

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97195182.9

C12N 1/20

C12N 9/80

C12P 13/00

C12P 13/02

C12P 41/00

C07C233/23

C12R 1/01

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1224697C

[22] 申请日 1997.5.30 [21] 申请号 97195182.9

[30] 优先权

[32] 1996. 5.30 [33] CH [31] 1359/96

[32] 1997. 2.10 [33] CH [31] 282/97

[32] 1997. 4.18 [33] CH [31] 908/97

[86] 国际申请 PCT/EP1997/002838 1997.5.30

[87] 国际公布 WO1997/045529 德 1997.12.4

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.30

[71] 专利权人 隆萨股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 C·贝尔内格-埃格利

O·M·伯奇 P·博萨尔

W·布林顿 F·布鲁克斯

K·比尔戈夫 L·迪克

K-S·埃特 I·格吉斯伯格

M·索泰 E·M·于尔邦

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

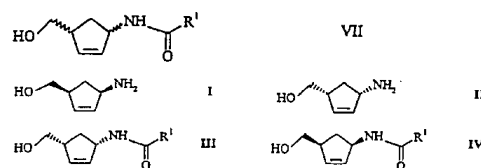
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图 2 页

[54] 发明名称 氨基醇及其衍生物的制备方法

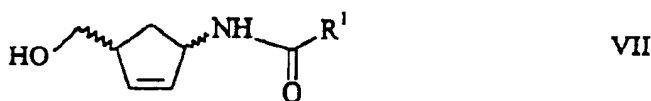
[57] 摘要

本发明涉及一种新的微生物，它能够利用通式 (VII) 的环戊烯衍生物作为唯一的氮源、或唯一的碳源、或唯一的氮源和碳源，通式中的 R¹ 表示 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、芳基或芳氧基。本发明还涉及一些新的酶，它们能水解通式 (VII) 的环戊烯衍生物。本发明还涉及以下物质的新制备方法：通式 I 和 II 的 (1R, 4S) - 或 (1S, 4R) - 1 - 氨基 - 4 - (羟甲基) - 2 - 环戊烯和/或通式 III 或 IV 的 (1S, 4R) - 或 (1R, 4S) - 氨基醇衍生物，通式中的 R¹ 表示 C₁-C₄ 烷基。



ISSN 1008-4274

1. 一种微生物，其特征在于该微生物能够利用选自以下通式化合物的环戊烯衍生物作为唯一的碳源、或唯一的氮源、或唯一的碳源和氮源，



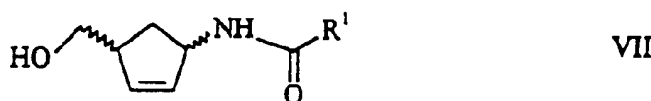
5

其中 R' 表示 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、苯基，苄基，苯氧基或苄氧基。

2. 根据权利要求 1 所述的微生物，其中的微生物属于红球菌属、戈登氏菌属、节杆菌属、产碱杆菌属、土壤杆菌/根瘤菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属或产碱杆菌属/博德特氏菌属。

10 3. 根据权利要求 1 所述的微生物，其中的微生物选自以下菌株：具体的种是产碱杆菌/博德特氏菌 DSM 11172、erythropolis 红球菌 DSM 10686、节杆菌 DSM 10328、红球菌 DSM 11291、反硝化 xylosoxydans 产碱杆菌 DSM 10329、土壤杆菌/根瘤菌 HSZ30、单纯芽孢杆菌 K2、恶臭假单胞菌 K32 或戈登氏菌 DSM10687。

15 4. 具有 N-乙酰氨基-醇水解酶活性的酶，来自权利要求 1 至 3 中任一项所述的微生物，它们能够水解选自以下通式化合物的环戊烯衍生物



其中，R' 表示 C₁-C₄ 烷基，C₁-C₄ 烷氧基，苯基，苄基，苯氧基或苄氧基。

5. 根据权利要求 4 所述的酶，其特征在于，

a) 最适 pH 为 7.0±1.0；

20 b) pH7.0 时的最适温度为 25 至 30℃ 之间；

c) 对底物 1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的 K_m 是 22.5±7.5mM，所述 K_m 在 30℃，100mM pH7.0 的磷酸盐缓冲液中测得。

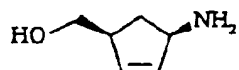
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的酶，其特征还在于：

d) N 末端的氨基酸序列为 Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-

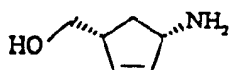
25 Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn；

e) 经 SDS-PAGE 测定的分子量为 50kD。

7. 制备以下物质的方法：通式 I 和 II 的 (1R, 4S)-和/或 (1S, 4R)-1-氨基-4-(羟-甲基)-2-环戊烯



I

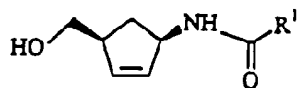


II

和/或通式 III 和 IV 的 (1S, 4R)-和/或 (1R, 4S)-氨基醇衍生物:



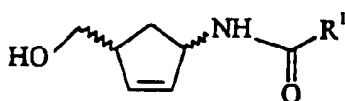
III



IV

其中 R¹ 表示 C₁-C₄ 烷基, C₁-C₄ 烷氧基, 苯基, 苄基, 苯氧基或苄氧基, 该方法包括:

- 5 借助权利要求 1 所述的微生物或借助权利要求 4 所述的酶和/或青霉素 G 酰基转移酶将通式 VII 的环戊烯衍生物,

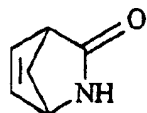


VII

其中 R¹ 如前所述转化成通式 I 和/或 II 的化合物, 并适当分离该转化产生的上述化合物、和/或产生的通式 III 和/或 VI 的氨基醇衍生物。

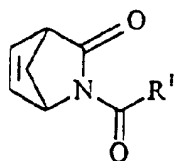
- 10 8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 通式 VII 的环戊烯衍生物, 其中的 R¹ 如前所述的制备方法如下:

第一步, 酰化通式 V(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮,



V

得到通式 VI(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的衍生物

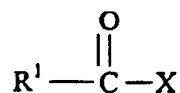


VI

15

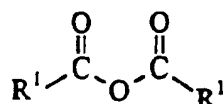
其中 R¹ 如前所述, 第二步, 利用碱金属或碱土金属的硼氢化物、碱金属或碱土金属铝氢化物和/或 Vitride 将此化合物还原成通式 VII 的环戊烯衍生物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于第一步的酰化是用通式 VIII 的羰基卤化物进行的



VIII

其中的 X 表示卤原子, R¹ 如前所述, 或者用通式 IX 的羧酸酐进行



IX

其中 R¹ 如前所述。

- 5 10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法, 其特征在于第一步酰化反应在 -80℃ 至 50℃ 之间进行。

11. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法, 其特征在于第二步还原反应在 -40℃ 至 40℃ 温度之间进行。

12. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法, 其特征在于第一步的酰化是在非质子
10 传递性溶剂中进行的。

13. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法, 其特征在于, 第二步中的还原是在质子传递性溶剂中进行的。

14. 根据权利要求 7 至 9 中任一项所述的方法, 其特征在于, 通式 VII 的环
戊烯衍生物的反应是用红球菌属、戈登氏菌属、节细菌数、产碱杆菌属、土壤杆
15 菌/瘤杆菌属、芽孢杆菌属、假单孢菌属或产碱杆菌/博德特氏菌属的微生物进行的。

15. 根据权利要求 7 至 9 中任一项所述的方法, 其特征在于, 通式 VII 的环戊烯衍生物的反应是用巨大芽孢杆菌或大肠杆菌的青霉素 G 酰基转移酶进行的。

