

(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:

2005年2月17日(17.02.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/014845 A1

(51) 国际分类号⁷: C12P 33/02

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000746

(22) 国际申请日: 2004年7月5日(05.07.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
03142114.8 2003年8月7日(07.08.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海来益生物
药物研究开发中心有限责任公司(SHANGHAI
HEALTH CREATION CENTER FOR
BIOPHARMACEUTICAL R & D CO., LTD.) [CN/
CN]; 中国上海市张江高科技园区牛顿路200号1号楼
2楼B座, Shanghai 201203 (CN)。浙江医药股份有限
公司新昌制药厂(ZHE JIANG MEDECINE CO.,
LTD. XINCHANG PHARMACEUTICAL
FACTORY) [CN/CN]; 中国浙江省新昌市环城东路
59号, Zhejiang 312500 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 陈代杰(CHEN, Daijie)
[CN/CN]; 王志龙(WANG, Zhilong) [CN/CN]; 戈梅
(GE, Mei) [CN/CN]; 金一平(JIN, Yiping) [CN/CN];
叶伟东(YE, Weidong) [CN/CN]; 中国上海市张江高
科技园区牛顿路200号1号楼2楼B座, Shanghai 201203
(CN)。

(74) 代理人: 上海新天专利代理有限公司(SHANGHAI
XIN TIAN PATENT AGENT CO., LTD); 中国上海
市南昌路59号科学会堂思南楼1606室, Shanghai
200020 (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

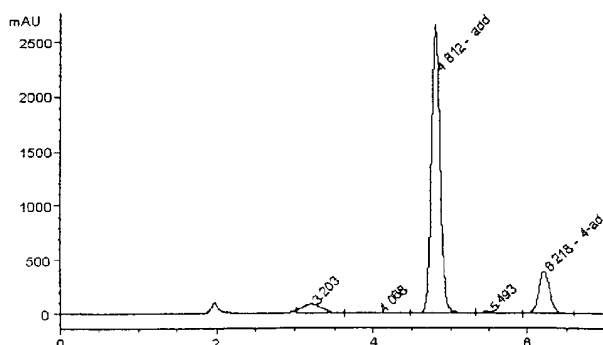
本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: APPLICATION OF CLOUD POINT SYSTEM IN BIOLOGICAL TRANSFORMING

(54) 发明名称: 浊点系统在生物转化中的应用



(57) Abstract: The invention relates to technology of microorganism. The invention declares a method of using cloud point system in biological transforming. The method forms a cloud point system below the microbiological transforming culturing temperature using one kind or more than one kind of nonionic surfactant solution, and said system acts as transformation medium of microorganism. The system is suitable to microbiological transforming of hydrophobe compound. The method of the invention has advantages of excluding the inhibition to the growing of cells with substrates and products. It also can exclude the decomposition of products. The cloud point system in this invention forming a microcosmic emulsion in the state of oil in water and water in oil. The drop of surfactant can improve the solubility and the biological use ratio of substrates and exclude the inhibition to the growing of cells with substrates, and it is the storehouse of substrates and the extractant of products. There is some bleb in the continuous surfactant, which like a microreactor. The bleb can let the microorganism beyond the poisoning of surfactant, and improve the biological compatibility.

[见续页]

WO 2005/014845 A1



(57) 摘要

本发明属于微生物技术领域。本发明公开了浊点系统在生物转化中应用的方法,即采用一种或一种以上非离子表面活性剂形成浊点低于微生物转化培养温度的水溶液系统即浊点系统,作为微生物转化的介质。该系统特别适用于疏水性化合物的微生物转化,能解除底、产物抑制,排除产物降解。本发明浊点系统形成了油包水和水包油的微观乳浊液,表面活性剂液滴具有增溶能力,充当着底物的储藏库和产物的萃取剂,强化了底物的生物利用度,排除了产物的抑制。连续的表面活性剂中存在水泡,相当于一个微反应器,能使微生物免受表面活性剂的毒害作用,从而提高了生物相容性。

