

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 11/00

C12P 13/00

/(C12P11/00,

C12R 1: 01, 1: 05)

(C12P13/00, C12R1:

01, 1: 05)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95195224.2

[45] 授权公告日 2002 年 1 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1077599C

[22] 申请日 1995.9.19 [24] 颁证日 2002.1.9

[21] 申请号 95195224.2

[30] 优先权

[32] 1994.9.22 [33] FR [31] 94/11301

[32] 1995.3.7 [33] FR [31] 95/02615

[86] 国际申请 PCT/FR95/01196 1995.9.19

[87] 国际公布 WO96/09403 法 1996.3.28

[85] 进入国家阶段日期 1997.3.21

[73] 专利权人 罗纳-普朗克动物营养素公司

地址 法国安东尼

[72] 发明人 O·法威-布勒 M-C·伯朵 D·拉格

A·阿里阿格诺

[56] 参考文献

CN1091472A 1994.8.31 C12P13/00

EP348901 1990.1.3 C12P11/00

CHEMICAL ABSTRACT (VOL. 116, NO. 25) 1992. 6. 22
C12P13/00

审查员 谢妍

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 4-甲硫基丁腈的酶水解

[57] 摘要

本发明涉及一种用粪产碱杆菌、红球菌 sp. HT-29—7 或 *Gordona terrae* 腈水解酶, 将 α -取代 4-甲硫基丁腈酶水解成外消旋的 α -取代 4-甲硫基丁酸的新方法。

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

知识产权出版社出版

1. 外消旋的 α 取代 4-甲硫基丁酸的制备方法, 其特征在于用选自粪产碱杆菌 ATCC-8750、红球菌 sp. HT-29-7 FERM BP-3857 或 Gordona terrae FERM

5 BP-4535 的腈水解酶水解外消旋的 α 取代-4-甲硫基丁腈。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于外消旋的 α 取代的 4-甲硫基丁腈是 4-甲硫基-2-羟基丁腈。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于水解在 pH4~11 下进行。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于水解在 pH5~9 下进行。

10 5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于水解温度是 30~60℃。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于水解温度是 30~50℃。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于在起始溶液中 α 取代 4-甲硫基丁腈的浓度是每升 10-400mM。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于在起始溶液中 α 取代 4-甲硫
15 基丁腈的浓度是每升 50-200mM。

9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于溶液中 α 取代 4-甲硫基丁酸的浓度是每升 10-2000mM。

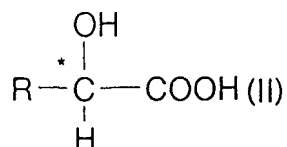
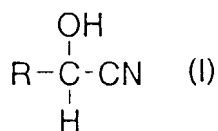
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于溶液中 α 取代 4-甲硫基丁酸的浓度是每升 10-1500mM。

4-甲硫基丁腈的酶水解

本发明涉及腈水解酶作为由腈基水解生成羧基的催化剂的应用。更确切地说，本发明涉及选自产碱菌、红球菌或 *Gordona* 菌菌种微生物的，更确切地说选自于寄存号为 ATCC8750 的 粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)、寄存号为 FERM BP-3857 的 红球菌 Rhodo-coccussp. HT 29-7、寄存号为 FERM BP-4535 的 *Gordona terrae* MA-1 微生物的腈水解酶的应用。

例如，粪产碱杆菌 腈水解酶在以其专利号分别是 EP348901 和 JP03224496 公告的 ASAHI 公司的欧洲和日本专利中描述过。在这些专利中，尤其是欧洲专利中，这种腈水解酶用来由外消旋腈生产旋光性酸。优选的原料腈是 α 取代的腈，并且这些腈含有优选的是有 1-3 个碳原子的烷基链或芳基。上述欧洲专利中的第 11 个实施例描述了用 粪产碱杆菌 水解外消旋扁桃腈，得到 R-(-)扁桃酸，对映体过量为 91 %。NITTO CHEMICAL 公司的欧洲专利 486289 与其美国等效专利 US5326702，都描述了在亚硫酸盐存在下用 产碱杆菌 sp. BC35-2 (FERM No 11265 或 FERM-BP-3318) 水解扁桃腈，在这种情况下得到扁桃酸，对映体过量约 98 %。

ASAHI 公司的专利 JP 04341185 还描述了 粪产碱杆菌 ATCC8750 腈水解酶的制备和应用，以解决由其外消旋腈制备光学纯化合物的问题。更优选地，在上面引用的日本专利中描述的对映选择的腈水解酶能够将具有下述通式(I)的 2-羟基腈水解成具有下述化学式(II)的 2-羟基羧酸：



