



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106574281 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201580036378.X

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2015.07.02

代理人 郭颂曦 黄革生

(30)优先权数据

14175632.0 2014.07.03 EP

(51)Int.Cl.

C12P 13/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.03

C12N 9/06(2006.01)

C12N 9/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/065101 2015.07.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/001362 EN 2016.01.07

(71)申请人 巴斯夫欧洲公司

地址 德国路德维希港

(72)发明人 K-U·鲍尔代纽斯 M·布罗伊尔

K·迪特里希 V·纳维茨卡斯

F·穆蒂 T·克瑙斯 N·特纳

权利要求书2页 说明书37页

序列表10页 附图6页

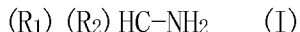
(54)发明名称

醇类的氧化还原自足性生物催化胺化

(57)摘要

本发明涉及用于产生伯胺和仲胺的新生物催化方法,所述方法包括同时再生所需辅因子的偶联的酶促氧化和还原过程;利用在一锅法(即生物催化级联)中同时发挥作用的两种酶即醇脱氢酶和胺脱氢酶。另外,整个过程是氧化还原中性的,因为从第一氧化性步骤产生的氢化物在第二还原性步骤中内部再循环。本发明还涉及促成所需酶活性的重组表达系统和微生物;和开展这类方法的生物反应器。

1. 制备胺的方法,其中所述胺具有通式I



其中R₁和R₂是相同或不同的并且选自H、烷基、环烷基、烯基、芳基、芳烷基、烷氧烷基或芳氧基烷基,条件是R₁和R₂不同时是H,并且其中芳基部分任选地可以是取代的,所述方法包括:

a) 在辅因子NAD(P)⁺和醇脱氢酶(ADH)(E.C.1.1.1.x)存在下酶促氧化所述胺的对应醇以形成所述醇的对应羰基化合物,而辅因子NAD(P)⁺经还原以形成NAD(P)H;并且

b) 在存在如下时酶促还原所述羰基化合物

i) 氨或氨源,和

ii) 胺脱氢酶(AmDH)

以形成所需胺,

而辅因子NAD(P)⁺从NAD(P)H再生;并且任选地

c) 分离所述胺;

其中所述AmDH是苯丙氨酸脱氢酶(Ph-AmDH)(E.C.1.4.1.20)的突变体或亮氨酸脱氢酶(L-AmDH)(E.C.1.4.1.9)的突变体。

2. 权利要求1的方法,其中所述AmDH选自

a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的苯丙氨酸脱氢酶的突变体,其中所述突变体包含双突变K78S、N277L,并且其中所述突变体与SEQ ID NO:1具有至少80%的序列同一性,和

b) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的亮氨酸脱氢酶的突变体,其中所述突变体包含四重突变K68S、E114V、N262L、V291C,并且其中所述突变体与SEQ ID NO:3具有至少80%的序列同一性。

3. 前述权利要求中一项的方法,其中所述AmDH

a) 是苯丙氨酸脱氢酶的突变体并且包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的氨基酸残基21至400的氨基酸序列,或

b) 是亮氨酸丙氨酸脱氢酶的突变体并且包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

4. 前述权利要求中一项的方法,其中所述ADH选自:

a) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的AA-ADH;

b) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的LBv-ADH;

c) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的HL-ADH;

d) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的ADH-A;或

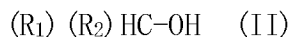
e) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的ADH-hT。

5. 前述权利要求中一项的方法,在含水反应介质或含水-有机混合物反应介质中进行。

6. 前述权利要求中一项的方法,其中方法在分离形式的所需酶集合、表达所需酶集合中至少一种酶的一种或多种重组微生物或表达所需酶集合或所需酶集合中至少一种酶的

一种或多种微生物的细胞匀浆或细胞裂解物存在下进行。

7. 前述权利要求中一项的方法,其中醇底物选自式II的单价醇:



其中

R₁和R₂如上文定义。

8. 前述权利要求中一项的方法,还包括从反应介质分离产生的胺。

9. 前述权利要求中一项的方法,其中辅因子按亚化学计量的量使用。

10. 前述权利要求中一项的方法,其中反应在存在过量的氨或过量的所述氨源下进行。

11. 前述权利要求中一项的方法,其中反应在低于9.6、尤其在约8.0至8.7的范围中的pH进行。

12. 前述权利要求中一项的方法,其中借助不显示金属螯合特性的缓冲剂控制pH。

13. 前述权利要求中一项的方法,其中使用的酶是NAD(H)依赖的。

14. 重组表达载体,携带在至少一个调节元件控制下的如权利要求1至3中任一项所限定的至少一种ADH和/或至少一种AmDH的编码性序列。

15. 重组微生物,携带根据权利要求14的至少一种表达载体并功能地表达所述编码的酶。

16. 权利要求13的重组表达载体或权利要求15的重组微生物在如权利要求1至13中任一项所述的方法中的用途。

17. 进行权利要求1至13中任一项的生物催化方法的生物反应器,在反应介质中含有权利要求15的至少一种重组微生物,或游离或固定形式的如权利要求1至3中任一项所定义的至少一种酶。