浊点系统在生物转化中的应用

技术领域

本发明属于微生物技术领域。具体涉及浊点系统在生物转化中的应用。

背景技术

微生物转化疏水性化合物常受到一些因素的严重制约：底物在水中的溶解度很小，限制了其生物利用度和产物/底物对微生物的抑制和毒害作用。这些问题在生物降解有毒污染物时也经常遇到。介质工程就是在转化介质中加入具有生物相容性但本身不生物降解的组分以减轻或排除这些限制。因而有机溶剂两相系统、双水相系统、脂质体系统、胶束系统、油包水型微观乳浊液或反胶束系统等新型介质系统不断引入。

非离子表面活性剂胶束溶液，在温度高于其浊点或有诱导物存在的条件下，会自动分相形成表面活性剂稀相和富含表面活性剂的凝聚层相，常称为浊点系统（cloud point system, CPS）。浊点系统在分离技术中的应用已有多多年。这一相系统具有易于控制、放大可靠、操作简单等优点而倍受青睐。尤其，该“系统”具有含水率高、条件温和的优点，不会损害引入的细胞和蛋白质等生物物质而受到生物分离工作者的重视。CPS 应该具有较好的生物相容性。底物、产物可在两相中实现不同的分配，基于两相系统的微生物转化可能排除潜在的产物、底物抑制或毒害。另外，如果产物和细胞能在不同相中分配就可通过萃取分离细胞以替代常规的机械分离。表面活性剂胶束溶液具有增溶作用，能显著地增加疏水性物质的表观溶解度，由此增强其生物利用度，刺激微生物转化。尽管可能有如此多优点，但浊点系统作为转化介质还未见文献报道。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于设计浊点系统的新应用。

本发明提供了浊点系统在生物转化中的新应用，即采用一种或一种以上非离子表面活性剂形成浊点低于微生物转化培养温度的水溶液系统即浊点系统，作为微生物转化的介质。

本发明所述的非离子表面活性剂选自聚氧乙烯醇类、聚氧乙烯醚类或辛基酚聚氧乙烯类表面活性剂。

其中所述的聚氧乙烯醇类包括 Brij30, Brij35, Brij56 或 C12E7；聚氧乙烯醚类包括 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Span20、Span40、Span60 或 Span80；辛基酚聚氧乙烯类包括 Triton X-100 或 Triton X-114。

本发明公开的浊点系统特别适用于：

- 1. 疏水性化合物的微生物转化；
- 2. 底物、产物抑制微生物生长；
- 3. 产物被微生物进一步降解；

如胆固醇边链的切除、甾体化合物转化、有机污染沉淀物的降解等。

本发明以胆固醇的微生物边链切除为模型，进一步说明筛选适当的浊点系统作为介质工程的新方法。

胆固醇经微生物边链切除生成甾体药物的重要中间体 ADD 是生物转化疏水性化合物的典型例子。首先，胆固醇是典型的疏水性化合物，其在水中的溶解度常在 1μM 以下，而一般的甾体在 0.01~0.1mM 之间。其次，这一转化的底物和产物对微生物都有毒害作用。

该转化方法设计包括下列步骤：

- (1) 选择表面活性剂

表 1 非离子表面活性剂的基本性质

非离子表 面活性剂	结构通式*	疏水基团	CMC (mM)	HLB	CP (°C)
--------------	-------	------	----------	-----	------------

 聚氧乙烯醇

Brij 30	$C_{12}E_4$	十二(烷)醇	0.02-0.06	9.5	4
	$C_{12}E_7$	十二(烷)醇	0.07	12.5	65
Brij 35	$C_{12}E_{23}$	十二(烷)醇	0.09	16.9	>100
Brij 56	$C_{16}E_{10}$	鲸脂		12.9	64-69

聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯

Span 20	$C_{12}S_6$	十二(烷)酸		8.6	
Span 40	$C_{16}S_6$	十六(烷)醛		6.7	
Span 60	$C_{18}S_6$	十八酸		4.7	
Span 80	$C_{18}S_6$	十八烯酸		4.3	
Tween 20	$C_{12}S_6E_{20}$	十二(烷)酸	0.04-0.06	16.7	
Tween 40	$C_{16}S_6E_{20}$	十六(烷)醛	29 ^a	15.6	
Tween 60	$C_{18}S_6E_{20}$	十八酸	27 ^a	14.9	
Tween 80	$C_{18}S_6E_{20}$	十八烯酸	0.01-0.02	15	