式中 R 表示或许取代的芳基或可能取代的杂环基。该专利指出，用所述腈水解酶水解扁桃酸的腈能够达到 R-(-)扁桃酸对映体过量 100 %。在其

实施例 5 中指出，可以使用所述的腈水解酶水解如戊腈、丙烯腈、2-卤代丙腈、氯乙腈之类的脂族腈。但没有明确指出有关有非对称中心的脂族腈的这种水解对映选择性。

这份说明书还明确说明了粪产碱杆菌腈水解酶在 pH6.5-8.0, 所述酶的使用温度(根据这份参考文献)总是低于 45 °C 的条件下活性最高。

非常惊奇地看到, 所述粪产碱杆菌 ATCC8750 的酶用于水解 4-甲硫基-2-羟基丁腈时进行这种水解, 从光学纯度来看没有任何选择性。这种酶水解所述的腈, 得到两种酸的外消旋混合物, 其中任何一种异构体都没有优势。

寄存号为 FERM BP-3857 的红球菌 sp.HT 29-7 的腈水解酶, 例如在公告号分别为 EP610049 和 US5296373 的欧洲专利和美国专利中描述过, 这两份专利都是 NITTO 公司的。

在这些专利中, 尤其在这份美国专利中, 使用这种腈水解酶由带苯基的外消旋腈生产旋光性酸。这些原料腈都含有芳基, 主要涉及扁桃腈或其芳环取代衍生物的水解。上述这份美国专利的实施例 1 描述了用红球菌 sp.HT 29-7 水解外消旋扁桃腈, 得到 R-(-)扁桃酸, 对映体过量 100 %。实施例 2 描述了在其环上取代的扁桃腈衍生物的水解, 扁桃酸衍生物对映体过量也是 100 %。用苯醛的腈进行水解时同样是如此。

NITTO CHEMICAL 公司的欧洲专利 610049 描述了红球菌 sp.HT 29-7(FERM BP-3857)、产碱杆菌 sp.BC35-2(FERM BP-3318) 或 Breuibacterium acetylicum 乙酰短杆菌 IAM1790, 在 γ 位被芳环取代的 α 羟基腈水解生成被旋光性苯基取代的 α 羟基羧酸这一过程中的用途。用红球菌 sp.HT 29-7 得到的酸, 因原料腈的情况, 和因是否有磷酸的存在(pH 固定在约 8.2), 其对映体过量总是不相同。

非常惊奇地看到, 红球菌 sp.HT 29-7(FERM BP-3318)的这种腈水解酶在其用于水解 4-甲硫基-2-羟基丁腈时, 从对映体来看没有任何选择性。这种酶水解所述的腈, 得到两种酸的外消旋混合物, 其中任何 异构体都没有优势。

欧洲专利 0610048 描述了寄存号为 FERM BP-4535 的 Gordona terraeMA-1 的腈水解酶, 用于将 γ 位为苯基和 α 位为羟基的腈水解成相应的旋光性酸。在所有这些实施例中, 对映体过量是 92-100 %。

非常惊奇地发现，寄存号为 FERM BP-4535 的 Gordona terrae MA-1 的脲水解酶在其用于水解 4-甲硫基-2-羟基丁脲时，从对映体来看没有任何选择性。这种酶水解所述的脲，得到两种酸的外消旋混合物，其中任何一种异构体都没有优势。

因此，本发明涉及一种通过用下述微生物的脲水解酶水解外消旋的 α 取代的 4-甲硫基丁脲，制备外消旋的 α 取代的 4-甲硫基丁酸的方法：寄存号为 ATCC8750 的粪产碱杆菌、寄存号为 FERM BP-3857 的红球菌 sp.HT 29-7、寄存号为 FERM BP-4535 的 Gordona terrae MA-1。

根据本发明的方法，这种微生物可以原样使用或固定在本领域技术人员熟知的载体上使用。

另外，这种酶编码的遗传信息可以从母体微生物(如粪产碱杆菌 ATCC8750 等)转移到如枯草杆菌之类的微生物上。

本发明方法的一种实施方式是使用相应量的自由的或固定的酶代替微生物，这种酶完全地或部分地已被纯化。

在 α 取代的 4-甲硫基丁脲中，使用 4-甲硫基-2-羟基丁脲更可取，所述的 4-甲硫基-2-羟基丁脲能够制备外消旋的蛋氨酸羟基类似物。这种蛋氨酸衍生物的制备技术能够避免生成大量的无机副产物，由于涉及到环境保护的限制，排放这些副产物越来越成问题。