16. 根据权利要求 7 至 9 中任一项所述的方法, 其特征在于, 第三步中的反
20 应是在温度 20 至 40℃, 在 pH5 至 9 中进行的。

氨基醇及其衍生物的制备方法

本发明涉及以下通式的(1R, 4S)-或(1S, 4R)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯,

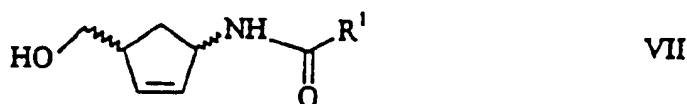


和/或以下通式的(1S, 4R)-或(1R, 4S)-氨基醇衍生物:



的新制备方法。

并涉及能够利用以下通式的环戊烯衍生物作为唯一氮源, 或唯一碳源, 或即作为唯一氮源又作为唯一碳源的微生物:



本发明还涉及从上述微生物获得的具有 N-乙酰基氨基醇水解活性的酶提取物和酶。

结构式 I 的(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯是用于制备环碳核苷(例如 Carbovir®)的一种重要中间体。(Campbell 等, 有机化学杂志(J. Org. Chem.)1995, 60, 4602-4616).

Campbell 等(见上文)和 Park K. H.与 Rapoport H.(有机化学杂志(J. Org. Chem.)1994, 59, 394-399)对(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的制备方法进行了说明。

上述方法所用的前体是 D-葡萄糖酸-δ-内酯或 D-丝氨酸, 而且需要约 15 步合成步骤来形成(1R, 4S)-N-叔丁氧基-羰基-4-(羟甲基)-2-环戊烯, 后者然后经去保护形成(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯。上述两种方法成本高、复杂、而且不能进行产业化生产。

WO93/17020 说明了一种(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的制备方法, 其中用氢化锂铝还原(1R, 4S)-4-(氨基)-2-环戊烯-1-羧酸得到所需的产物。

上述方法的缺点在于,一方面,环戊烯环的双键也被还原了,氢化锂铝难以处理,另一方面,成本过高。

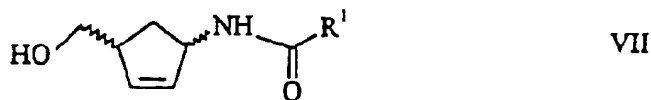
Taylor, S. J. 等(Tetrahedron: Asymmetry Vol.4, No. 6, 1993, 1117-1128)说明了一种由前体(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮制备(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的方法。其中,利用青枯假单孢菌或荧光假单孢菌将此前体转化成(1R, 4S)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮,继而用二-叔丁基二碳酸酯转化成(1R, 4S)-N-叔丁氧基羰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮,再用硼氢化钠和三氟乙酸还原成所需的产物。该方法的成本太高。

此外, Martinez 等(J. Org. Chem. 1996, 61, 7963-7966)说明了一种由二乙基二烷基丙二酸酯合成(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的十步法。该方法也存在复杂和不能产业化的缺点。

本发明的目的之一是提供一种简单的制备(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的方法。该目的是利用本发明的微生物、及其酶提取物,和方法实现的。

本发明的微生物可以借助常规微生物技术从土壤标本、淤泥或废水中分离得到。

该微生物的分离根据本发明如下进行,即按照常规方法将其培养在含有以下通式的一种或多种环戊烯衍生物的营养培养基中:



其中的 R¹ 表示 C₁-C₄ 烷基, C₁-C₄ 烷氧基、芳基或芳氧基, 此类化合物被作为:

- 唯一的碳源和氮源
- 唯一的氮源, 辅以合适的碳源, 或者
- 唯一的碳源, 辅以合适的氮源。

例如, 作为 C₁-C₄ 烷基, 可用甲基、乙基、丙基、异丙基或丁基。作为 C₁-C₄ 烷氧基, 可用甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基或叔丁氧基。作为芳基, 可用苯基或苄基。优选的是苄基。作为芳氧基, 可用苄氧基或苯氧基。所以, 以下例子适合作为通式 VII 的环戊烯衍生物: 1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯, 1-丁酰-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯或 1-苯乙酰-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯。

通过培养微生物,从所得培养物中选择出利用通式 VII 环戊烯衍生物(1R, 4S)异构体作为唯一氮源、作为唯一碳源或作为唯一氮源和碳源的微生物。

该微生物可以利用合适的氮源例如铵、硝酸盐、氨基酸或脲作为生长基质。微生物可以利用合适的碳源例如糖、糖醇、C₂-C₄羧酸或氨基酸作为生长基质。葡萄糖之类己糖或戊糖可用作糖。例如乙二醇可用作糖醇。乙酸或丙酸可用作 C₂-C₄羧酸。亮氨酸、丙氨酸、天冬酰胺可用作氨基酸。

- 5
- 培养基的选择是该领域熟练技术人员的常规技能，例如表 1 所示的培养基或完全培养基(含有酵母提取物的培养基)，优选的是用表 1 所示的培养基。
- 在培养和选择过程中，宜对微生物的活性酶进行诱导。通式 VII 的环戊烯衍生物可用作酶诱导物。

- 10
- 培养和选择一般在 20℃至 40℃进行，以 30℃至 38℃为佳，在 pH5.5 至 8.0 进行，以 6.8 至 7.8 为佳。

- 15
- 优选的微生物是红球菌属、戈登氏菌属(Gordona)、节细菌属、产碱杆菌属、土壤杆菌/根瘤菌属、芽孢杆菌属、假单孢菌属或产碱杆菌属/博德特氏菌属，具体的菌种是 erythropolis 红球菌 CB 101(DSM 10686)、产碱杆菌/博德特氏菌 FB188(DSM 11172)、HSZ5 种节细菌(DSM 10328)、FB387 种红球菌(DSM 11921)、xylosoxydans 产碱杆菌反硝化 HSZ17 亚种(DSM 10329)、土壤杆菌/根瘤菌 HSZ30、单纯芽孢杆菌 K2、恶臭假单孢菌 K32 或 CB100 种戈登氏菌(DSM10687)，以及它们的功能相当的变异株或突变株。以上菌种根据布达佩斯条约在德意志微生物保存中心进行了保存，DSM10686 和 DSM10687 保存于 1996 年 5 月 20 日，DSM10328 和 DSM10329 保存于 1995 年 11 月 6 日，DSM11291 保存于 1996 年 10 月 8 日，DSM11172
- 20
- 保存于 1996 年 9 月 20 日。

“功能相当的变异株或突变株”指与原始微生物具有基本相同的特性和功能的微生物。这种变异株和突变株可以随机地通过例如 UV 辐射产生。

产碱杆菌/博德特氏菌 FB188(DSM 11172)的分类学描述

细胞形态	杆状
宽度(微米)	0.5- 0.6
长度(微米)	1.0-2.5
运动性	+
鞭毛构成	周鞭毛
革兰氏反应	-
3%KOH 水解	+
氨基肽酶(Cerny)	+

芽孢	-
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
ADH(醇脱氢酶)	-
从 NO ₃ 到 NO ₂	-
反硝化	-
脲酶	-
明胶水解	-
用以下物质形成酸(被测的):	
葡萄糖	-
果糖	-
阿拉伯糖	-
己二酸盐(酯)	+
癸酸盐(酯)	+
柠檬酸盐(酯)	+
苹果酸盐(酯)	+
甘露醇	-

erythropolis 红球菌 CB 101(DSM 10686)的分类学描述

1.菌落的形态与颜色: 短分支状菌丝, 衰老时分裂成短杆和小球, 菌落有光泽且部分融合, 米色略带粉红, RAL1001;

2.肽聚糖的诊断(diagnosed)氨基酸: 内消旋二氨基庚二酸(mesodiaminopimelic acid);

3.分支菌酸: 红球菌分支菌酸; 对分支菌酸长度(C₃₂-C₄₄)的测定以及将其资料与 DSM 分支菌酸资料库中的目录相比较, 发现其结构与 erythropolis 红球菌极其相似(相似率为 0.588).