醇类的氧化还原自足性生物催化胺化

[0001] 本发明涉及用于产生胺的新生物催化方法,所述方法包括同时再生所需辅因子的偶联的酶促氧化和还原过程;利用在一锅法(即生物催化级联)中同时发挥作用的两种酶即醇脱氢酶和胺脱氢酶。另外,整个过程是氧化还原中性的,因为从第一氧化步骤产生的氢化物在第二还原性步骤中内部再循环。因此,不要求外部还原当量;这种体系定义为氧化还原自足。本发明还涉及促成所需酶活性的重组表达系统和微生物;和开展这类方法的生物反应器。

背景技术

[0002] 羟基官能团普遍存在于可再循环资源和基于生物的原料(例如,醇类、糖)中,而胺部分在自然界中稀少。然而,胺广泛用于生产药物、精细化学品、农用化学品、聚合物、染料、颜料、乳化剂和增塑剂。在不同类型的胺当中,伯胺是尤其有用的工业应用中间体。因此,醇(伯醇或仲醇)向对应伯胺的官能团互变仍然在有机合成中有巨大意义。实际上,按实验室规模以及产业规模生产胺主要依赖于还原性胺化对应的羰基化合物。相反,以氧化还原中性形式直接胺化醇允许最大化该过程的原子效率,因为不需要外部氧化还原当量。按数千吨规模进行简单醇(如甲醇和乙醇)的不均一催化胺化。(K.Weissermel, H.-J.Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, 第4版, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 第51页)。归因于有限的多相催化剂活性,要求相对苛刻的条件(>200°C)用于醇胺化。另外,结构上更多样的醇以极低的化学选择性转化或根本不转化。

[0003] 在使用叔戊基醇作为溶剂的均相体系中使用[Ru(CO)ClH(PPh₃)₃] Xantphos催化剂时,始于醇的胺的氧化还原中性直接合成是可能的(S.Imm, S. **Bähn**, M.Zhang, L.Neubert, H.Neumann, F.Klasovsky, J.Pfeffer, T.Haas和M.Beller, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2011, 50, 7599-7603)。Ru催化剂在第一氧化性步骤中从醇剥离氢化物以产生作为中间体的羰基化合物和Ru-H种类。在氨存在下,羰基化合物与相关的亚胺处于平衡。因此,Ru-H形式的催化剂将氢化物转移回到亚胺中间体,最终产生胺产物。化学催化过程的主要缺点是:

[0004] 1) 化学选择性低(即第一催化性循环后生成的伯胺可以在后续循环中与氨竞争,产生伯胺、仲胺和甚至叔胺的混合物);

[0005] 2) 缺少立体选择性,

[0006] 3) 底物浓度极低(1mM);

[0007] 4) 催化剂载量高(3mol%);

[0008] 5) 相对苛刻的反应条件(150°C,在压力下氨作为气体);

[0009] 6) 需要氩气氛。

[0010] 尽管该领域中大部分报道的工作涉及非手性底物,但最近公开了醇的立体选择性借氢胺化(Y.Zhang, C.-S.Lim, D.S.B.Sim, H.-J.Pan, Y.Zhao, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2014, 126, 1423-1427)。然而,这种方法还受几种经济以及环境局限困扰:

[0011] 1) 这种方法需要高载量(5mol%)的与复杂和昂贵的有机手性配体配位的铱催化剂;

[0012] 2) 这种方法需要高载量 (10mol%) 的昂贵的双萘手性磷酸作为共同催化剂, 否则根本观察不到转化;

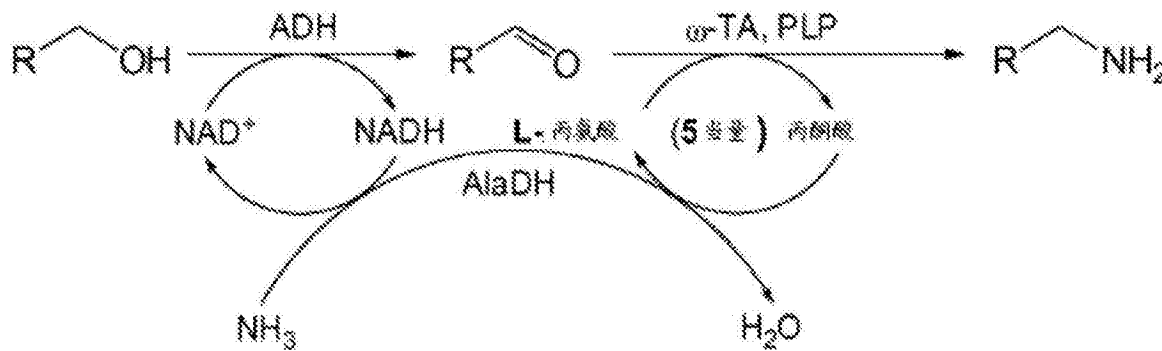
[0013] 3) 这种方法需要比氨更复杂的伯胺 (即对-茴香胺和少数其他苯胺衍生物) 作为氮源; 因此, 不能从醇直接获得伯胺, 仅可以获得苯基取代的仲胺; 有意义地指出, 在不同类型的胺当中, 伯胺是特别有用的工业应用中间体;

[0014] 4) 这种方法需要1.5当量醇用于对-茴香胺胺化; 因此即便获得理论定量产率, 至少33%的醇浪费;