乙醇酚乙氧基化物

Triton	$C_8\Phi E_{9-10}$	辛基苯酚	0.2	13.5	64
X-100					
Triton	$C_8\Phi E_{7-8}$	辛基苯酚	0.3	12.8	22
X-114					

*: S_6 表示山梨聚糖环; E_n 表示乙撑氧基团的数量; C_n 表示烃基链中的碳原子数; Φ 表示酚环. ^a表示 mg/L.

选择了三类非离子表面活性剂中的 14 种表面活性剂进行筛选。其基本性质如表 1 所示。聚氧乙烯醇 (Brij 30, Brij 35, Fluka; Brij56, C₁₂E₇, 上海助剂厂)。聚氧乙烯醚 (Tween20, Tween40, Tween60, Tween80, Span20, Span40, Span60, Span80, 上海试剂有限公司)。辛基酚聚氧乙烯 (Triton X-100, 上海试剂有限公司; Triton X-114, Fluka)。

(2) 微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683。它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g H₂PO₄, 0.1g (NH₄)₂SO₄, 0.05g MgSO₄•7H₂O;

种子培养基 (100ml): 0.5g (NH₄)₂SO₄, 0.45g Na₂HPO₄, 0.34g KH₂PO₄, 0.05g MgSO₄•7H₂O, 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g (NH₄)₂SO₄, 0.45g Na₂HPO₄, 0.34g KH₂PO₄, 0.2g MgSO₄•7H₂O, 0.5g 胆固醇, 2.0g 非离子表面活性剂。

微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

本发明的转化分析试验报告如下:

1. HPLC

取 1ml 转化液用 4ml 甲醇浸泡 2hr。离心后取 0.8ml 上清进行 HPLC 分析。用 Hypersil C18 柱, 流动相为甲醇: 水 (4:1), 流速为 0.7ml/min, 检测波长为 254 nm 测得的 AAD 和 4-AD 结果如图 1 所示。

2. TLC

底物和产物在 CPS 中的分配用 TLC 分析来确定。TLC 在 Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) 高效薄层层析板上进行。氯仿: 乙醚 (1:3) 为展层剂, 磷钼酸溶液中浸泡、烘干, 加热显色, 底物和产物 (ADD、4-AD)

可分开。ADD、4-AD、胆固醇的 Rf 值分别为 0.42, 0.47, 0.67。

3. 浊点测定

浊点测定采用目测法观察溶液变浑浊时的温度。缓慢升高溶液温度, 记下溶液变混浊时的温度, 然后缓慢降低溶液温度, 记下溶液澄清时的温度。取两者的平均值作为浊点。

4. 增溶测定

按 Triton X-100 和 Triton X-114 的不同比例配制表面活性剂浓度为 2% 的过饱和 ADD 溶液。溶液置具塞玻璃容器, 在 220 rpm、28 °C 的条件下震荡 72 hr。膜滤 (膜孔径为 20 μm , 上海医药工业研究院生产) 后用 HPLC 进行 ADD 的定量分析。

结果与分析

(1) 非离子表面活性剂筛选

选择合适的介质进行微生物转化, 介质生物相容性或对微生物潜在的毒性是筛选转化介质的前提。介质的潜在毒性可用微生物在含表面活性剂的转化介质转化产生 ADD 的最终产物浓度来表征。图 2 是不同表面活性剂溶液的转化结果。

在高表面活性剂浓度下, 只有 Triton X-114 在微生物转化条件下形成能 CPS, 其 ADD 的最终产物浓度最高。和 Triton X-114 同一系列的表面活性剂 (Triton X-100) 不具有生物相容性。说明浊点系统是使表面活性剂的生物相容性得到改善的原因。