4.脂肪酸结构: 非分支链、饱和及不饱和脂肪酸加上结核硬脂酸.

5.根据对该菌种 16S rDNA 的部分测序, 发现与 erythropolis 红球菌特有区域的序列具有高度一致性(100%).

以上鉴定结果是明确的, 因为三种相互独立的方法(分支菌酸、脂肪酸、16SrDNA 测序)均将该菌种归于 erythropolis 红球菌菌种.

CB100 种戈登氏菌(DSM10687)的分类学描述

1.菌落的形态与颜色：短分支状菌丝，衰老时分裂成短杆和小球，菌落有光泽且部分融合，菌落呈浅黄色，(RAL2008)；

2.肽聚糖的诊断(diagnosed)氨基酸：内消旋二氨基庚二酸；

3.甲基萘醌类结构：MK-9(H₂)100%

4.分支菌酸：戈登氏菌分支菌酸；利用高温气相色谱测定分支菌酸链长度(C₅₀-C₆₀)，该结构与戈登氏菌代表性菌种中的结构相对应。

5.脂肪酸结构：非分支链、饱和及不饱和脂肪酸加上结核硬脂酸。

6.根据对该菌种 16S rDNA 的部分测序，发现与 *rubropertincta* 戈登氏菌特有区域的序列只有较低的一致性(98.8%)。

根据所得结果(甲基萘醌类、分支菌酸、脂肪酸、16S rDNA)，虽然该分离株可以明确归于戈登氏菌属，但是根据已有的结果无法归入戈登氏菌属下的已知菌种，所以，假设 DSM10687 菌株为一新的、从未描述过的戈登氏菌种。

xylosoxydans 产碱杆菌反硝化 HSZ17 亚种(DSM 10329)的分类学描述

该菌株特征：

细胞形态	杆状
宽度(微米)	0.5- 0.6
长度(微米)	1.5-3.0
运动性	+
鞭毛构成	周鞭毛
革兰氏反应	-
3%KOH 水解	+
氨基肽酶(Cerny)	+
芽孢	-
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
无氧生长	-
ADH(醇脱氢酶)	+
从 NO ₃ 到 NO ₂	+
反硝化	+
脲酶	-
以下物质的水解：	

明胶	-
吐温 80	-
用以下物质形成酸(被测的):	
葡萄糖, 无氧	-
木糖 80	-
基质的利用	
葡萄糖	-
果糖	-
阿拉伯糖	-
柠檬酸盐(酯)	+
苹果酸盐(酯)	+
甘露醇	-

HSZ5 种节细菌(DSM 10328)的分类学描述

特征:	革兰氏阳性; 不规则杆状, 具有明显杆状-球状生长周期; 严格厌氧; 不由葡萄糖产酸或产气.
运动性	-
芽孢	-
过氧化氢酶	+
细胞壁内的内消旋二氨基庚酸:	无
肽聚糖类型:	A3 α , L-Lys-L-Ser-L-Thr-L-Ala
16S rDNA 序列相似性:	根据对可变性最高区域的测序, 与 pascens 节细菌、ramosus 节细菌和 oxydans 节细菌的一致性最高值为 98.2%

土壤杆菌/根瘤菌 HSZ30 的分类学描述

细胞形态	多形杆状
宽度(微米)	0.6-1.0
长度(微米)	1.5-3.0
革兰氏反应	-

3%KOH 水解	+
氨基肽酶(Cerny)	+
芽孢	-
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
运动性	+
无氧生长	-
将硝酸根转化成亚硝酸根	-
反硝化	-
脲酶	+
明胶水解	-
用以下物质形成酸(被测的):	
L-阿拉伯糖	+
半乳糖	-
松三糖	-
岩藻糖	+
阿糖醇	-
甘露醇	-
赤藓醇	-
石蕊乳液的碱化	+
酮乳糖(ketolactose)	-

其 16S rDNA 的部分测序发现, 与土壤杆菌和根瘤菌属下代表性菌种具有较大的相似性, 约 96%。但是不可能将其明确归入这两属菌种。

单纯芽孢杆菌 K2 的分类学描述

细胞形态	杆状
宽度(微米)	0.8-1.0
长度(微米)	3.0-5.0
芽孢	-
椭圆形	-
圆形	-
芽孢囊	-

过氧化氢酶	+
无氧生长	-
VP 反应	n.g.
最高温度	
生长为阳性的温度℃	40
生长为阴性的温度℃	50
在 pH7.5 的培养基中的生长	-
2%NaCl	+
5%	-
7%	-
10%	-
溶菌酶培养基	+
用以下物质形成酸(ASS):	
D-葡萄糖	+
L-阿拉伯糖	+
D-木糖	-
D-甘露醇	+
D-果糖	+
利用果糖产气	-
卵磷脂酶	-
对以下物质的水解:	
淀粉	+
明胶	+
酪蛋白	-
吐温 80	+
七叶苷	-
对以下物质的利用:	
柠檬酸	+
丙酸	-
将硝酸根转化成亚硝酸根	+
吡啶	-
苯丙氨酸脱氨酶	-

精氨酸脱氢酶

对产生的细胞脂肪酸的分析明确将其归入芽孢杆菌属.

16S rDNA 的部分测序揭示与单纯芽孢杆菌相似性 100%.

恶臭假单孢菌 K32 的分类学描述

细胞形态	杆状
宽度(微米)	0.8-0.9
长度(微米)	1.5-4.0
运动性	+
鞭毛构成	极性(polar)>1
革兰氏反应	-
3%KOH 水解	+
氨基肽酶	+
芽孢	-
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
无氧生长	-
色素	
荧光颜料	+
绿脓菌素	-
ADH	+
从硝酸根转化成亚硝酸根	-
反硝化	-
脲酶	-
明胶的水解	-
基质的利用:	
己二酸盐(酯)	-
柠檬酸	+
苹果酸	+
D-苯乙醇酸盐(酯)	+
苯乙酸酯	+
D-酒石酸盐(酯)	-

D-葡萄糖	+
海藻糖	-
甘露醇	-
苯甲酰甲酸盐(酯)	-
丙二醇	+
丁胺	+
苜胺	+
色胺	-
乙酰胺	+
马尿酸	+

细胞脂肪酸特性属于典型的恶臭假单孢菌。

16S rDNA 部分测序揭示与门多萨假单孢菌和产碱假单孢菌相似性约 98%，与恶臭假单孢菌的相似性为 97.4%。

FB387 种红球菌(DSM 11291)的分类学描述

1.菌落形态与颜色：短分支菌丝，衰老时分裂成杆体和球体，菌落不光滑，浅红色-橙色 RAL2008；

2.肽聚糖的诊断(diagnosed)氨基酸：内消旋二氨基庚二酸；

3.分支菌酸：红球菌分支菌酸；对分支菌酸长度(C₃₂-C₄₄)的测定及将所得数据与 DSMZ 分支菌酸数据库中的目录相比较发现，与 ruber 红球菌菌种的结构只有很小的相似性(相似性 0.019)。这样低的相关系数不能用以进行菌种的鉴定。