[0015] 5) ee是中度的, 少数例外。然而, ee从未超过97%;

[0016] 最近, 已经提出了使用三种酶: 醇脱氢酶 (ADH)、 ω -氨基转移酶 (ω -TA) 和丙氨酸脱氢酶 (Ala-DH) 的伯醇生物催化借氢胺化 (方案1) (J.H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F.G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 9156-9159.)。

[0017]



[0018] 方案1. 胺化伯醇的三酶级联。

[0019] 在第一步骤中, ADH将醇氧化成醛, 产生还原形式的NAD辅因子。在第二步骤中, ω -TA正式转移来自氨基供体 (L-丙氨酸) 的氨基至醛中间体。除了所需的胺之外, 产生丙酮酸作为副产物。最后, 通过使用氨和第一步骤中生成的还原当量 (即NADH) 使丙酮酸再循环返回L-丙氨酸, Ala-DH使得平衡移动。

[0020] 然而, 必须指出:

[0021] 1) 该循环不真正是催化性的。需要至少5当量的L-丙氨酸以观察到胺产物的形成。

[0022] 2) 这种生物催化网络仅从伯醇开始才提供>99%胺转化率。

[0023] 3) 适用于仲醇的相同构思导致更差的转化 (54%或更低)。另外, 仅对映纯的S-构象醇部分地转化成S-构象的胺 (仅在构象保持时胺化)。

[0024] 4) ω -转氨酶非常频繁地受底物 (例如酮/醛, 丙氨酸) 抑制作用和产物 (例如胺, 丙酮酸) 抑制作用困扰 (a) J.-S. Shin, B.-G. Kim, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001, 65, 1782-1788; b) J.-S. Shin, B.-G. Kim, Biotechnol. Bioeng. 1999, 65, 206-211; c) J.-S. Shin, B.-G. Kim, Biotechnol. Bioeng. 2002, 77, 832-837)。

[0025] 5) 三酶体系的使用令反应设置复杂化并且令克隆多个基因至相同宿主生物中的可能性复杂化。另外, 不得不在体系中供应L-丙氨酸。

[0026] 6) 当使用 (R)-选择性 ω -TA时, 必须使用更昂贵的L-丙氨酸。另外, 能够使丙酮酸再循环回到L-丙氨酸的丙氨酸脱氢酶并非已知。仅将产生L-丙氨酸。因此, 在 (R)-选择性 ω -TA的情况下, 该体系借助移除丙酮酸而非丙酮酸再循环发挥作用。这点也与“催化性过

程”定义矛盾。

[0027] 显而易见,需要进一步改进的用于制备胺的生物催化方法。

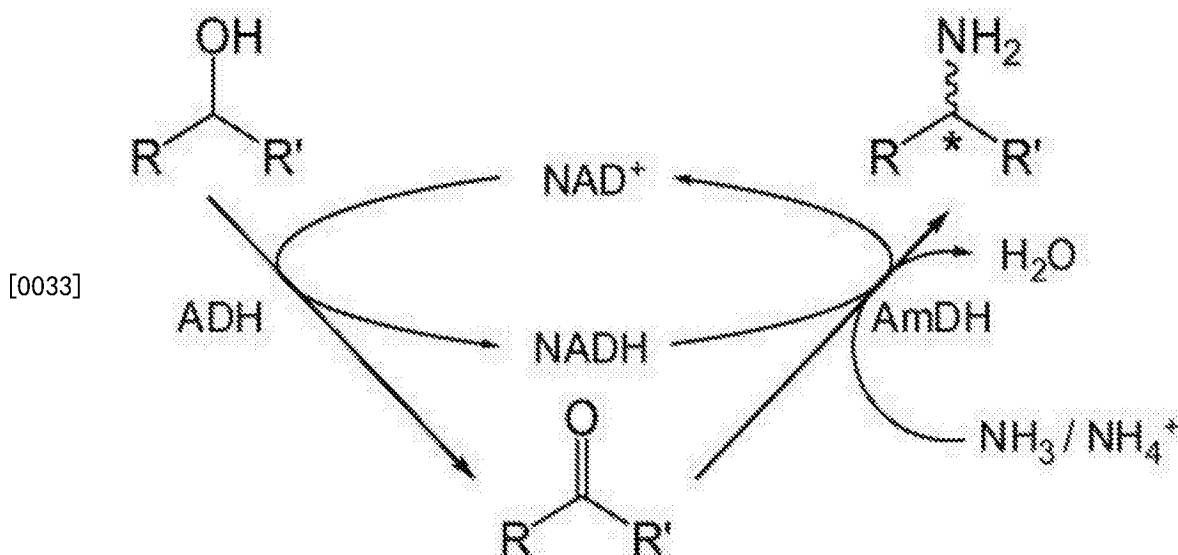
[0028] 发明概述

[0029] 在一锅法中按依次方式以及按同时方式的多步骤化学反应避免了中间体分离步骤和纯化步骤需求。这种方法导致经济益处以及环境益处,因为不需要费时的中间体生成,并且提取/纯化用有机溶剂和蒸发/传质用能量的使用最小化。因此,级联反应通常拥有升高的原子效率和较低的环境影响因素。主要挑战是开展其中氧化性步骤和还原性步骤同时发生的级联反应。甚至更有挑战性的是实施相互联系的同时氧化还原中性级联,其中第一氧化性步骤内释放的电子在后续还原性步骤中定量消耗。这个概念是本发明的基础,涉及醇(伯醇或仲醇)互变成胺。

