-2717440 公开了外消旋膦丝菌素的除草作用只来源于它的 L-对映体(L-PPT)。

在这点上，有趣的是发现的脱乙酰酶只高特异性地裂解 N-乙酰-PPT 和某些蛋白原性氨基酸的 N-乙酰衍生物的 L-对映体。例如，象专利申请

EP-A-0304021，DE-A-2939269 和 DE-A-3048612 中所记载的，这些酶因而非常适用于根据拆分原理由其外消旋 N-乙酰衍生物制备 L-氨基酸，尤其是具有除草活性的化合物 L-膦丝菌素。然而上述三个专利申请中的方法的明显不足在于(1)只能采用低的底物浓度(在专利申请 DE-A-2939269 中大约为 0.5%)，鉴于这一事实，所以对其工业实用性的评价将会很低，(2)采用未分离的酶进行反应，鉴于这一事实，所以不能解决或者需要高成本才能解决副反应和后续纯化步骤的问题，和(3)产品的制备需要高成本(如专利申请 DE-A-3048612 的情况)。

发明内容

本发明的目的在于以适当形式和数量表达一种或多种新型脱乙酰酶(如在 DE-A-19652284 中已经得到鉴定的)，和借助这些酶使通过拆分以高产率和高对映体纯度由化学上极易得到的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物制备 L-PPT 和某些蛋白原的 L-氨基酸成为可能。

在已大约知道酶活性和已进行了编码该酶的核酸序列的克隆的情况下，首先进行的操作包括将合适的核酸片段转移到合适的载体上以便在合适的细菌菌株中进行超表达，和/或以便在超表达后分离该蛋白。以这种方式分离的酶可被直接用于酶促反应或通过合适的偶联基团被连接到一种基质上。

为了大体上证实所需要的反应是否正在进行，最好首先进行一种酶促反应试验。所有其它步骤用来优化与反应特异性(基于起始物和产物)，反应速率，反应效率，所用酶的半衰期和可能的底物浓度有关的参数。在个别参数不能完全符合要求的情况下，能够适当地改变编码该酶的核酸序列，以使天然存在的酶得到进一步的优化。

专利申请 DE-A-19652284 已经记载了所用的各个脱乙酰酶的克隆。按照下述实施例 1 中的方法将编码适当的脱乙酰酶的核酸片段再克隆到适当的表达载体中以便由此确保确定的底物特异性达到必需的程度和不出现副反应。因此，尽管在专利申请 DE-A-19652284 中有可能表明 N-乙酰-L-PPT 是脱去乙酰基的，但不可能表明 N-乙酰-D-PPT 是未脱去乙酰基的。然而，只有 N-乙酰-L-氨基酸和 N-乙酰-L-PPT 的反应才是本申请以工业用途为目的的基本先决条件。

本发明涉及一种由其外消旋的 N-乙酰-D，L 衍生物制备蛋白原的或非蛋白原的 L-氨基酸的方法，该方法包括:

（a）利用分离的重组酶通过酶促拆分选择性地脱去相应的 L-氨基酸的 N-乙酰-L 衍生物的乙酰基，而相应的 D-氨基酸的 N-乙酰-D 衍生物的乙酰基则不被脱去，和

（b）从未脱去乙酰基的 N-乙酰-D 衍生物和/或不完全脱去乙酰基的 N-乙酰-L 衍生物中分离制得的脱去乙酰基的 L-氨基酸。

本发明特别涉及一种利用分离的重组酶通过酶促拆分由 N-乙酰-D，L-膦丝菌素制备 L-膦丝菌素（L-PPT）的方法。

本发明还涉及一种通过酶促拆分由其相应的 N-乙酰-D，L 衍生物制备 L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸的方法。

本发明还涉及一种方法，该方法包括利用一种或多种源自于一组马尿酸水解酶的脱乙酰酶由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物进行一种或多种 L-氨基酸的对映选择性生产，特别是利用一种或多种源自于一组马尿酸水解酶的脱乙酰酶由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物进行 L-膦丝菌素，L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸的对映选择性生产。