在本发明的范围内，这些酶在 pH 为 4-11 时具有脲水解酶的活性，pH 为 5-9 时其活性最大。最佳使用温度是 30-60 °C，不过在 30-50 °C 使用这些酶更好。

在原料溶液中，脲的可取浓度为每升 10-400 毫摩尔，优选的是每升 50-200 毫摩尔。得到的酸的铵盐浓度在其浓度低于每升 2 摩尔时，优选的是每升 0.1-1.5 摩尔时不太影响这种酶的活性。

可通过下述的实施例更完整地说明本发明，这些实施例不应看作是对本发明的限制。

实施例 1

在下述的介质中培养粪产碱杆菌 ATCC8750 微生物：

乙酸铵	10 克/升
酵母提取物	5 克/升

胨	5 克/升
K ₂ HPO ₄	5 克/升
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 克/升
FeSO ₄ · 7H ₂ O	30 毫克/升
NaCl	1 克/升
苯基胍	0.5 克/升

pH7.2

在 2 升装 600 毫升这种介质的锥形瓶中于 30 ℃ 进行所述的培养。整个溶液以每分钟 150 转搅拌 30 小时。回收细胞沉淀物，用 9 克/升氯化钠溶液洗涤，然后冷冻。

丁腈水解的操作条件如下：

4-甲硫基-2-羟基丁腈	50mM
细胞	5 毫克/毫升
磷酸盐缓冲液	200mM
温度	30 ℃
时间	4 小时

4-甲硫基-2-羟基丁腈水解动力学研究表明，线性生成每小时每毫克干细胞 2.8 微摩尔蛋氨酸羟基类似物。生成的酸的对映体过量是用液相色谱测定的，酸的产率为 80 % 时，其对映体过量是 0 %。

实施例 2

根据用自由的细胞在 180 小时生成蛋氨酸羟基类似物的动力学评价酶的稳定性。

这些操作条件如下：

4-甲硫基-2-羟基丁腈	100mM
细胞	10 毫克/毫升
磷酸盐缓冲液	300mM 5 毫升
温度	25 ℃

在排干后接着加 100mM 腈。生成相应的酸列于表 1：

时间	生成的酸	活性
----	------	----

小时	mM/升	微摩尔/小时·毫克干细胞
0	0	0
2	39	1.7
17	230	1.3
24	312	1.7
47	466	1.2
70	556	0.4
172	860	0.6
180	940	0.6

起始活性是每小时每毫克干细胞 2 微摩尔。尽管酸的浓度很高(0.9M 氨基酸羟基类似物), 但这个实施例仍证明了酶的稳定性。

实施例 3

在下述条件下还测定了酶的稳定性随底物量和生成的酸量的变化:

酶的稳定性随底物量的变化

脲

表中的结果

细胞

10 毫克/毫升

磷酸盐缓冲液 300mMpH7.0

5 毫升

温度

25 °C

时间

1 小时

脲浓度 mM	活性 微摩尔/小时·毫克干细胞
50	2
100	2
150	2
200	2
500	0

酶的稳定性随生成酸量的变化关系

操作条件如下:

脲 50mM
细胞 2.5 毫克/毫升
磷酸盐缓冲液 100mMpH7.0 1 毫升
温度 30 ℃
时间 2 小时

酸浓度 mM	活性 微摩尔/小时·毫克干细胞
0	3.2
100	4.5
200	3.8
300	4.1
400	4
500	4
600	3.4
700	2.8

实施例 4

脲水解酶的纯化

在实施例 1 描述的介质中于 30 ℃ 培养粪产碱杆菌细胞 24 小时。

在离心分离培养物后，将沉淀物溶于所述的 pH7.5 缓冲液[25mMtrisHCl,10 % (重量/体积)甘油]中。这种细胞悬浮液用超声波处理，然后离心得到粗提取物。再用最高为 30 % 饱和度的硫酸铵处理这种粗提取物。得到的沉淀在 pH7.5 缓冲液中再制成悬浮液，然后对 2 升同样的缓冲液透析一夜。

然后，将得到的溶液放到预先用所述的 pH7.5 缓冲溶液平衡的 Q Sepharose Fast Flow HR 26/10[®] 阴离子交换柱中。再用 0-1 摩尔梯度氯化钠