4.脂肪酸结构：非分支链、饱和及不饱和脂肪酸加上结核硬脂酸。这样的脂肪酸结构可用于所有的红球菌属及与之密切相关菌属的(例如分支杆菌属、诺卡菌属和戈登氏菌属)代表性菌种的确认。我们试图测定脂肪酸结构的定性和定量差异，以期进行菌种水平的区分。使用了多种方法将 FB387 种红球菌的脂肪酸特征与数据库中的目录比较。用这种方法不可能确定 FB387 种红球菌的种属，因为它与任何已知红球菌属下的菌种相似性都很小(0.063)。

5.根据对该菌种 16S rDNA 的部分测序，96-818 以 97.9%的相关性被确认为红球菌。这一序列的一致性远低于分类学上明确菌种分类所要求的 99.5%。

根据所得结果，可以假设 FB87 种红球菌株为一新的、从未被描述过的红球菌菌种。

22

本发明的酶，即能够水解上述通式 VII 环戊烯衍生物的 N-乙酰氨基-醇水解

酶, 可以通过以技术人员所知常规方法裂解本发明微生物细胞获得。例如, 可用超声波法或弗氏(French)压碎法。这类酶可以从例如 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)获得。可以从本发明微生物, 尤其是 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)获得的酶宜具有以下特性:

- a) 最适 pH 为 $\text{pH}7.0 \pm 1.0$;
- b) 最适温度在 pH7.0 时是 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间;
- c) 对底物 1-乙酰氨基-羟甲基-2-环戊烯的 K_M 为 $22.5 \pm 7.5\text{mM}$ ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100mM 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}7.0$)。

对得自 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)的酶的序列分析进一步揭示:

- d) N 末端的氨基酸序列为 Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn;

分子量测定发现:

- e) 经 SDS-PAGE 测定, 分子量为 50kD 。

可由本发明微生物例如 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)获得的这类酶, 具体水解(例如)1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯、1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯、1-丙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯和1-异丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯。

本发明制备通式 I 或 II 的(1R, 4S)-或(1S, 4R)-1-氨基-4-(羟基甲基)-2-环戊烯



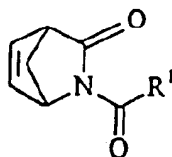
和/或通式 III 或 IV 的(1S, 4R)-或(1R, 4S)-氨基醇衍生物(其中 R^1 为上述含意)



的方法, 可以如下进行(例如), 第一步, 酰化通式 V 的(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮



产生通式 VI 的(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮衍生物

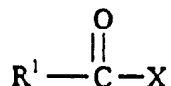


VI

其中 R¹ 的含意如前。

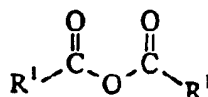
前体(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备在 EP-B 0 508 352 中已公开。

酰化可用通式 VIII 的羰基卤化物来进行



VIII

其中的 X 表示卤原子，R¹ 的含意如前，或者用通式 IX 的羧酸酐进行



IX ,

其中 R¹ 的含意如前。

F、Cl、Br 或 I 可用作卤原子 X。优选的是用 Cl 和 F。

羰基卤化物例子有：乙酰氯、氯乙酰氯、丁酰氯、异丁酰氯、苯乙酰氯、氯甲酸苄酯(Cbz-Cl)、丙酰氯、苯甲酰氯、氯甲酸烯丙酯或氯甲酸叔丁酯。羧酸酐的例子有：二叔丁基二碳酸酯、丁酸酐、乙酸酐或丙酸酐。

酰化反应可以不用溶剂或用非质子传递性(质子惰性)溶剂进行。

酰化反应以在非质子传递性溶剂中进行为佳。合适的非质子传递性溶剂例如吡啶、乙腈、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、甲苯、二氯甲烷、N-甲基吡咯烷酮，或它们的混合物。优选的溶剂是吡啶或乙腈，尤其是吡啶和乙腈的混合物。

酰化反应以在-80℃至50℃进行为佳，0℃至25℃更好。

该方法的第二步，通式 VI 的(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮衍生物被还原产生通式 VII 的环戊烯衍生物



VII

其中 R¹ 的含意如前。

22 还原反应宜用碱金属硼氢化物或碱土金属硼氢化物，碱金属铝氢化物或碱土

金属铝氢化物, 或 Vitride(氢化钠二(2-甲氧基乙氧基)铝)进行. 氢化钠铝或氢化钾铝可用作碱金属铝氢化物. 硼氢化钠或硼氢化钾可用作碱金属硼氢化物. 硼氢化钙可用作碱土金属硼氢化物.

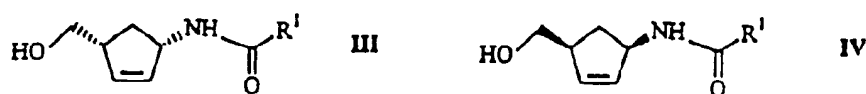
还原反应宜在质子传递性溶剂中进行. 可用的质子传递性溶剂是甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、异丁醇、仲丁醇、叔丁醇之类的较低(分子量)脂肪醇, 或水, 或它们的混合物.

还原反应宜在-40℃至40℃温度之间进行, 0℃至20℃更好.

通式 VII 的环戊烯衍生物向通式 I 或 II 的(1R, 4S)-或(1S, 4R)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯的转化, 根据本发明用微生物或微生物的酶提取物, 用青霉素 G 酰基转移酶, 或用具有 N-乙酰氨基-醇水解酶活性的的酶进行.



这种生物转化不仅生成通式 I 或 II 的(1R, 4S)-或(1S, 4R)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯并在反应适当阶段分离得到, 而且生成通式 III 或 IV 的(1S, 4R)-或(1R, 4S)-氨基醇衍生物



其中 R¹ 的含意如前. 后者也可以同样在反应适当阶段分离得到.

所有利用通式 VII 的环戊烯衍生物作为唯一氮源、唯一碳源或唯一碳源和氮源的微生物都适用. 生物转化宜利用以环戊烯衍生物的(1R, 4S)异构体作为唯一碳源、唯一碳源和氮源或唯一氮源的微生物进行.

生物转化宜利用以下菌属的微生物进行: 产碱杆菌/博德特氏菌属、红球菌属、土壤杆菌属、产碱杆菌属、土壤杆菌属/根瘤菌属、芽孢杆菌属、假单孢菌属或戈登氏菌属, 具体的菌种是产碱杆菌/博德特氏菌 FB188(DSM 11172)、erythropolis 红球菌 CB 101(DSM 10686)、HSZ5 种节细菌(DSM 10328)、FB387 种红球菌(DSM 11291)、xylosoxydans 产碱杆菌反硝化 HSZ17 亚种(DSM 10329)、土壤杆菌/根瘤菌 HSZ30、单纯芽孢杆菌 K2、恶臭假单孢菌 K32 或戈登氏菌(DSM 19687), 以及它们的功能相当的变异株或突变株. 以上菌种如上所述已根据布达佩斯条约进行了保存.