尤其是，本发明涉及一种方法，该方法包括利用源自于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或源自于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶（两种脱乙酰酶均被记载在 DE-A-19652284 中）由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物进行一种或多种 L-氨基酸的对映选择性生产，并且在本文中，尤其是涉及利用源自于寡养单胞菌属某种的 deac1 酶和/或源自于食酸丛毛单胞菌的 deac2 酶（两种脱乙酰酶均被记载在 DE-A-19652284 中）由其相应的外消旋 N-乙酰-D，L 衍生物进行 L-膦丝菌素，L-谷氨酸，L-组氨酸，L-亮氨酸，L-谷氨酰胺和/或 L-苯丙氨酸的对映选择性生产。两种酶具有很高的序列同源性，因而导致在裂解 N-乙酰-D，L 衍生物方面的相同或至少相似的功能。

另外，本发明涉及制备的重组脱乙酰酶作为生物催化剂的用途，该

生物催化剂能够利用高底物浓度和/或达到高空间/时间产率，尤其是利用固定化形式的重组脱乙酰酶来进行适当的反应。

本发明还涉及上述方法在反应温度大约为25℃至65℃，优选地在反应温度大约为30℃至45℃和特别优选地在反应温度大约为35℃至40℃下进行。

另外，本发明涉及上述方法在底物浓度大约为10 mM至1500 mM，优选地在底物浓度为大于50 mM，特别优选地在底物浓度为大于250 mM和特别优选地在底物浓度为大于500 mM的条件下进行。

本发明还涉及借助上述步骤从相应的N-乙酰-D，L衍生物中分离所制备的L-氨基酸或L-PTC，该衍生物尚未发生反应—如在N-乙酰-D衍生物的情况下—或者未完全发生反应—如在N-乙酰-L衍生物的情况下。

在本文中，可利用的方法是采用酸性离子交换剂的离子交换色谱法或利用有机溶剂如甲基异丁酮对N-乙酰-D，L衍生物进行萃取，其中上述制备的L-氨基酸或L-PPT进入水相，然后通过干燥被从中浓缩。

具体实施方式

实施例

1. 在大肠杆菌中以重组蛋白形式制备deac酶

来源于寡养单胞菌属某种的编码一种N-Ac-PPT-特异性脱乙酰酶的deac1结构基因以1.4 kb BamHI/SalI片段（DE-A-19652284中所述的）的形式被克隆到来源于Quiagen的His Tag表达载体pQE30的*Bam*HI/*Sal*I切割位点中[Quiaexpress试剂盒，IV型，目录号32149，Stüber等(1990)，在Immunological Methods中，Lefkovits，I.和Pernis，B.，编辑，第IV卷，Academic Press，纽约，121-152页]。

按照标准方法进行了所有的分子-生物学研究，例如按照Ausubel等撰写的"Current protocols in molecular biology"(1995，John Wiley和Sons，纽约)中描述的方法进行。将再连接构建物转化到由厂商（Qiagen）推荐的细菌菌株*E. coli* M15中，并且采用100 μg/ml的氨

苄青霉素和 25 μg/ml 的卡那霉素筛选重组克隆。通过加入 1 mM 的 IPTG 来诱导重组融合蛋白的表达。诱导 4-5 小时后收集细胞并且在对蛋白质进行加工之前一直保存在-20℃下。

通过对经诱导的克隆的细胞等分样品进行 SDS/聚丙烯酰胺电泳，能够检测到 His Tag deac1 融合蛋白的 49 kDa 的附加电泳带。

脱乙酰酶融合蛋白的酶促活性通过以[^{14}C]-N-乙酰-L-PPT 作为底物的放射性测定法来进行检测。为此，在 37℃下用 0.5%的甲苯，0.5%的乙醇对各 200 μl 的诱导培养物进行 30 分钟的透化处理。将细胞团粒分别重新悬浮在 25 μl 的 0.1 mM 的[^{14}C]-N-乙酰-L-PPT，10 mM 的氯化钠，10 mM 的磷酸钠，pH 7.5 中并在 37℃下温育 1 小时。为了定性测定形成的[^{14}C]-L-PPT，通过以正丙醇：25%的氨=3：2 作为洗脱液在 HPTLC 纤维素板（Merck）上进行薄层层析来分析各试验批料的 5 μl 等分样品。通过 X-射线胶片的放射自显影使放射性条带可见。