[0030] 令人惊讶地,上文提到的问题可以通过提供如所附权利要求书中所限定的生物催化方法解决。

[0031] 具体地说,通过提供新酶促催化方法解决该问题,所述方法通过仅组合两种生物催化剂(即醇脱氢酶(ADH)与胺脱氢酶(AmDH))氧化还原自足(即借氢)胺化醇,

[0032] 例如,通过在体外应用作为纯化的酶的所述酶,实现超过94%的转化率和完美的化学选择性和立体选择性(方案2):



[0034] 方案2.醇的借氢生物催化胺化

[0035] 例如,R=烷基-、芳基烷基-;和R'=CH₃-、H-

[0036] 在用于直接胺化醇的这种氧化还原自足网络中,其中氮源是氨,唯一副产物是水。除氨之外,不需要其他化学种类。因此,与前述生物催化过程(方案1)相反,令人惊讶地,本发明方法真正是催化性的。另外,这个过程拥有其他令人惊讶的优点,尤其适用性更宽,原因在于它允许:

[0037] 1) 胺化对映纯的仲醇并立体翻转(例如从(S)-苯基-2-丙醇至(R)-苯基-2-丙胺,>99%e.e.);(AA-ADH)

[0038] 2) 胺化对映纯的仲醇并保持构象(例如从(R)-苯基-2-丙醇至(R)-苯基-2-丙胺,>99%e.e.);(LBv-ADH)

[0039] 3) 非对称胺化消旋仲醇(例如从消旋-苯基-2-丙醇至(R)-苯基-2-丙胺,>99%

e. e)

[0040] 4) 胺化伯醇(例如从2-苯基-乙醇至2-苯基-乙胺)

[0041] 醇脱氢酶(ADH)与胺脱氢酶(AmDH)的组合是现有技术中迄今未描述的一项有挑战性的任务。不得不考虑单独或组合的各种参数以确保最佳反应条件,和/或反应条件下两种酶之间的兼容性:

[0042] 1) 胺化需要过量的氨/铵阳离子作为驱动反应至完成的氮源。因此,如果不得不实现高转化率和升高的反应速率并且与此同时不损害两种酶的稳定性,则氨/铵阳离子的浓度应当足够高。

[0043] 2) 先前报道用AmDH还原性胺化酮在pH 9.6处实施(Abrahamson, M. J. 等人, Angew. Chem. Int Ed, 2012, 51, 3969)。令人惊讶地,本发明显示,这个pH既不是还原性胺化的最佳pH,也不是借助ADH/AmDH级联胺化醇的最佳pH。实际上,较低pH(8-8.7)允许获得升高的转化率,这主要归因于酶和辅因子稳定性改善。

[0044] 3) 本发明显示,优选的AmDH酶在广泛的pH下有活性。然而,一些ADH(如短乳杆菌(Lactobacillus brevis) ADH、马肝ADH)在升高浓度的氨(例如2M)存在下在pH>8.5时不稳定。

[0045] 4) 缓冲剂的选择也重要。AmDH良好耐受不同的缓冲剂(即氯化铵、甲酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐等)。但是,本发明中所用的ADH是Zn²⁺依赖性酶,其在一些情况下拥有镁作为额外结构性位点;因此必须避免强力螯合剂如草酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐作为缓冲液盐。

[0046] 5) His末端标签便于轻易和高效纯化酶。然而,多组氨酸基团可以配位金属阳离子如Zn²⁺。Zn²⁺是本发明ADH的催化性金属位点。已知它并不紧密结合。存在解离和再结合至ADH活性位点的机制(Jeremias H. R. **Kägi**和Bert L. Vallee J. Biol. Chem. 1960, 235: 3188-3192)。在体外建立涉及金属依赖性酶的级联(任选地通过移除标签)时不得不考虑整个事实。

[0047] 附图简述:

[0048] 图1显示pH和缓冲剂类型对使用Ph-AmDH和化学计量的NADH辅因子的还原性胺化的相对转化率的影响。

[0049] 图2显示由加His标签的Ph-AmDH、催化性NADH并使用对-氟-苯基丙酮(20mM)和氨(727mM)在pH 8.7催化的生物催化还原性胺化的时间研究结果。

[0050] 图3显示针对使用加His标签的Ph-AmDH的还原性胺化测试的底物的化学式。

[0051] 图4显示了使用AA-ADH和Ph-AmDH(未加His标签)在催化量的NAD⁺(1mM)存在下(S)-苯基-2-丙醇(20mM)胺化反应以产生(R)-苯基-2-丙胺。在时间过程期间监测胺产物(实线)、酮中间体(点线)和醇底物(短划线)的转化。

[0052] 图5显示了使用AA-ADH和Ph-AmDH(未加His标签)在催化量的NAD⁺(0.5mM)存在下(S)-苯基-2-丙醇(20mM)胺化反应以产生(R)-苯基-2-丙胺。在这段时间期间监测胺产物(实线)、酮中间体(点线)和醇底物(短划线)的转化。