特别适合于本发明方法的微生物菌种是产碱杆菌/博德特氏菌 FB188(DSM

11172)、erythropolis 红球菌 CB 101(DSM 10686)、CB100 种戈登氏菌(DSM 10687)。

在按照常规方法初步培养这些微生物之后,生物转化可用静息细胞(不再需要碳源和能源的非生长细胞)或生长细胞进行。生物转化最好用静息细胞进行。

根据本发明适合于本发明方法的酶,即 N-乙酰氨基-醇水解酶可用上述方法获得,并具有上述特性。

可从多种微生物获取合适的青霉素 G 酰基转移酶,例如从杆菌或放线菌获取,具体地说是:大肠杆菌 ATCC9637、巨大芽孢杆菌、淡紫链霉菌 ATCC13664、诺卡菌 sp. ATCC13635、rettgeri 普罗威登斯菌 ATCC9918、viscosus 节杆菌 ATCC15294、fascians 红球菌 ATCC12975、产褐色链霉菌 ATCC21289、无色杆菌 ATCC23584 和玫瑰色微球菌 ATCC416。可用购得的青霉素 G 酰基转移酶,具体如大肠杆菌(Boehringer Mannheim)或巨大芽孢杆菌的 EC3.5.1.11。

在一优选实施方案中,使用固定化的青霉素 G 酰基转移酶。

生物转化可在该领域常用培养基中进行,例如,在低摩尔浓度的磷酸盐、柠檬酸盐或 Hepes 缓冲液中、在水中、在营养酵母肉汤(NYB)或表中所述完全培养基中进行。生物转化以在表 1 所示的培养基或低摩尔浓度磷酸盐缓冲液中进行为佳。

进行生物转化时,环戊烯衍生物(通式 VII)可以一次性加入或连续加入,其浓度不超过 10 重量%,以 2 重量%为佳。

生物转化过程中的 pH 范围为 5 至 9,以 6 至 8 为佳。生物转化宜在 20℃至 40℃温度进行,以 25℃至 30℃为佳。

- 22 如果在生物转化过程中生成了(1S, 4R)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯,可以通过酸水解,例如用盐酸,将其转化为(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯。

实施例:

实施例 1

(±)-2-乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

在充氮下,将 100g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在乙腈(800ml)和吡啶(161.26ml)中。在 12℃,用 2 小时的时间滴加 104.5g 乙酰氯。混合物然后室温搅拌 4.5 小时。加入 800ml 水,真空蒸发去除乙腈。水相用 400ml 乙酸乙酯萃取 3 次。合并后的有机相用 1N 的 HCl(400ml)、水(400ml)、饱和 NaCl(400ml)洗涤,用硫酸镁干燥,并彻底蒸发。残留物用二氯甲烷吸收并通过硅胶过滤。浓缩滤液

并蒸馏纯化产物.得到 107.76g 产物,呈澄清的液体.得率为 71 % .沸点(0.07torr):
51 °C

¹ H-NMR (CDCl ₃); δ[ppm]	2.25(AB syst., 2H);
400MHz	2.8(s, 3H);
	3.42(m, 1H);
	5.30(m, 1H);
	6.89(m, 1H);
	6.92(m, 1H).

实施例 2

(±)-2-丁酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

充氮下, 将 100.3g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶于乙腈(720ml)和吡啶(142ml)中. 在 12 °C, 用 1 小时的时间滴加 141.8g 丁酰氯. 然后在室温搅拌反应 3 小时, 加入 720ml 水, 真空蒸发去除乙腈. 水相用 300ml 乙酸乙酯萃取 3 次. 合并后的有机相用 1N 的 HCl(350ml)、饱和 NaCl(400ml)和水(500ml)洗涤, 用硫酸镁干燥, 并彻底蒸发. 蒸馏纯化产物. 得到 107.76g, 呈澄清液体. 得率为 85 %.

沸点(0.05torr): 70 °C

¹ H-NMR (CDCl ₃); δ[ppm]	0.98(t, J=8.5Hz, 3H);
400MHz	1.58-1.65(2H);
	2.23(AB syst., 2H);
	2.82-2.90(2H);
	3.42(m, 1H);
	5.30(m, 1H);
	6.62(m, 1H);
	6.90(m, 1H).

实施例 3

(±)-2-苯乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

充氮下, 将 33.4g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶于乙腈(240ml)和吡啶(48.3ml)中. 在 12 °C, 用 30 分钟时间滴加 68.6g 苯基乙酰氯. 混合物然后室温搅拌 3.5 小时, 加入 240ml 水, 真空蒸发去除乙腈. 水相用 150ml 乙酸乙酯萃取 3

次。合并后的有机相用 1N 的 HCl(150ml)、饱和 NaCl(150ml)和水(150ml)洗涤，硫酸镁干燥，并彻底蒸发。粗产物经硅胶(己烷:乙酸乙酯=1:1)过滤。得到 68.34g 粗产物，呈黄色油状。

实施例 4

(±)-2-丙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

充氮下，将 47g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶于乙腈(325ml)和吡啶(41ml)中。在 12 °C，用 1 小时时间滴加 43.9g 丙酰氯。反应物然后室温搅拌 5 小时，加入 145ml 水，真空蒸发去除乙腈。水相用 115ml 乙酸乙酯萃取 3 次。合并后的有机相用 1N 的 HCl(140ml)、饱和 NaHCO₃(40ml)和 NaCl(40ml)溶液洗涤，用硫酸钠干燥，并彻底蒸发。蒸馏纯化残留物。得到 55.8g 标题化合物，静置后固化。得率为 81.6%。

2.8mbar 时的沸点: 75-80 °C

熔点: 54-56 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆); δ[ppm] 0.95(t, 3H);
400MHz 2.10(quart., 1H);
 2.28(quart., 1H);
 2.64(m, 2H);
 3.42(s, 1H);
 5.16(s, 1H);
 6.78(m, 1H);
 6.96(m, 1H).

实施例 5

(±)-2-异丁酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

充氮下，将 45.1g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在乙腈(310ml)和吡啶(39ml)中。在 10 °C，用 1 小时时间滴加 54.1g 异丁酰氯。反应物然后室温搅拌 5 小时，加入 140ml 水，真空蒸发去除乙腈。水相用 4 × 120ml 乙酸乙酯萃取 4 次。合并后的有机相用 1N 的 HCl(50ml)、饱和 NaHCO₃(50ml)和 NaCl(50ml)溶液洗涤，硫酸钠干燥，并彻底蒸发。残留物在加有活性炭的正己烷(240ml)中回流煮沸。滤除活性炭后，滤液冷却至 0 °C 并过滤得到标题化合物。得到 54.5g 产物。得率为 76 %。

熔点: 41-42 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆); δ[ppm] 0.92(d, 3H);
400MHz 1.06(d, 3H);
2.10(m, 1H);
2.28(m, 1H);
3.40(m, 2H);
5.16(s, 1H);
6.78(m, 1H);
7.92(m, 1H).

实施例 6

(±)-2-氯乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮的制备

10 °C, 充氮下, 将 10.1g(±)-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶于二氯甲烷(10ml)、吡啶(8.4ml)和 0.22g4-N,N-二甲基氨基-吡啶的混合液中. 用 1 小时时间滴加 13.5g 氯乙酰氯. 温度升至 44 °C. 混合物然后室温再搅拌反应 2 小时, 加入 100ml 水. 相分离后, 水相用 100ml 二氯甲烷萃取. 合并后的有机相用硫酸钠干燥, 并彻底蒸发. 残留物在加有 1g 活性炭的 100ml 异丙醚中回流煮沸 10 分钟. 乘热过滤后, 滤液冷却至室温, 过滤得到固体并干燥. 得到 10.35g 标题化合物. 得率为 60 %.

熔点: 86-88 °C

¹H-NMR (CDCl₃); δ[ppm] 2.28(d, 1H);
400MHz 2.40(d, 1H);
3.48(s, 1H);
4.56(d, 2H);
5.30(s, 1H);
6.70(d, 1H);
6.94(m, 1H).

实施例 7

(±)-1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

充氮下将 79.56g(±)-2-乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶于乙醇(450ml)中, 并冷却至 -10 °C. 用 45 分钟, 分批加入 19.8g 硼氢化钠.

0℃搅拌反应3小时,然后用浓硫酸调节pH至1.8.在混合物中加入乙酸乙酯(200ml),过滤去除固体.然后彻底蒸发.残留物用水吸收,用二氯甲烷洗涤并彻底蒸发.粗产物用乙酸乙酯/甲醇5:1溶剂硅胶过滤纯化,滤液浓缩.得到51.83g白色固体产物.按照所用的2-乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮计算,得率为64%.