为了定量分析酶反应，通过以 Spheris orb® SAX 作为分离柱的放射-HPLC 来测定试验批料（洗脱液：5 mM 的 KH_2PO_4，10%的甲醇，pH=1.92，流速:0.5 ml/分钟）。在这些条件下，[^{14}C]-L-PPT 在 4.5 分钟时被洗脱出来，而[^{14}C]-N-乙酰基-L-PPT 在 6.5 分钟时被洗脱出来。

具有最高 N-乙酰-L-PPT-特异性脱乙酰酶活性的表达克隆产生脱乙酰酶蛋白，按照半定量测量方法测得该脱乙酰酶蛋白大约占总蛋白的 10%并且该脱乙酰酶蛋白被用于下述的酶纯化和生物转化。

2. 通过亲和色谱法纯化脱乙酰酶:

在自然条件下，通过利用镍-次氮基三乙酸酯基质（Ni-NTA）的亲和色谱法，按照 Quiagen 方法（Qiaexpress 试剂盒），从根据实施例 1 中描述的克隆方法而新命名的表达菌株 pQEDEAC 中分离脱乙酰酶蛋白。为此，对表达菌株 pQEDEAC 的 800 ml 培养物进行发酵并按照实施例 1 所述的方法进行诱导。将收集的细胞团粒（4 g）重新悬浮在 20 ml 的裂解缓冲液中并进行超声破碎。离心后，采用 4 ml 50%强度的 Ni-NTA 悬浮液处

理清澈的蛋白裂解液（120 mg 的总蛋白）以便与 His Tag 融合蛋白结合，然后将所述物质加样到一根酶柱上。用 10 个体积的洗涤缓冲液洗涤亲和基质，然后用 4 ml 的洗脱缓冲液洗脱。为了检测亲和纯化的纯度，通过 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳分析洗涤液和洗脱液中的细胞破碎的等分样品。利用实施例 1 中所述的放射性测定法测定含有不同蛋白的分步收集液的脱乙酰酶活性（反应批料：9 μl 蛋白溶液+1 μl 1mM 的 [^{14}C]-N-乙酰基-L-PPT，反应条件：参见上文）。为了定量测定酶，将蛋白分步收集液与 50 mM 的 N-乙酰基-D，L-PPT（9 μl 蛋白溶液+1 μl 500 mM 的 N-乙酰基- D，L -PPT）在 37℃下温育 30 分钟。然后用氨基酸分析仪（Biotronic LC 5001）测定所产生的 PPT。

细胞破碎后的粗提取物中的蛋白质具有 3 ncat/mg 蛋白质的脱乙酰酶比活性（1 ncat=1 nmol 的底物/秒钟）。通过亲和色谱法能够从 800 ml 的表达菌株培养物中分离到 10 mg 的 His Tag deac 融合蛋白，该融合蛋白具有 20 ncat/mg 蛋白质的比活性和大约 80%的纯度。

3. 脱乙酰酶的底物特异性和立体选择性:

为了研究 deac1 蛋白的底物特异性和立体选择性，以 20 μl 的批料在 10 mM 的 NaCl，10 mM 的磷酸钠，pH=7.5 中分别将各 5 μg 的纯化酶与表 1 中列举的各 25 mM 的 N-乙酰-L-氨基酸或相应的 D-对映体一起进行温育。采用马尿酸（N-苯甲酰甘氨酸），脱乙酰酶的天然底物来进行比较。反应物在 37℃下温育 1 小时，然后利用氨基酸分析仪（Biotronic LC5001）测定游离氨基酸的形成。表 1 列出了脱乙酰酶对不同底物的 L-对映体的相对活性。除了马尿酸和 N-Ac-L-PPT 外，deac1 酶还另外切割许多天然氨基酸的 N-乙酰基衍生物，特别是 N-Ac-L-谷氨酸，N-Ac-甘氨酸，N-Ac-L-组氨酸，N-Ac-L-鸟氨酸，N-Ac-L-亮氨酸，N-Ac-L-谷氨酰胺胺和 N-Ac-L-苯丙氨酸。在所有情况下，所述酶只对 L-对映体有活性，而在任何情况下所述酶都不可能使相应的 D-化合物发生反应。在所有其它试验的情况下（参见表 1），N-乙酰基-L 衍生物只发生了很低程度的反