[0053] 图6显示了使用AA-ADH和Ph-AmDH在催化量的NAD⁺(0.2mM)存在下(S)-苯基-2-丙醇(20mM)胺化反应以产生(R)-苯基-2-丙胺。在这段时间期间监测胺产物(实线)、酮中间体(点线)和醇底物(短划线)的转化。

[0054] 图7显示了使用AA-ADH和Ph-AmDH在催化量的NAD⁺ (0.1mM) 存在下(S)-苯基-2-丙醇(20mM)胺化反应以产生(R)-苯基-2-丙胺。在这段时间期间监测胺产物(实线)、酮中间体(点线)和醇底物(短划线)的转化。

[0055] 图8显示栗褐芽胞杆菌(*B.adius*)苯丙氨酸脱氢酶(Ph-DH)(顶线)、从中衍生的Ph-AmDH突变体(中线)及其共有序列(底线)的序列比对结果。

[0056] 图9显示嗜热脂肪芽胞杆菌(*B.stearothermophilus*)LeuDH(顶线)、从中衍生的Leu-AmDH突变体(中线)及其共有序列(底线)的序列比对结果。

[0057] 发明详述

[0058] 1.具体实施方案

[0059] 本发明涉及以下具体实施方案:

[0060] 1.制备烃基胺、尤其脂族胺或芳族胺的生物催化方法,所述方法包括:

[0061] a)在辅因子NAD(P)⁺、尤其NAD⁺和醇脱氢酶(ADH)(E.C.1.1.1.x)存在下酶促氧化所述胺的对应伯醇或仲醇以形成所述醇的对应氧化化合物,而辅因子NAD(P)⁺、尤其NAD⁺经还原以形成NAD(P)H、尤其NADH;并且

[0062] b)在存在如下时酶促还原(还原性胺化)所述氧化化合物(即羰基化合物),

[0063] i)氨或氨源,和

[0064] ii)胺脱氢酶(AmDH)(E.C.1.4.1.x.)

[0065] 以形成所需胺,

[0066] 而辅因子NAD(P)⁺、尤其NAD⁺从NAD(P)H、尤其NADH再生;并且任选地

[0067] c)分离所述胺。

[0068] 在非对称醇底物的情况下,底物可以处于立体异构体混合物形式或可以按立体异构纯形式使用。

[0069] 另外,在立体异构纯的底物情况下,可以在立体翻转((R)→(S)或(S)→(R))或构象保持情况下形成反应产物。

[0070] 取决于醇的类型(伯醇或仲醇),优选地使用不同的ADH。

[0071] 优选地,所使用的酶使用相同的辅因子、尤其NAD(H)。

[0072] 2.实施方案1的方法,其中步骤a)和b)同时进行。

[0073] 3.前述实施方案之一的方法,其中通过蛋白质工程化以NAD或NADP作为受体作用于供体分子(底物)的CH-NH₂基团的氨基酸脱氢酶、尤其氧化还原酶(E.C.1.4.1.),获得所述AmDH。

[0074] 4.前述实施方案之一的方法,其中所述AmHD是氨基酸脱氢酶的突变体,所述突变体具有在氨或氨源和NAD(P)H存在下将氧化化合物转化成对应伯烃基胺的能力。

[0075] 5.实施方案4或5的方法,其中所述AmDH是苯丙氨酸脱氢酶(Ph-AmDH)(E.C.1.4.1.20)的突变体或亮氨酸脱氢酶(L-AmDH)(E.C.1.4.1.9)的突变体。

[0076] 6.实施方案5的方法,其中所述AmDH选自

[0077] a)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的苯丙氨酸脱氢酶的突变体,其中所述突变体包含双突变K78S、N277L,并且其中所述突变体与SEQ ID NO:1具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,和

[0078] b)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的亮氨酸脱氢酶的突变体,其中所述突变体包

含四重突变K68S、E114V、N262L、V291C,并且其中所述突变体与SEQ ID NO:3具有具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0079] 7. 前述实施方案之一的方法,其中

[0080] a) 所述AmDH是苯丙氨酸脱氢酶的突变体并且包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的氨基酸残基21至400的氨基酸序列,和/或

[0081] b) 所述AmDH是亮氨酸丙氨酸脱氢酶的突变体并且包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,和/或

[0082] c) 所述ADH选自包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的AA-ADH;包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的LBv-ADH;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的HL-ADH;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的ADH-A;或者包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少80%,如85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的ADH-hT。

[0083] 为了转化伯醇,优选地使用伯ADH,如HL-ADH或ADH-hT。为了转化仲醇,优选地使用仲ADH,如ADH-A、LBv-ADH或AA-ADH。

[0084] 8. 前述实施方案之一的方法,其中所述胺具有通式I

[0085] $(R_1)(R_2)HC-NH_2$ (I)

[0086] 其中

[0087] R_1 和 R_2 是相同或不同的并且选自H、烷基、环烷基、烯基、芳基、芳烷基、烷氧烷基或芳氧基烷基,条件是 R_1 和 R_2 不同时是H,并且其中芳基部分任选地可以是取代的。

[0088] 优选的产物是:

[0089] a) 胺,其中残基 R_1 和 R_2 之一是H并且另一个残基选自

[0090] -线性或分枝烷基、尤其线性或分枝 C_1 - C_{10} 烷基;