熔点: 91-93℃

¹ H-NMR (DMSO-d ₆); δ[ppm]	1.18(m, 1H);
400MHz	1.78(s, 3H);
	2.29(m, 1H);
	2.66(m, 1H);
	3.35(s, 1H);
	4.58(s, 1H);
	4.72(m, 1H);
	5.61(d, 1H);
	5.85(d, 1H);
	7.83(d, 1H).

实施例8

(±)-1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

充氮下,将73.87g(±)-2-丁酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在乙醇(400ml)中,并冷却至-10℃.用45分钟,分批加入15.86g硼氢化钠.0℃搅拌反应3小时,然后用浓硫酸调节pH至1.5,加入乙酸乙酯(200ml),过滤去除固体.然后彻底蒸发.残留物用水吸收,用二氯甲烷洗涤,蒸发并高真空干燥.得到60.55g产物.按照所用的(±)-2-丁酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮计算,得率为80%.

熔点: 71-72℃

¹ H-NMR (CDCl ₃); δ[ppm]	0.98(t, J=8.5Hz, 3H);
400MHz	1.40-1.50(1H);
	1.58-1.68(2H);
	2.10-2.18(2H);
	2.42-2.55(1H);
	2.85(m, 1H);

3.62(AB syst., 2H);

4.98(m, 1H);

5.78-5.82(2H);

6.38(m, 1H).

实施例 9

(±)-1-苯乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

充氮下，将 67g 粗制(±)-2-苯乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在乙醇(450ml)中，并冷却至-10℃。用 1 小时，分批加入 13.2g 硼氢化钠。室温搅拌反应 3.5 小时，然后用浓硫酸调节 pH 至 3.8。彻底蒸发混合物。干燥残留物，硅胶过滤(己烷/乙酸乙酯=1:9)纯化。从乙酸乙酯中重结晶后，得到 54.6g 白色固体。按照所用的(±)-2-苯乙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮计算，得率为 80 %。

¹H-NMR (CDCl₃); δ[ppm] 1.28-1.35(1H);
400MHz 1.40(m, 1H);
2.38-2.45(1H);
2.79(m, 1H);
3.50(AB syst., 2H);
3.52(s, 3H);
4.98(m, 1H);
5.75(m, 2H);
5.98(m, 1H);
7.20-7.38(5H).

实施例 10

(±)-1-BOC-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

室温，充氮下，将 15g 粗制盐酸(±)-1-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯溶解在 150ml 水和 150ml 二噁烷的混合液中。用 1N 的 NaOH 将溶液的 pH 调至 14，然后加入叔丁氧基羰基氟(BOC-F，过量 20%)的二乙醚溶液，混合物室温继续搅拌 3 小时(按照 Synthesis 1975, 599 中公开的方法制备 BOC-F)。用浓盐酸将 pH 调至 2。蒸馏去除有机溶剂后，在残留物中加入 50ml 水，混合物用 3 × 100ml 乙酸乙酯萃取。合并的有机相彻底蒸发。残留物在 110ml 二丙醚和 80ml 正己烷的混合液中结晶。得到 11.95g 标题化合物。得率为 56 %。

熔点: 68-70 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆); δ[ppm] 1.18(m, 1H);
400MHz 1.38(s, 9H);
2.26(m, 1H);
2.65(m, 1H);
3.33(t., 2H);
4.45(m, 1H);
4.55(t, 1H);
5.62(m, 1H);
5.79(m, 1H);
6.73(d, 1H).

实施例 11

(±)-1-丙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

充氮下, 将 16.6g(±)-2-丙酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在水(140ml)和 2-丁醇(66ml)中, 并冷却至-5 °C. 用 2 小时, 分批加入 3g 硼氢化钠. 混合物 10 °C 搅拌 2.5 小时, 并用浓盐酸和水的(1/1)混合液调节 pH 至 2.2. 将溶液蒸发至 40g, 并用 2N 的 NaOH 将 pH 调至 6.2. 混合物用 5 × 50ml 二氯甲烷萃取. 彻底蒸发合并的有机相. 在甲苯(150ml)中结晶残留物. 得到 11.1g 标题化合物. 得率为 65 %.

熔点: 67-68 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆); δ[ppm] 0.96(t, 3H);
400MHz 1.16(quint., 1H);
2.04(quart., 2H);
2.26(m, 1H);
2.66(m, 1H);
3.34(m, 2H);
4.58(t, 1H);
4.72(m, 1H);
5.61(m, 1H);
5.84(m, 1H);
7.72(d, 1H).

实施例 12

(±)-1-异丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的制备

充氮下，将 9g(±)-2-异丁酰基-2-氮杂双环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮溶解在水(32ml)和 2-丁醇(84ml)中，并冷却至 0℃。用 3.5 小时，分批加入 1.37g 硼氢化钠。混合物 20℃ 搅拌 3 小时，并用浓盐酸和水的(1/1)混合液调节 pH 至 2.5，再用 2N 的 NaOH 中和。将溶液蒸发至 40g。残留物用 3 × 80ml 二氯甲烷萃取。彻底蒸发合并的有机相。在 25ml 甲苯中结晶得到的固体。得到 6.8g 标题化合物。得率为 73.6%。

熔点 80 - 81℃

¹H-NMR (DMSO-d₆); δ[ppm] 0.98(d, 6H);
400MHz 1.16(quint., 1H);
2.30(m, 2H);
2.68(m, 1H);
3.32(t, 2H);
4.58(t, 1H);
4.70(m, 1H);
5.61(m, 1H);
5.82(m, 1H);
7.68(d, 1H).

实施例 13

用青霉素 G 酰基转移酶制备(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯

将大肠杆菌青霉素 G 酰基转移酶 EC3.5.1.11(Boehringer Mannheim)165 单位/克(U/g)或巨大芽孢杆菌的青霉素 G 酰基转移酶 EC3.5.1.11 用于此生物转化。

为此，将 50mM 磷酸钠缓冲液(pH5-9; 4ml)，与 1%(重量)非外消旋 1-苯乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯和 400mg 合适的青霉素 G 转移酶于 37℃ 一起孵育。

然后按照一定的时间间隔取样，用薄层色谱(硅胶 60，丁醇:水:冰醋酸=3:1:1; 用水合茚三酮来检测)、气相色谱(毛细管柱，HP-5，5%苯基甲基硅氧烷)或 HPLC 进行分析。酶以很高的活性去除了苯乙酰基团，因此释放出多达 40% 相应的氨基醇。得到的游离氨基醇的 ee 为 80%。

实施例 14

用微生物制备(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯

14.1 将 Visp 的 ARA 废水处理厂的淤泥(20%)在含有 0.5%(重量)1-乙酰基、1-丙酰基、1-异丁酰基或 1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的 A+N 培养基(参见表 1)中 37 °C 振荡培养, 形成(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯后进行薄层色谱。

用上述培养富集物的 1 % 进行 1-3 位转移, 在固体培养基(表 1 培养基中加入 29g/l 平板计数琼脂)上进行分离。以此方法分离出微生物产碱杆菌/博德特氏菌 FB188(DSM 11172)、erythropolis 红球菌 CB 101(DSM 10686)、CB100 种戈登氏菌(DSM10687)和 FB387 种红球菌(DSM 11291)。

14.2 将由此分离得到的微生物培养在含有 0.5%1-乙酰基、1-丙酰基、1-异丁酰基或 1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的培养基(参见表 1)中。在 24 至 36 小时内, 它们生长至光密度(OD)2 至 3。在生长后期的对数期收获所得的细胞并以 10mM 磷酸盐缓冲液洗涤。