应或者根本未发生反应。

表 1: deac 酶的底物特异性

底物[1]	相对活性[2][%]
马尿酸（N-苯甲酰甘氨酸）	100
N-Ac-L-膦丝菌素	43
N-Ac-L-鸟氨酸	37
N-Ac-L-蛋氨酸	0
N-Ac-L-色氨酸	0.4
N-Ac-L-苯丙氨酸	24
N-Ac-L-酪氨酸	11
N-Ac-L-谷氨酸	100
N-Ac-L-谷氨酰胺	30
N-Ac-甘氨酸	59
N-Ac-L-组氨酸	43
N-Ac-L-亮氨酸	33
N-Ac-L-缬氨酸	2
N-Ac-L-丝氨酸	4
N-Ac-L-脯氨酸	0

[1]: 所有化合物都是 L 对映体

[2]: 将利用马尿酸测定的比活性[nmol 的甘氨酸/分钟/mg 蛋白质]设为 100%，其它值以它为基准。

4. 通过利用 deac 生产菌株的细胞进行生物转化来拆分 N-乙酰基-D,L-膦丝菌素

如实施例 1 所述对 400 ml 表达菌株 pQEDEAC 的培养物进行发酵并进行诱导. 然后用 10 mM 的 NaCl，10 mM 的磷酸钠，pH=7.5 洗涤收集的细

胞并过夜冷冻干燥。以这种方式处理的细胞能够在4℃下保藏数星期而仍能保持很高的脱乙酰酶比活性并且这些细胞能被用作下列实验中的生物催化剂。

将2 mg的冻干细胞重新悬浮在1 ml的下列不同浓度的底物溶液中:

（1）10 mM的 N-乙酰-D, L-PPT, 二钠盐（0.3%）

（2）50 mM的 " " (1.3%)

（3）100 mM的 " " (2.6%)

（4）250 mM的 " " (6.7%)

（5）500 mM的 " " (13.3%)

作为反应缓冲液，批料含有10 mM的 NaCl, 10 mM的磷酸钠，pH=8.0并在100转/分钟的摇床上于37℃下温育48小时。水解反应中形成的游离 PPT 利用氨基酸分析仪（Biotronic LC5001）来进行检测。结果列于表2.反应产物的对映体纯度通过采用分离柱Chirex®(D)Penicillamine (Phenomenex)的手性HPLC来进行分析。使用的洗脱液是流速为0.5 ml/分钟的2 mM的 $CuSO_4$, 10%的甲醇。采用光度计在254 nm下进行检测。在这些条件下，L-PPT的参照溶液在17分钟时洗脱出来，而D-PPT的参照溶液在21分钟时洗脱出来。在所有试验样品中，仅L-PPT作为反应生成物被检测到。达到的转化率[生成的 L-PPT/底物中的 N-乙酰-L-PPT ×100]为低底物浓度(10 mM, 50 mM)时的100%至采用的最高底物浓度(500 mM）时的66%。

表2: 作为底物浓度函数的N-乙酰-D, L-PPT 的折分

底物溶液 N-乙酰-L-PPT [mM]	产物溶液* L-PPT [mM]	转化率 L-PPT/N-乙酰-D, L-PPT , 以%表示
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

生物催化剂的浓度: 2 mg/ml

在下列实验中，增加了生物催化剂的浓度并且记录了底物裂解的反应动力学参数。将13 mg的冻干细胞重新悬浮在1 ml 的底物溶液中并于37℃下在100转/分钟的摇床上进行培养，该底物溶液含有500 mM的 N-乙酰-D，L-PPT，二钠盐（13.3% w/v），10 mM 的 NaCl，10 mM 的磷酸钠，pH=8.0。为了测定所形成的L-PPT，在55小时的培养过程中，从反应批料中分别取出50 μl 的各等分样品，离心并且在分析之前一直将上清液冷冻保存在-20℃下。反应产物L-PPT的定量分析和对映体纯度的测定按上述方法进行。结果列于表3中。在选择的条件下，大约55小时后完成 L-特异性底物的裂解。在这种情况下，获得了大约 90%的转化率和483 [L-PPT的毫克数/生物催化剂的克数/小时]的空间/时间产率。