溶液淋洗其活性物。

然后,将这些活性馏分放到预先用所述的 pH7.5 缓冲溶液平衡的 Mono Q HR 5/5[®]阴离子交换柱中。再用 0-1 摩尔梯度氯化钠溶液淋洗其腈水解酶。

为了完成其纯化,合并含有活性物的馏分,然后加 1 摩尔硫酸铵。将这种溶液放到预先用被加入 1 摩尔(NH₄)₂SO₄的所述 pH7.5 缓冲溶液平衡的 Phenyl Sepharose HR 5/5[®]疏水相互作用柱中。再用 1-0 摩尔梯度硫酸铵溶液淋洗其活性物。

用凝胶过滤法测定其蛋白质的分子量。其分子量是约 260kDa 。在 SDS-PAGE 柱上,观察到唯一的 43kDa 带(纯度为 95 %)。

用粪产碱杆菌的腈水解酶将 4-甲硫基-2-羟基丁腈水解成蛋氨酸羟基类似物的动力学是线性的。

时间 小时	活性 微摩尔/小时·毫克蛋白质	RR %
0	0	1
0.5	150	3
1	171	5
21.5	150	68
24.8	150	77
29	150	87

实施例 5 pH 的影响

操作条件如下:

腈	50mM
蛋白质	50 微克/毫升
pH4-5、 100mM 乙酸盐缓冲液	
pH6-7、 100mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
pH8-9、 100mM TRIS-HCl 缓冲液	

pH10-11、100mM 硼酸盐缓冲液

温度 30 ℃

时间 1-2 小时

pH	活性 微摩尔/小时·毫克蛋白质
4	0
5	42
6	232
7	272
8	405
9	412
10	158
11	0

实施例 6 温度的影响

操作条件如下:

脲 50mM

蛋白质 50 微克/毫升

pH7.0、100mM 磷酸盐缓冲液

温度 4-60 ℃

时间 1 小时

这种酶最佳的作用温度是 50 ℃

温度 ℃	活性 微摩尔/小时·毫克蛋白质
4	45
10	67
20	140

30	272
40	419
50	570
60	333

扁桃腈的对比实施例

操作条件如下:

扁桃腈 7mM
 蛋白质 5 微克/毫升
 磷酸盐缓冲液 100mM pH7.0 1 毫升
 温度 30 °C

时间 分	活性 微摩尔/小时 · 毫克蛋白质	ee
15	1000	1
60	1030	1

因此, 纯化的腈水解酶对这种扁桃腈是对映选择性的, 而对 4-甲硫基-2-羟基丁腈没有对映选择性。

实施例 7

用红球菌 sp.HT 29-7 FERM BP-3857 水解 4-甲硫基-2-羟基丁腈
 在下述介质中培养红球菌 sp.HT-29-7 FERM BP-3857 微生物:

甘油 20 克/升
 酵母提取物(DIFCO) 3 克/升
 KH₂PO₄ 1 克/升
 Na₂HPO₄ · 12H₂O 4.4 克/升
 Na₂SO₄ 2.8 克/升
 MgCl₂ · 6H₂O 0.85 克/升
 CaCl₂ · 2H₂O 0.05 克/升

MnSO ₄ · H ₂ O	0.033 克/升
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.013 克/升
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.005 克/升
苯基氰	0.5 克/升

pH7.5

在 2 升装 600 毫升这种介质的锥瓶中于 30 ℃ 进行培养。所有溶液均以每分钟 150 转搅拌 140 小时。回收细胞沉淀，用 9 克/升氯化钠溶液洗涤，然后冷冻。

水解时 pH 的影响:

操作条件如下:

4-甲硫基-2-羟基丁腈	100mM
660nm 处光密度	15
pH4-5、100mM 乙酸盐缓冲液	
pH6.0-7.0、100mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
pH8.0-9.0、100mM TRIS-HCl 缓冲液	
pH10.0-11.0、100mM 硼酸盐缓冲液	
温度	30 ℃
时间	10 小时

pH	酸的产率
4	0%
5	100%
6	100%
7	100%
8	100%
9	100%
10	20%
11	0%

实施例 8 底物浓度的影响

在下述条件下还测定了这种酶的稳定性随底物量的变化:

4-甲硫基-2-羟基丁腈	见表中的结果
660nm 处光密度	20
pH7.0、300mM 磷酸盐缓冲液	5 毫升
温度	30 ℃
时间	2 小时

腈浓度 mM	酸的产率
50	90%
100	44%
200	22%
300	10%
400	0%
500	0%

实施例 9 这种酶的稳定性随生成的酸量的变化

操作条件如下:

4-甲硫基-2-羟基丁腈	100mM
660nm 处光密度	15
pH7.0、300mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
温度	30 ℃
时间	6 小时

酸浓度 mM	酸的产率
0	100%
200	100%

400	100%
600	100%
800	100%
1000	100%

实施例 10 对映体过量

4-甲硫基-2-羟基丁腈	140mM
660nm 处光密度	14
pH7.0、100mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
温度	20 ℃

培养时间	酸产率	光学纯度
2 小时	15 %	0
6 小时	50 %	0
24 小时	100 %	0

4-甲硫基-2-羟基丁腈水解动力学研究表明，每小时每毫克干细胞线性生成蛋氨酸羟基类似物。生成的酸的对映体过量是用液相 色谱法测定的，酸的产率为 15-100 % 时，其对映体过量为 0 %。

实施例 11 温度的影响

操作条件如下：

4-甲硫基-2-羟基丁腈	100mM
660nm 处光密度	15
pH7.0、100mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
温度	见表
时间	6 小时

T(℃)	酸的产率
10	70 %
20	100 %

30	100 %
40	100 %
50	31 %
60	15 %

实施例 12 4-甲硫基-2-氨基丁腈的水解

操作条件如下:

4-甲硫基-2-羟基丁腈	23mM
660nm 处光密度	15
pH7.0、100mM 磷酸盐缓冲液	1 毫升
温度	30 ℃

时间(小时)	酸的产率	酸对映体过量
0.5	40%	未测定
1	51%	0.12
2	62%	未测定
5	78%	0.15

实施例 13

Gordona terrae MA-1(FERM BP-4535)使用的培养条件如下:

甘油	10 克/升
酵母提取物	0.4 克/升
KH ₂ PO ₄	6.8 克/升
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7.1 克/升
Na ₂ SO ₄	2.8 克/升
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 克/升
CaCl ₂ · 2H ₂ O	40 毫克/升
MnSO ₄ · H ₂ O	4 毫克/升
FeCl ₃	0.6 毫克/升

ZnSO₄ 0.3 毫克/升
苯基氰 0.5 克/升
pH7.2

酶的活性

然后，洗涤培养的细胞，在羟基甲硫基丁腈存在下进行活性物数量测定。

操作条件如下：

[腈] = 23mM；
[细胞] = 6.8 克/升；
100mM 磷酸盐缓冲液
pH7.0； 35 °C

图 1：用 Gordona terrae MA-1 水解 AMTP 的氰醇

羟基甲硫基丁腈水解动力学是线性的。起始速度估计为 13mM/小时. 克干细胞。

实施例 14 AMTP 氰醇浓度对腈水解酶的影响

测定了羟基甲硫基丁腈起始浓度对腈水解酶活性的影响，这些结果列于下表中。

操作条件如下：

[细胞] = 5.1 克/升
100mM 磷酸盐缓冲液
pH7.0;35 °C

测定了在 0.5、1、2 和 3 小时的动力学。

腈浓度 mM	活性 mM/小时.克干细胞
50	14
100	13
200	15

300	0
400	0

直到 200mM，其活性不太随底物的浓度改变。

实施例 15 蛋氨酸羟基类似物浓度对脲水解酶的影响

在这个试验中，我们研究了 4-羟基-2-甲硫基丁酸铵浓度对脲水解酶活性的影响。

其操作条件如下：

[细胞] = 5 克/升；

[脲] = 100mM；

100mM 磷酸盐缓冲液； pH7.0；

35 °C

羧酸铵的浓度为 0-1.5M。

酸浓度 摩尔/升	活性 微摩尔/小时.毫克干细胞
0	9.4
0.5	14
1	19
1.5	15

4-羟基-2-甲硫基丁酸铵浓度根本不改变 Gordona terrae HT 29 - 7 菌株脲水解酶的起始活性。

实施例 16 pH 和温度的影响

操作条件如下：

[脲] = 100mM；

[细胞] = 7.5 克/升；

pH4-5、100mM 乙酸盐缓冲液

pH6-7、100mM 磷酸盐缓冲液

pH8-9、100mMTRIS-HCl 缓冲液

pH10-11、100mM 硼酸盐缓冲液

30 ℃;测定了在 1、2、4 和 6 小时的动力学。

pH	活性 微摩尔/小时.克干细胞
4	0.6
5	2.5
6	7.8
7	9.6
8	15.3
9	18
10	5.7
11	11

最佳 pH 在我们的操作条件下处在 8-9 附近。

温度对 Gordona terraeMA-1 的脲水解酶活性的影响。

操作条件如下:

[脲] = 100mM;

[细胞] = 7.5 克/升;

100mM 磷酸盐缓冲液;pH7.0;

测定在 1 小时的动力学。

T ℃	活性 微摩尔/小时.克干细胞
10	0.6
20	2.3
30	3.2
40	3.4

50	3.5
60	1.9

最佳温度在 40-50 ℃。

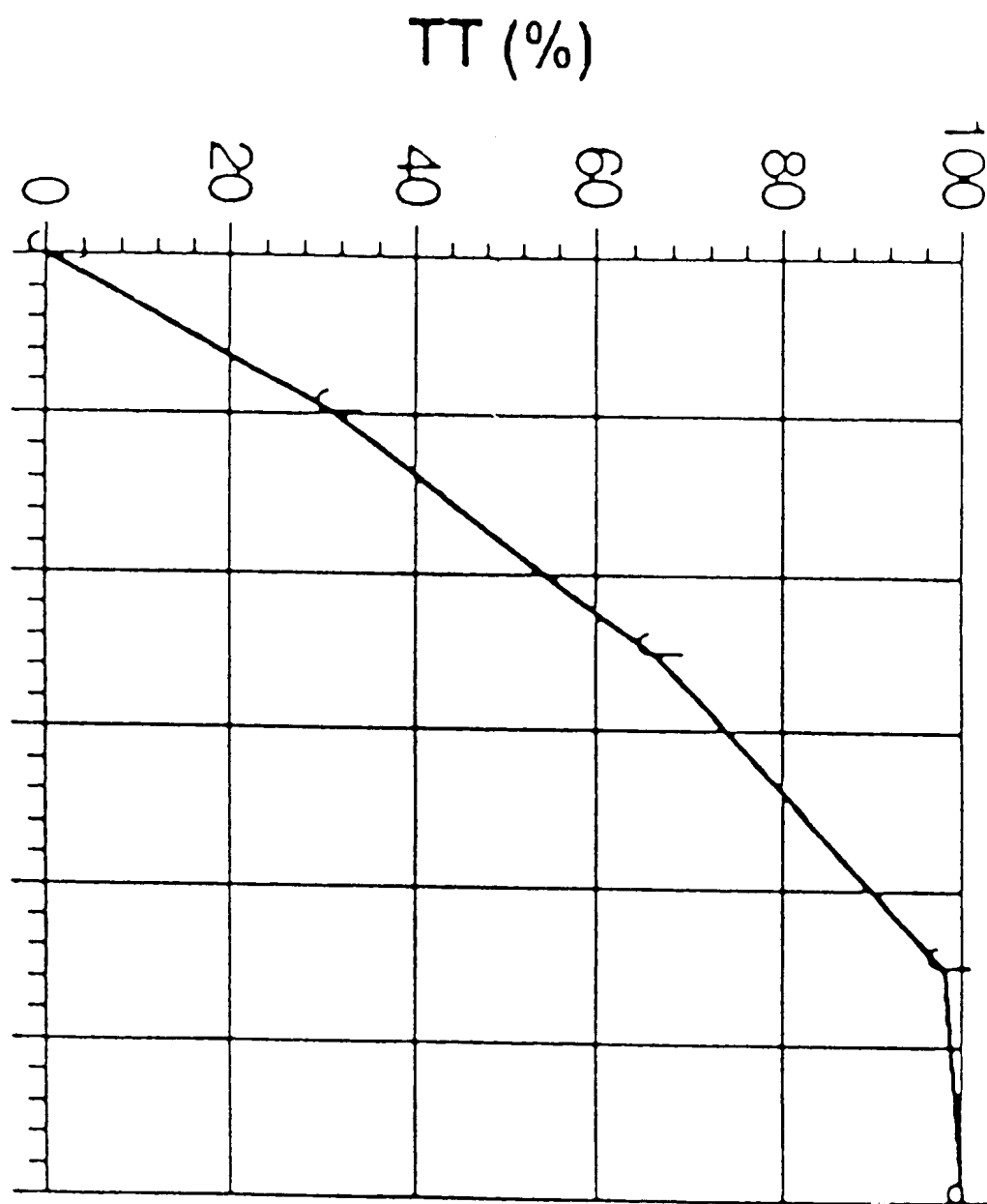


图 1