[0091] -任选取代的芳烷基,尤其任选取代的苯基- C_1 - C_4 烷基,如任选取代的苯基-甲基;

[0092] -烷氧烷基,如 C_1 - C_{10} 烷氧基- C_1 - C_4 烷基或如 C_1 - C_6 烷氧基-甲基;

[0093] -任选取代的芳氧基烷基,如任选取代的苯氧基- C_1 - C_4 烷基或任选取代的苯氧基-甲基;

[0094] b) 胺,其中 R_1 和 R_2 是相同或不同的并且选自

[0095] -线性或分枝烷基,尤其线性或分枝 C_1 - C_{10} 烷基,优选地甲基或乙基;

[0096] -任选取代的芳烷基,尤其任选取代的苯基- C_1 - C_4 烷基,如任选取代的苯基-甲基;

[0097] -烷氧烷基,如 C_1 - C_{10} 烷氧基- C_1 - C_4 烷基或如 C_1 - C_6 烷氧基-甲基;

[0098] -任选取代的芳氧基烷基,如任选取代的苯氧基- C_1 - C_4 烷基或任选取代的苯氧基-甲基;

[0099] 特别优选的胺是那些胺,其中残基 R_1 和 R_2 之一是甲基或乙基并且另一个残基选自上述优选的含义。

[0100] 任选的取代基优选地选自卤族如F、Cl、Br、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷基,所述基团任选

携带末端或链内杂原子,如-NH-或-NH₂,或任选由卤素取代,例如CF₃。

[0101] 特别优选的底物是图3中所示的氧化化合物的对应醇。

[0102] 9. 前述实施方案之一的方法,所述方法在含水反应介质中进行。

[0103] 10. 前述实施方案之一的方法,其中该方法在分离形式的所需酶集合、表达所需酶集合中至少一种酶的一种或多种重组微生物或表达所需酶集合或所需酶集合中至少一种酶的一种或多种微生物的细胞匀浆或细胞裂解物存在下进行。

[0104] 11. 前述实施方案之一的方法,其中醇底物选自式II的单价醇:

[0105] (R₁) (R₂) HC-OH (II)

[0106] 其中

[0107] R¹和R²如上文定义。

[0108] 12. 前述实施方案之一的方法,还包括从反应介质分离产生的胺。

[0109] 13. 前述实施方案之一的方法,其中辅因子按亚化学计量的量(即催化量)使用。

[0110] 14. 前述实施方案之一的方法,其中反应在基于摩尔的过量氨或所述氨源存在下进行,基于待胺化的醇的摩尔计算。优选地存在1至200倍或1至100倍如2至50倍或5至20倍,或更优选地50至150倍或最优选地80至120倍的摩尔过量。

[0111] 15. 前述实施方案之一的方法,其中反应在小于9.6、尤其在约8至8.7的pH进行。

[0112] 16. 前述实施方案之一的方法,其中通过不显示金属螯合特性即不含有羧酸残基的缓冲剂控制pH。即,草酸盐、柠檬酸盐或乙酸盐缓冲剂是较不合适的缓冲物质。

[0113] 17. 前述实施方案之一的方法,其中使用的酶是NAD(H)依赖的。

[0114] 18. 重组表达载体,携带在至少一个调节元件控制下的如实施方案1至7中任一项所限定的至少一种ADH和/或至少一种AmDH的编码序列。

[0115] 19. 重组微生物,携带根据实施方案18的至少一种表达载体并功能地表达所述编码的酶。

[0116] 20. 实施方案18的重组表达载体或实施方案19的重组微生物在如实施方案1至17中任一项提到的方法中的用途。

[0117] 21. 进行实施方案1至17中任一项的生物催化方法的生物反应器,含有在反应介质中实施方案19的至少一种重组微生物,或游离或固定形式的如实施方案1至7中任一项定义的至少一种酶。

[0118] 2. 具体术语的解释

[0119] 除非另外声明,以下含义应当适用:

[0120] 如果总体多酶氧化还原过程是“氧化还原中性的”,不要求外部氧化还原当量;并且这种体系定义为氧化还原自足。

[0121] 术语“生物催化”或“酶促催化的”方法指在如本文定义的酶的催化活性存在下,即在分离的纯酶或粗制酶或含有或表达这种酶活性的完整(正在生长、静息、失活或穿孔)微生物细胞或其细胞匀浆存在下进行的任何方法,或表达至少一个预期酶活性的完整细胞的组合和含有至少一个其他预期酶活性的分离的纯酶制备物或粗制酶制备物的组合,从而整套酶活性因组合而呈现。

[0122] 术语“立体特异”意指若干立体异构体或对映异构体之一借助至少90% ee、优选地至少95% ee、尤其至少98% ee、或至少99% ee的高对映体过量或纯度的酶形成。ee%值根据