(2) CPS 生物相容性和提高生物利用度的机理

浊点系统发生相分离后, 直接在稀相和凝聚层相加入油溶性染料 (苏丹黑 B) 染色后在显微镜下观察, 结果如图 3 所示。图 3 为 CPS 稀相和凝聚层相的显微观察。在稀相, 小的表面活性剂液滴或胶束因染有染料而显黑色。这是水包油微观乳浊液。在凝聚层相, 形成油包水的微观乳浊液。黑色的背景表示连续的表面活性剂相, 它相当于底物的储藏库和产物的萃取剂。在连续的表面活性剂相中存在大的水泡, 这为细胞提供了水环境。它相当于一个微反应器, 使细胞屏蔽于表面活性剂而免受其毒害作用。细胞在表面活性剂介质中的生物相容性得到改善。在凝聚层相的水泡中有同 CPS 的稀相类似的结构, 存在

水包油微观乳浊液。物质交换可发生于表面活性剂液滴之间、水泡之间、连续相和非连续相之间等相界面处。液滴的聚并更加快了物质交换。这使在水中溶解度很小的疏水性化合物的生物利用度得到提高。

通过 TLC 分析, 底物和产物在 CPS 中的分配如图 4 所示。图 4 为浊点系统中底物、产物的分配。底物基本上浓缩于凝集层相。凝集层相对底物优良的溶解能力有利于底物的溶解。ADD 和底物相似也分配于凝集层相。细胞在两相的分配采用血球计数法 (hemocytometer method) 测定。其凝聚层相和稀相的分配系数大概为 10, 表明 *Mycobacterium* sp. 的表面是疏水的。这和文献报道称 *Mycobacterium* 是所谓的疏水性微生物一致。

(3) 强化 CPS 的增溶能力

混和系统的浊点

如图 2 所示, 只有 Triton X-114 的胶束溶液, 其浊点低于微生物转化的培养温度而形成两相表现出良好的生物相容性。表面活性剂溶液的浊点和增溶能力可通过添加不同表面活性剂互配形成混和表面活性剂胶束溶液来调节。为了强化 CPS 的增溶能力, 选用 Triton X-100 形成混和表面活性剂胶束溶液。如图 5 所示, 图 5 为混合系统的浊点。当 Triton X-100 所占的质量分率高于 20% 时, 系统的浊点高于微生物的转化培养温度 (28°C)。转化培养基中的主要成分对系统的浊点影响都很小。微生物转化产物 ADD 能明显地降低混和系统的浊点, 有可能使混和系统的浊点降低到培养温度以下, 混和系统由一相变成两相。

混和系统的增溶能力

混和表面活性剂胶束溶液对 ADD 的增溶能力随 Triton X-114 的质量分率的变化如图 6 所示。图 6 为混和表面活性剂系统的增溶能力。从纯表面活性剂溶液的增溶能力可以看出 Triton X-100 的增溶能力优于 Triton X-114。当 Triton X-114 的质量分率低于 50% 时, 混和系统的增溶能力随 Triton X-114 含量的增加而降低。但在 Triton X-114 的质量分率达到 70% 时, 混和系统对 ADD 的增溶能力出现最大值。如图 3 所示, 在 CPS 中, 凝聚层相中表面活性剂的存在形式完

全不同于表面活性剂胶束溶液中的胶束结构。这表明表面活性剂胶束溶液的增溶能力强烈地受浊点影响。由图 5 可知,底物和产物 ADD 在 CPS 中的两相有相同的分配规律。由 ADD 的增溶数据,我们可以推断底物也应该具有相似的增溶规律。

混和系统的微生物转化

经微生物转化 7 天后具有不同 Triton X-114 的质量分率的混和转化系统的分相行为和 ADD 的产率如图 7 所示。图 7 为相分离的产物随混和系统中表面活性剂质量分率的变化。只有 Triton X-100 的质量分率低于 50% 时相分离才会发生。ADD 的最终产物浓度不但比纯 Triton X-100 系统的高而且比纯 Triton X-114 系统的高。ADD 的最终产物浓度随 Triton X-114 质量分率的变化与系统对 ADD 的增溶结果具有类似的变化趋势,且都在 Triton X-114 质量分率为 70% 时出现最大值。混和系统中高 ADD 产率可归因于系统中表面活性剂的增溶能力,它强化了底物的溶解,增加了其生物利用度。同时萃取了产物,解除了产物的抑制。