表3: N-乙酰-D，L-PPT拆分的反应动力学参数

反应时间 [小时]	L-PPT [mM]*
0	0
1	27.7
4	59.7
9	106.0
23	181.6
31	186.5
47	208.6
55	221.8

*: 生物催化剂的浓度: 13 mg/ml

底物浓度: 500 mM 的N-乙酰-D，L-PPT

5. 纯化deac蛋白质的固定化

为了能与分离的deac蛋白进行酶反应，实施例2中纯化的酶以His Tag 融合蛋白的形式被固定在聚合物载体 VINA-Epoxy

Biosynth®(Riedel de Haen)上。为此，通过硫酸铵沉淀将 deac 蛋白浓缩到 15 mg/ml 并用 1 M 的磷酸钠，pH=8.0 透析过夜。在室温下缓慢振荡 10 mg 的所述蛋白和 100 mg 的 VINA 载体 2 天来进行标准的偶联反应。离心分离出固定化物并用固定化缓冲液以及 50 mM 的磷酸钠，pH=7.0 各洗涤一次。为了封闭游离的环氧基团，将所述载体与 50 mM 的磷酸钠，pH=7.0，50 mM 的 2-巯基-乙醇在室温下温育 1 小时。所述生物催化剂然后被保存在 4℃下的 1 ml 5 mM 的磷酸钠，pH=7.0，0.02%的叠氮化钠中。为了测定蛋白质的偶联，在固定化前后，并且采用洗涤溶液，借助 Bradford 方法[Bradford (1976), Anal.Biochem.(生物化学分析)72:248-254]测定溶液中的蛋白含量。在固定化前后，利用实施例 1 中描述的放射性测定法测定脱乙酰酶的比活性。偶联后，所述酶的相对活性为大于溶解蛋白的测定值的 90%。

6. 在柱反应器中利用固定化的 deac 酶拆分 N-乙酰-D, L-膦丝菌素:

将 1 g 的酶固定化物（湿重）加样到柱反应器中并用作拆分流速不同的各种浓缩底物溶液的生物催化剂。如表 4 中列出了在 10 mM NaCl，10 mM 磷酸钠，pH=8.0 中含有不同浓度的 N-乙酰-D, L-PPT，二铵盐的底物溶液。反应在 37℃下总共进行 10 天。通过利用氨基酸分析和手性 HPLC（参见实施例 4）测定流经柱的物质中存在的 L-PPT 来定量分析该反应。结果见表 4。采用最高底物浓度（500 mM）和最低底物流速（0.03 ml/分钟）获得了 83%的最高转化率。空间/时间产率随着流速和底物浓度而增加并且在 500 mM 的底物浓度和 0.3 ml/分钟的流速的条件下，达到了 181[L-PPT 的毫克数/生物催化剂的克数/小时]的最高值。在整个实验过程中，固定化的脱乙酰酶显示出良好的稳定性并且在 37℃下 10 天以后仍具有大约 80% 的起始活性。

表 4: 在柱反应器中利用固定化的 deac 酶拆分 N-乙酰-D, L-PPT

底物溶液 N-乙酰-D, L-PPT [mM]	流速 [ml/分钟]	产物溶液 L-PPT[mM]	转化率 [%]	空间/时间产率[L-PPT 的毫克数/生物催化剂的克数/小时]*
100	0.1	29.7	59	39
	0.3	22.0	44	87
	0.5	13.8	28	91
250	0.1	38.4	31	50
	0.3	25.0	20	99
	0.5	18.1	14	119
500	0.1	71.1	28	93
	0.3	46.0	18	181
	0.5	26.3	11	173
500	0.03	208.2	83	82

在 37℃下反应