在含有 1%(重量)1-乙酰基、1-异丁酰基或 1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的 50mM 磷酸盐缓冲液中进行随后的生物转化。用薄层色谱发现, 50 % 的底物被水解成(1R, 4S)-1-氨基-4-(羟甲基)-2-环戊烯。HPLC 分析发现 ee 值在 80 % 至 93 % 之间。

用 1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯作为底物时, 菌株 DSM10686 培养在 A+N 培养基上的生物转化速度为 0.14(g/L/h/OD), 培养在含 1-丁酰氨基-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯的 NYB(营养酵母肉汤)上的生物转化速度为 0.03(g/l/h/OD)。

如果用菌株 DSM10687, 200mM 的底物(1-丁酰氨基-氨基-4-羟甲基-2-环戊烯)浓度进行同样转化, 生物转化的速度是 0.161(g/l/h/OD)。

表 1 A+N 培养基

MgCl ₂	0.4g/l
CaCl ₂	0.014g/l
FeCl ₃	0.8mg/l
Na ₂ SO ₄	0.1g/l
KH ₂ PO ₄	1g/l
Na ₂ HPO ₄	2.5g/l
NaCl	3g/l

22

维生素液	1ml/l
微量元素溶液	1ml/l
pH7.5	

14.3 在一台 6L 发酵罐中 37 °C 将 erythropolis 红球菌 DSM10686 培养在以乙酸铵 (3g/l) 为碳源和氮源的基本培养基(参见表 2)中, 直至细胞密度的 OD₆₅₀>25。在细胞生长期间, 连续加入 50 % 的乙酸作为补充碳源。为了诱导酶活性, 然后加入 60g(+/-)-1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯, 继续培养数小时。最后, 再加入 40g(+/-)-1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯, 再继续培养 10 小时。用 HPLC 在线监测生物转化的进展。当达到 40 % 的分析得率(根据所用的外消旋底物)和 85 % 的 ee 时, 加酸终止发酵。

表 2

培养基组成

组份	浓度
酵母提取物	0.5g/l
蛋白胨 M66	0.5g/l
KH ₂ PO ₄	4.0g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.5g/l
K ₂ SO ₄	2.0g/l
乙酸铵	3.0g/l
CaCl ₂	0.2g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0g/l
微量元素溶液(见下表)	1.5g/l
PPG(聚丙二醇)	0.1g/l
微量元素溶液	
KOH	15.1g/l
EDTA·Na·2H ₂ O	100.0g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9.0g/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.0g/l
H ₃ BO ₃	2.7g/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.8g/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.5g/l

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.18g/l

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.27g/l

14.4 仿效实施例 14.3，将微生物 HSZ5 种节细菌(DSM 10328)、FB387 种红球菌(DSM 11291)、xylosoxydans 产碱杆菌反硝化 HSZ17 亚种(DSM 10329)、土壤杆菌/根瘤菌 HSZ30、单纯芽孢杆菌 K2 和恶臭假单胞菌 K32 培养在乙酸钠加以及不加 1-乙酰基、1-丙酰基、1-异丁酰基或 1-丁酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯(后文简称为氨基醇)的培养基(表 1)中。

用不加氨基醇培养的对数期细胞，获得如下结果(HPLC 分析):

菌株	速度(mmol/OD.h)	ee/转化率(%)
HSZ5(DSM 10328)	0.05	88.7/16
HSZ17(DSM 10329)	0.005	95/23
K32	0.05	54/1
CB101(DSM 10686)	0.1	84/39

培养菌株 K2 和 K17，收获并用于 60 小时的生物转化。

菌株	速度(mmol/OD.h)	ee/转化率(%)
K2	-	92/10
HSZ30	-	93/3.5

收获各批培养物的对数期和稳定期细胞作为静息细胞用于生物转化。根据 0TLC 分析，氨基醇诱导细胞或不诱导细胞的初速度未见差异。

实施例 15

从 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)中纯化 N-乙酰氨基-醇水解酶
纯化此酶，直至 SDS-PAGE(Pharmacia Phast 凝胶，10-15 % 梯度)中只有一条 50kD 分子量的蛋白质条带为止。

erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)细胞以 50mM 的 tris 缓冲液(pH6.2)洗涤，并浓缩至光密度 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 为 190。在加入苯基甲烷磺酰氟(PMSF)至最终浓度 1mM 和 DNase 后，为了获得粗提取物，用弗氏压碎法处理细胞。离心后得到 200ml 无细胞提取液，其蛋白质浓度为 4.8mg/ml。

将 960mg 无细胞提取液上样在 HiLoad 26/10 Q-Sepharose 离子交换色谱柱(Pharmacia)上，色谱柱预先用含 1mM 二硫苏糖醇(DTT)的 50mM 的 Tris 缓冲液(pH8.0)平衡。

22 用该缓冲液洗柱后，用线性梯度缓冲液洗脱蛋白质(1500ml; 梯度: 含 1mM

DTT 的 50mM tris 缓冲液 pH8.0 至含 1mM DTT 和 1M NaCl 的 50mM tris 缓冲液 pH7.0)。该酶在 pH7.6, 370mM 至 430mM NaCl 之间从柱上洗脱。收集活性流份, 并浓缩至 9ml。蛋白质含量为 41mg。

为了进一步纯化, 将此蛋白溶液上样在 HiLoad 26/10 Superdex75 凝胶过滤色谱柱(Pharmacia)上, 此柱预先用 50mM NaCl 和 1mM DTT 的 50mM tris 缓冲液平衡。收集活性流份, 总蛋白质含量为 10.9mg。

将此蛋白质溶液上样在 Mono Q HR5/5 色谱柱(Pharmacia)上, 色谱柱预先用含 1mM DTT 的 50mM tris 缓冲液(pH8.5)平衡。用线性梯度缓冲液(40ml)洗脱蛋白质, 即用含 1mM DTT 的 50mM tris 缓冲液(pH8.5)至含 1mM DTT 和 1M NaCl 的 50mM tris 缓冲液(pH8.5)洗脱。该酶在 390mM NaCl 至 440mM NaCl 之间洗脱。活性组份中含有 1.4mg 蛋白质。

在最后的纯化步骤中, 使用以相同缓冲液平衡的相同的色谱柱。使用的洗脱梯度是含 0 至 500mM NaCl, pH7.08.5 的相同缓冲液。用此法可分离到 430 微克纯酶。

用蛋白质印迹法直接测定了酶的 N 端序列, 得到以下 20 个氨基酸的序列: Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn。

此序列与已知蛋白质不同源。

实施例 16

酶的特性

- 22 用纯化的酶和经 Sephadex G25 色谱柱(PD-10, Pharmacia)脱盐的无细胞提取物进行酶的鉴定。

无细胞提取物中的蛋白质浓度为 7.3mg/ml。纯酶的蛋白浓度为 135 μ g/ml。在无细胞提取物中不添加 PMSF。

16.1 K_m 的测定

在无细胞提取物中测定 K_m 。pH7.0, 30 $^{\circ}$ C 时, 此酶对底物 1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯反应的 K_m 为 22.5mM。

16.2 最适 pH

在以下缓冲液中, 用纯化的酶和无细胞提取物, 在 pH6.2 至 9.0 范围内测定此酶水解 1-乙酰氨基-4-羟甲基-2-环戊烯(25mM)的最适 pH。

tris 缓冲液 100mM pH9.0; 8.5; 8.0; 7.5; 7.0

柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液 100mM pH7.0; 6.55; 6.2

测定了 24 小时的酶活性。

生成 1R, 4S 和 1S, 4R 对映结构体反应的最适 pH 应 7.0 至 7.5 之间。

酶在无细胞提取物中活性的最适 pH 为 7.0。但是, pH6.0 至 pH7.0 之间的选择性较好。

图 1 显示 erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)的 N-乙酰氨基-醇水解酶(无细胞提取物)的活性与 pH 的关系。