本发明在 Triton X-100 和 Triton X-114 组成的 CPS 实现了胆固醇边链切除生成甾体药物的重要中间体 ADD 的微生物转化。在这一系统中,形成了油包水和水包油的微观乳浊液。表面活性剂液滴具有增溶能力,充当着底物的储藏库和产物的萃取剂。强化了底物的生物利用度,排除了产物的抑制。连续的表面活性剂中存在水泡,相当于一个微反应器,能使微生物免受表面活性剂的毒害作用。而且,CPS 的增溶能力可由混合表面活性剂来调节。所有这些表明,CPS 是介质工程中有前途的方法。

附图说明

图-1 ADD 和 4-AD 的 HPLC 谱图

图 2 在不同表面活性剂转化介质中 ADD 的浓度

图 3 CPS 稀相和凝聚层相的显微观察

A. 凝聚层相,油/水乳浊液,×40 倍.

- B. 凝聚层相中的水泡, 水/油乳浊液, $\times 600$ 倍
- C. 稀相, 水/油乳浊液, $\times 600$ 倍

图 4 浊点系统中底物、产物的分配

- 1. 标准品;
- 2. 稀相;
- 3. 凝聚层相

图 5 混和系统的浊点

100ml: 2.0g 非离子表面活性剂($\square$); 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0g 非离子表面活性剂($\diamond$); 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g 胆固醇, 2.0g 非离子表面活性剂($\triangle$); 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g ADD, 2.0g 非离子表面活性剂(O).

图 6 混和表面活性剂系统的增溶能力

图 7 相分离和产物随混和系统中表面活性剂质量分率的变化

具体实施方式

实施例 1

微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g H_2HPO_4 , 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

种子培养基 (100ml): 0.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g

KH_2PO_4 , 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.45g 胆固醇, 10.0g 混合 Triton X-100 和 Triton X-114 (1: 1)

微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 10g/L, 转化率为 93% (摩尔转化率)。

实施例 2

微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683, 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g H_2HPO_4 , 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

种子培养基 (100ml): 0.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0g 甘油, 0.2g 混合植物甾醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0g 混合植物甾醇, 10.0g 混合 Triton X-100 和 Triton X-114 (1: 1)

微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 8.2g/L, 转化率为 76% (摩尔转化率)。

实施例 3

微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683, 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g H_2PO_4 , 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

种子培养基 (100ml): 0.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.45g Na_2HPO_4 , 0.34g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0g 胆固醇, 10.0g 混合 Triton X-114 8ml。

微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 6.45g/L, 转化率为 60% (摩尔转化率)。

权 利 要 求

1. 一种浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于该方法采用一种或一种以上非离子表面活性剂形成浊点低于微生物转化培养温度的水溶液系统，作为微生物转化的介质。
2. 根据权利要求 1 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的非离子表面活性剂为聚氧乙烯醇类、聚氧乙烯醚类或辛基酚聚氧乙烯类表面活性剂。
3. 根据权利要求 2 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的聚氧乙烯醇类包括 Brij30, Brij35, Fluka, Brij56 或 C₁₂E₇；聚氧乙烯醚类包括 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Span20、Span40、Span60 或 Span80；辛基酚聚氧乙烯类包括 Triton X-100 或 Triton X-114。
4. 根据权利要求 1 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的微生物转化是指疏水性化合物的微生物转化，或底、产物抑制微生物生长，或产物被微生物进一步降解。