以下式计算

$$[0123] \quad ee\% = [X_A - X_B] / [X_A + X_B] * 100,$$

[0124] 其中 X_A 和 X_B 分别指对映体A或B的摩尔分数。

[0125] 术语“基本上纯的”意在描述依据本领域技术人员使用的一种或多种纯度或均匀性特征呈均匀分子。

[0126] “基本上纯的”蛋白质或酶意指,所需的纯化蛋白质基本上不含掺杂性细胞组分,如聚丙烯酰胺-十二烷基硫酸钠凝胶电泳(SDS-PAGE)后单一条带所佐证。例如,“基本上纯的”酶或蛋白质将在如下参数:分子质量、色谱迁移行为、氨基酸组成、氨基酸序列、封闭或未封闭的N端、HPLC洗脱图、生物学活性和其他这类参数的标准实验偏差范围内显示恒定和可重复的特征。例如,“基本上纯的”蛋白质或酶意指,所需的纯化蛋白质基本上不含掺杂性细胞组分,如聚丙烯酰胺-十二烷基硫酸钠凝胶电泳(SDS-PAGE)后单一条带所佐证。然而,本术语不意在排除所述酶或蛋白质与其他化合物的人工或合成混合物。此外,本术语不意在排除任选地从重组宿主分离的融合蛋白,或具有功能残基如组氨酸残基的融合蛋白。

[0127] “天然 α 氨基酸残基”衍生自Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、Pro。

[0128] 在如本文中定义的和所附权利要求中的化学化合物范围内,以下含义应当适用:

[0129] 烃基可以广义地解读并且包括与一个官能团如OH或 NH_2 连接的直链和分枝烃基。尤其,这些官能团是末端基团。这些残基基本上由碳原子和氢原子组成,所述残基可以在其链内部任选地额外包含杂原子,例如O、N、NH、S,并且可以具有1至50个、2至30个或3至15个连续碳原子和任选地杂原子的链长度。

[0130] 烃基特别地代表残基并且特别地代表线性或分枝烷基、烯基或炔基,所述基团任选地由一个或多个例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个杂原子基团如-O-或-NH-、尤其-O-中断。

[0131] 尤其,烃基可以理解为排他性涵盖由氢原子和碳原子组成的芳族残基和脂肪族残基、尤其如下文定义的芳基、烷基、烯基和炔基残基等。

[0132] 从中衍生的残基(如烷氧基)的烷基以及烷基片段代表具有1至4个、1至6个、1至8个、1至10个、1至22个或1至30个碳原子的饱和、线性或分枝烃链,如

[0133] C_1 - C_{10} -烷基如 C_1 - C_4 -烷基,例如甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基、1-甲基-丙基、2-甲基丙基、1,1-二甲基乙基、戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、己基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基、2-乙基丁基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1-乙基-1-甲基丙基和1-乙基-2-甲基丙基。

[0134] C_1 - C_{10} -烷氧基,如 C_1 - C_4 -烷氧基,例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基、丁氧基、1-甲基丙氧基、2-甲基丙氧基或1,1-二甲基乙氧基;

[0135] 以及例如戊氧基、1-甲基丁氧基、2-甲基丁氧基、3-甲基丁氧基、1,1-二甲基丙氧基、1,2-二甲基丙氧基、2,2-二甲基丙氧基、1-乙基丙氧基、己氧基、1-甲基戊氧基、2-甲基戊氧基、3-甲基戊氧基、4-甲基戊氧基、1,1-二甲基丁氧基、1,2-二甲基丁氧基、1,3-二甲基丁氧基、2,2-二甲基丁氧基、2,3-二甲基丁氧基、3,3-二甲基丁氧基、1-乙基丁氧基、2-乙基

丁氧基、1,1,2-三甲基丙氧基、1,2,2-三甲基丙氧基、1-乙基-1-甲基丙氧基或1-乙基-2-甲基丙氧基；

[0136] 羟-C₁-C₁₀-烷基，例如羟-C₁-C₆-烷基或羟-C₁-C₄-烷基或羟-C₄-C₁₀-烷基：例如羟甲基、1-羟或2-羟乙基、1-羟、2-羟或3-羟丙基、1-羟甲基乙基、1-羟、2-羟、3-或4-羟丁基、1-羟甲基丙基和2-羟甲基丙基；或以上烷基残基的其他羟基取代类似物，尤其如表4中给出的R的含义，例如6-羟-6-甲基庚-1-基。

[0137] 烯基：具有2至4个、2至6个、2至8个、或2至10个碳原子并在任何位置中具有双键的一倍或多倍、尤其一倍非饱和、直链或分枝烃残基，如C₂-C₆-烯基，如乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-甲基乙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-甲基-1-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-甲基-2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-甲基-1-丁烯基、2-甲基-1-丁烯基、3-甲基-1-丁烯基、1-甲基-2-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-甲基-3-丁烯基、2-甲基-3-丁烯基、3-甲基-3-丁烯基、1,1-二甲基-2-丙烯基、1,2-二甲基-1-丙烯基、1,2-二甲基-2-丙烯基、1-乙基-1-丙烯基、1-乙基-2-丙烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、1-甲基-1-戊烯基、2-甲基-1-戊烯基、3-甲基-1-戊烯基、4-甲基-1-戊烯基、1-甲基-2-戊烯基、2-甲基-2-戊烯基、3-甲基-2-戊烯基、4-甲基-2-戊烯基、1-甲基-3-戊烯基、2-甲基-3-戊烯基、3-甲基-3-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-甲基-4-戊烯基、2-甲基-4-戊烯基、3-甲基-4-戊烯基、4-甲基-4-戊烯基、1,1-二甲基-2-丁烯基、1,1-二甲基-3-丁烯基、1,2-二甲基-1-丁烯基、1,2-二甲基-2-丁烯基、1,2-二甲基-3-丁烯基、1,3-二甲基-1-丁烯基、1,3-二甲基-2-丁烯基、1,3-二甲基-3-丁烯基、2,2-二甲基-3-丁烯基、2,3-二甲基-1-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-3-丁烯基、3,3-二甲基-1-丁烯基、3,3-二甲基-2-丁烯基、1-乙基-1-丁烯基、1-乙基-2-丁烯基、1-乙基-3-丁烯基、2-乙基-1-丁烯基、2-乙基-2-丁烯基、2-乙基-3-丁烯基、1,1,2-三甲基-2-丙烯基、1-乙基-1-甲基-2-丙烯基、1-乙基-2-甲基-1-丙烯基和1-乙基-2-甲基-2-丙烯基。