16.3 实施例 16.2 表明, 反应的最适温度在 25 至 30 °C。

图 2 显示, erythropolis 红球菌 CB101(DSM10686)的 N-乙酰氨基-醇水解酶(无细胞提取物)的活性与温度的关系

序列表

(1)一般信息

(i)申请人

(A)姓名: LONZA AG

(B)街道: Muenchensteinerstrasse 38

(C)城市: Basel

(E)国家: 瑞士

(F)邮政编码: 4002

(ii)发明名称: 氨基醇的制备方法

(iii)序列数量: 1

(iv)计算机可读形式:

(A)介质类型: 软盘

(B)计算机: IBM PC 兼容机

(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30(EPO)

22 (2)SEQ ID NO:1 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 20 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 未知

(ii)分子类型: 蛋白质

(iii)假设: 无

(iv)反义链: 无

(v)片段类型: N 末端

(vi)来源:

(B)菌株: erythropolis 红球菌

(C)个体/分离体: erythropolis 红球菌 CB101

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1 :

Thr	Glu	Gln	Asn	Leu	His	Trp	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu	Met	Ala
1				5					10				
Ala	Ser	Val	Ala	Ser	Asn								
	15				20								

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-10-08
保藏号	DSM 11291
微生物分类命名	FB 387
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-10-08
保藏号	DSM 11291
微生物分类命名	FB 387
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-05-20
保藏号	DSM 10687
微生物分类命名	BEC 006
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-05-20
保藏号	DSM 10686
微生物分类命名	BEC 005
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-05-20
保藏号	DSM 10686
微生物分类命名	BEC005
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1995-11-06
保藏号	DSM 10329
微生物分类命名	HSZ 17
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1995-11-06
保藏号	DSM 10329
微生物分类命名	HSZ 17
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1995-11-06
保藏号	DSM 10328
微生物分类命名	HSZ 5
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1995-11-06
保藏号	DSM 10328
微生物分类命名	HSZ 5
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏存活证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-09-20
保藏号	DSM 11172
微生物分类命名	FB 188
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
存活状态	☒ 存活 ☐ 不存活
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地址	不伦瑞克
保藏日	1996-09-20
保藏号	DSM 11172
微生物分类命名	FB 188
国际保藏单位名称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

微生物国际保藏证明(译文)

保藏人	隆萨股份公司
地 址	不伦瑞克
保藏日	1996-05-20
保藏号	DSM 10687
微生物分类命名	BEC 006
国际保藏单位 名 称	德意志微生物保藏中心
代理机构盖章	

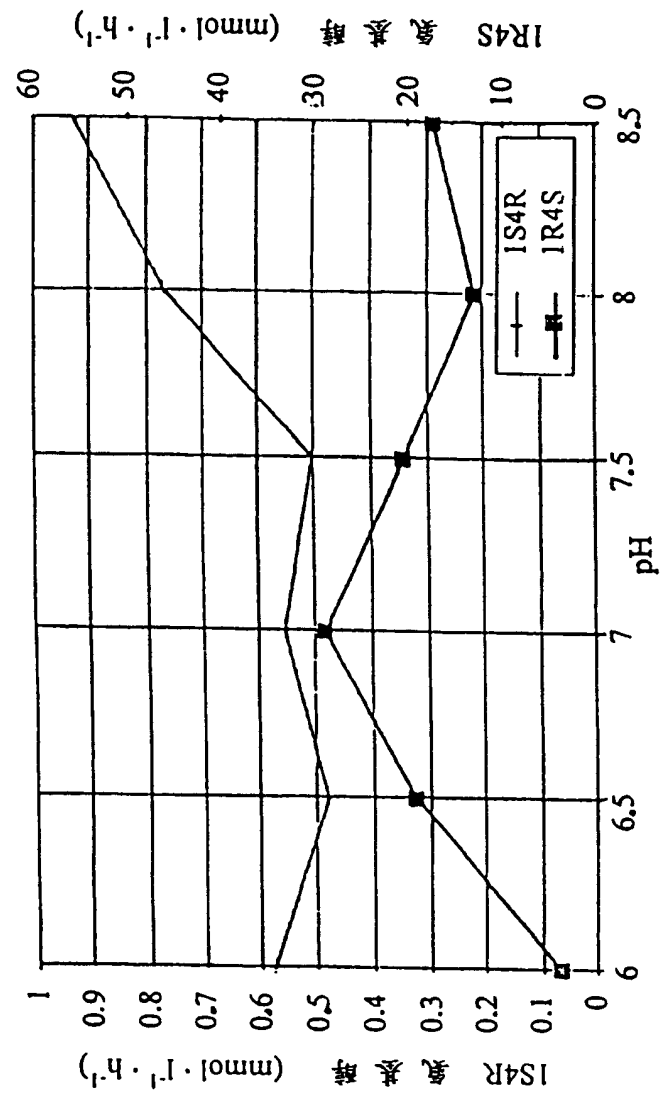


图 1

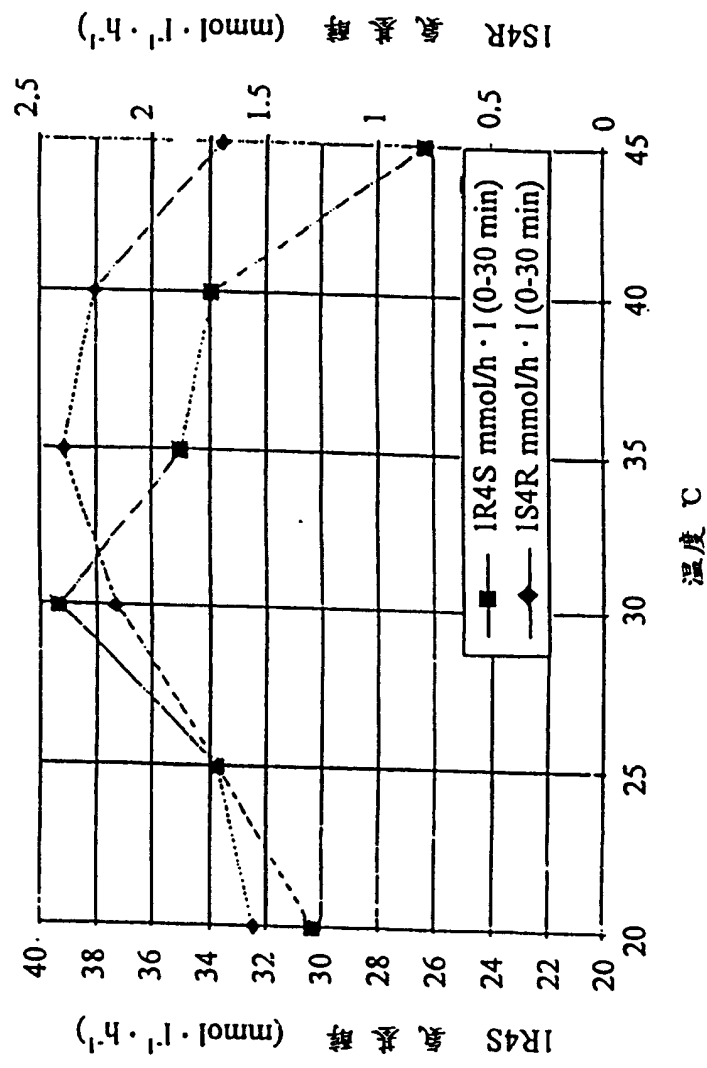


图 2