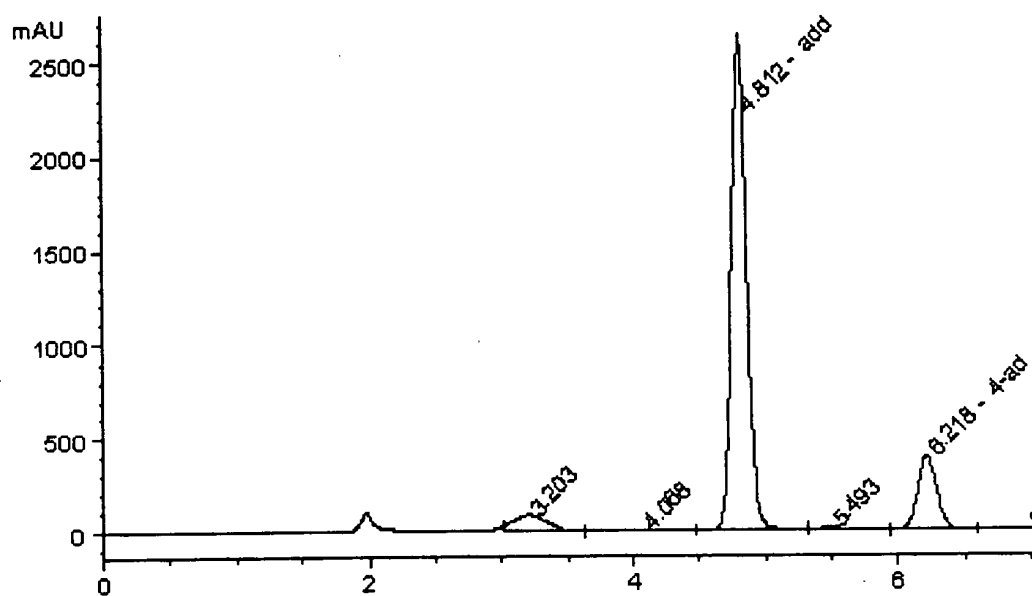


图 1

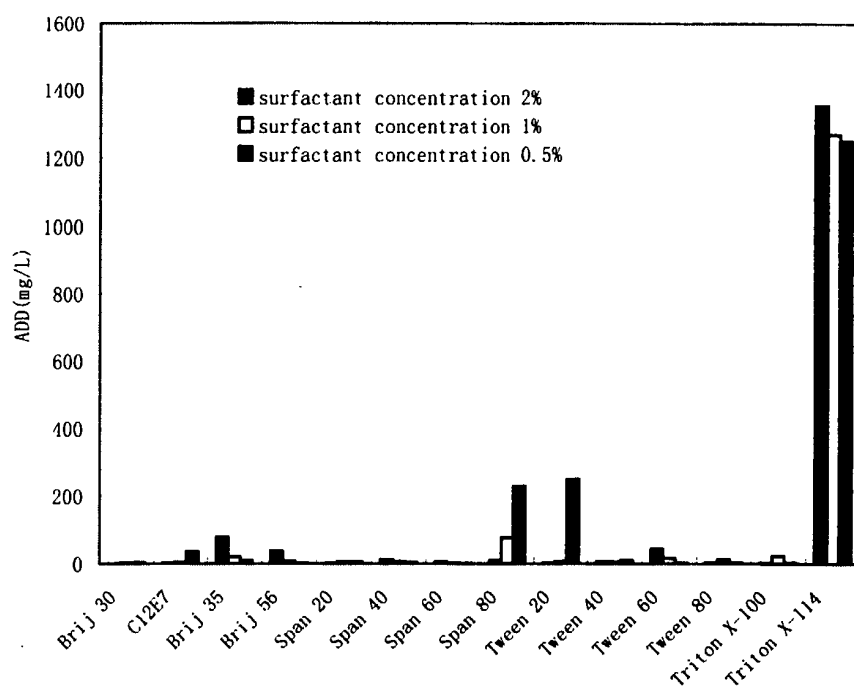


图 2

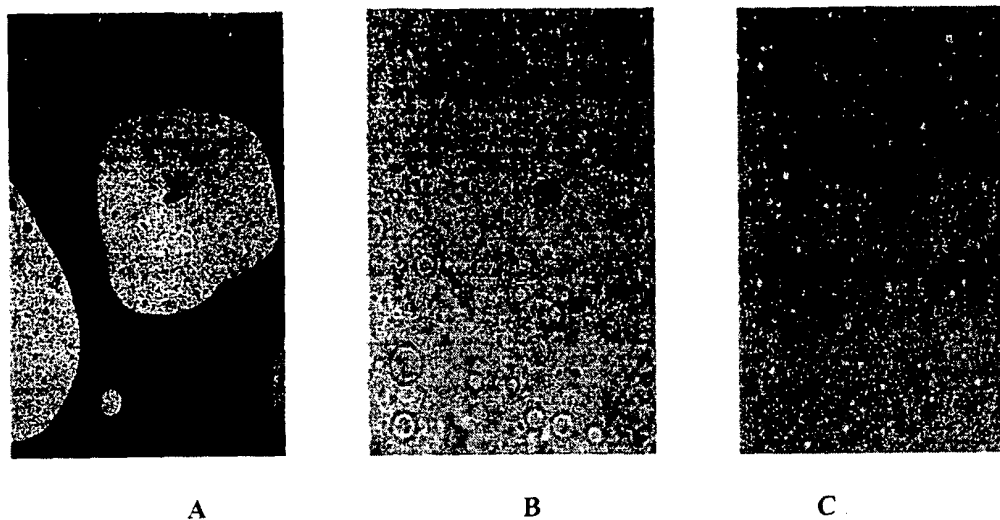
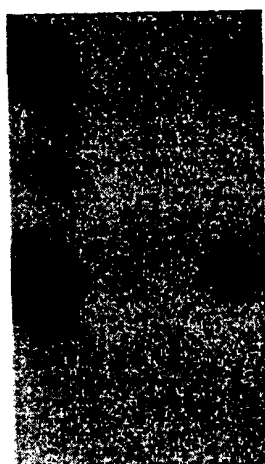


图 3

胆固醇

4-AD

ADD



1 2 3

图 4

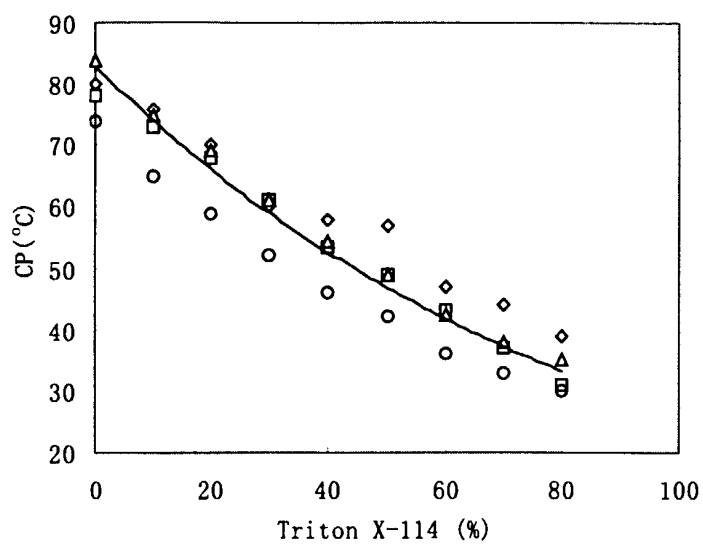


图 5

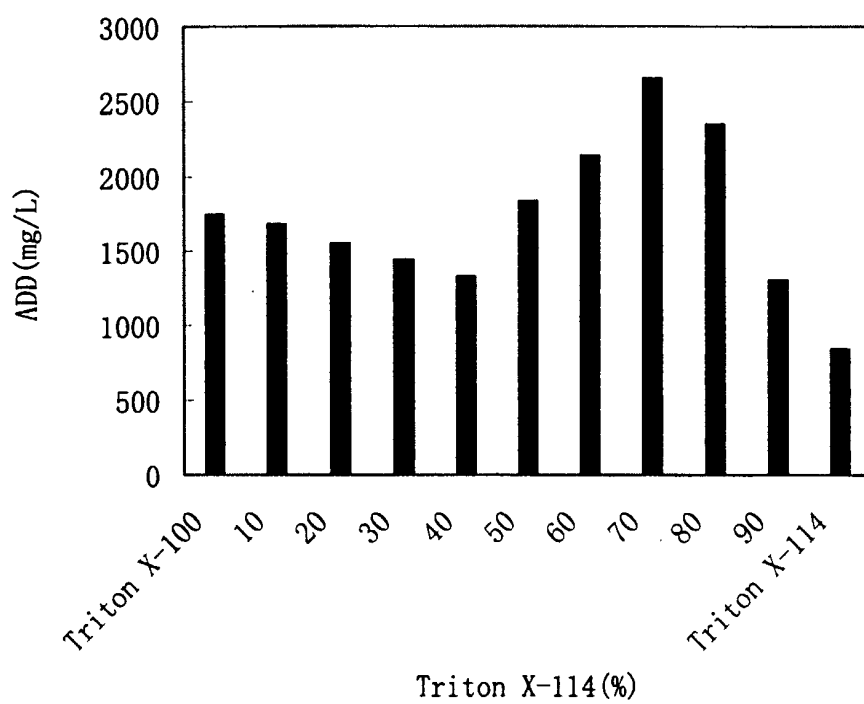


图 6

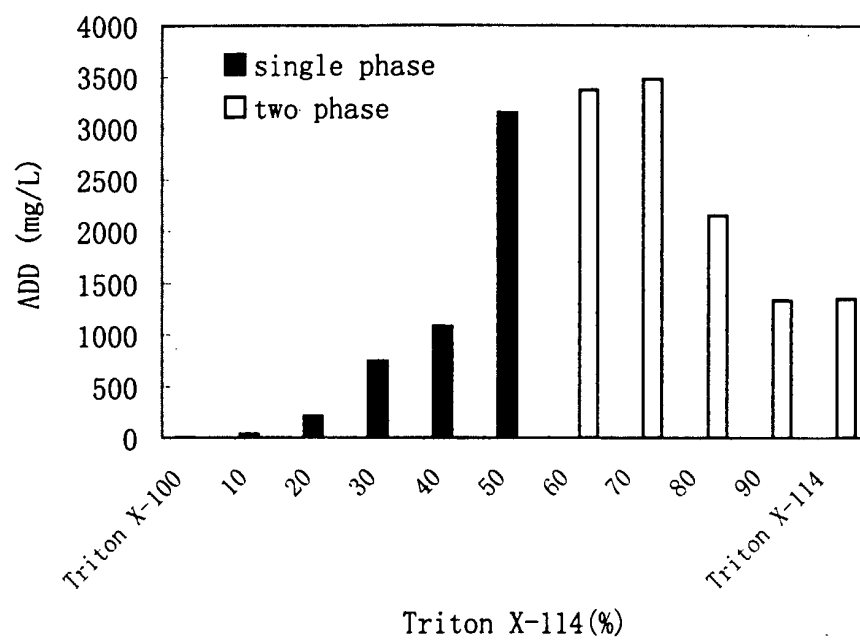


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN 2004/000746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P33/02

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)

IPC⁷ C12P33/02

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

IPC⁷ C12P33/00 C12P C12N1/00 C12N1/20 C12N

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

WPI EPODOC PAJ CA CNPAT CNKI cloud point, transform

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP5610959A 1981-08-31 MITSUBISHI CHEM IND LTD	1-4
PA	CN1483833A 2004-03-24 SHANGHAI HEALTH CREATION CENTER FOR BIOPHARMACEUTICAL R&D CO.,LTD	1-4
A	JP6343451A 1994-12-20 YAMATO KUBOTA	1-4

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
2004-9-25

Date of mailing of the international search report
28 · OCT 2004 (28 · 10 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/
The State of Intellectual Property Office, P.R.C
6 Xitucheng Road, Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer
He Wei
Telephone No. 86-10-62085273

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000746

A. 主题的分类

C12P33/02

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷ C12P33/02

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

IPC⁷ C12P33/00 C12P C12N1/00 C12N1/20 C12N

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))

WPI EPODOC PAJ CA CNPAT CNKI

检索词: 浊点 转化

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	JP56109594A 1981-08-31 MITSUBISHI CHEM IND LTD	1-4
PA	CN1483833A 2004 年 3 月 24 日 上海来益生物药物研究开发中心有限责任公	1-4
A	JP6343451A 1994-12-20 YAMATO KUBOTA	1-4

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2004-9-25

国际检索报告邮寄日期

28 · 10月 2004 (28 · 10 · 2004)

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

传真号: (86-10)62019451

受权官员

何炜

电话号码: (86-10)62085273