[0138] 烯氧基：上述烯基的氧连接类似物，如对应的C₂-C₆-烯氧基。

[0139] 芳基：单核或多核、优选地单核或双核的、任选取代的具有6至20个（例如6至10个）环碳原子的芳族原子团，例如苯基、联苯基、萘基如1-或2-萘基、四氢萘基、茚基、茛基和菲基。芳基原子团可以任选地携带1,2,3,4,5或6个相同或不同的取代基。在多核芳基原子团的情况下，至少一个环具有芳族特征；然而，几种或全部环也可能具有芳族特征。

[0140] 芳基烷基：上述烷基原子团的芳基取代的类似物，其中芳基同样具有前述的含义，例如选自苯甲基或苯乙基的苯基-C₁-C₄-烷基原子团。

[0141] 芳氧基：以上任选取代的芳基原子团的氧连接的类似物。

[0142] 环烷基：具有3至20个碳原子的碳环原子团，例如C₃-C₁₂-环烷基，如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一烷基和环十二烷基；优选环戊基、环己基、环庚基以及还例如环丙基甲基、环丙基乙基、环丁基甲基、环丁基乙基、环戊基甲基、环戊基乙基、环己基-甲基或C₃-C₇-环烷基，如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环丙基甲基、环丙基乙基、环丁基甲基、环戊基乙基、环己基甲基，其中可以借助任何合适的碳原子与分子的原子团成键。

[0143] 环烯基：具有5至8个、优选地至多6个碳环构件的单环状、单不饱和烃基，如环戊

烯-1-基、环戊烯-3-基、环己烯-1-基、环己烯-3-基和环己烯-4-基；

[0144] 任选的取代基可以选自-COOH、-OH、-SH、-CN、氨基、-NO₂、烷基、或烯基、烷基或烯基、烷氧基、卤代烷基；所述基团如上文定义。

[0145] 3. 本发明的其他实施方案

[0146] 3.1 本发明的蛋白质

[0147] 本发明不局限于具体提到的酶/蛋白质，还扩展至其功能性等同物。

[0148] 在本发明的范围内，具体公开的酶的“功能性等同物”或“类似物”或“功能性突变”是其各种多肽，它们也具有所需的生物学功能或活性，例如酶活性。

[0149] 例如，“功能性等同物”意指这样的酶，它们在用于酶活性的试验中显示至少1%至10%、或至少20%、或至少50%、或至少75%或、至少90%更高或更低的如本文中所定义的酶活性。。

[0150] 根据本发明，“功能性等同物”尤其也意指这样的突变体，其中在以上述的氨基酸序列的至少一个序列位置中，所述突变体具有与具体所述氨基酸不同的氨基酸，但是拥有前述生物学活性之一。“功能性等同物”因此包括通过一个或多个如1至20个、1至15个、1至10个或1至5个氨基酸添加、置换、缺失和/或倒位可获得的突变体，其中所述的变化可以出现在任何序列位置内，条件是它们导致具有本发明特性特征的突变体。如果反应性模式在突变体与未改变的多肽之间定量地重合，即如果以不同速率转化例如相同的底物，则尤其也提供了功能等同性。下表中显示合适氨基酸置换的例子。

原始残基	置换例子
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
[0151] Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile

	Phe	Met; Leu; Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
[0152]	Trp	Tyr
	Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu

[0153] 以上意义下的“功能等同物”还是所述多肽的“前体”以及该多肽的“功能衍生物”和“盐”。

[0154] 在这种情况下，“前体”是所述多肽的具有或没有所希望生物学活性的天然或合成前体。

[0155] 表述“盐”意指本发明蛋白质分子的羧基的盐以及氨基的酸加成盐。羧基的盐可以按照已知方式产生并包含无机盐，例如钠、钙、铵、铁和锌盐，和与有机碱（例如，胺如三乙醇胺、精氨酸、赖氨酸、哌啶等）的盐。本发明也涵盖酸加成盐，例如与无机酸（如氢氯酸或硫酸）的盐和与有机酸（如乙酸和草酸）的盐。

[0156] 本发明多肽的“功能衍生物”也可以利用已知技术在功能性氨基酸侧基团上或在它们的N末端或C末端处产生。此类衍生物包括例如羧酸基的脂族酯、通过与氨或者与伯胺或仲胺反应可获得的羧酸基的酰胺；通过与酰基反应产生的游离氨基的N-酰基衍生物；或通过与酰基反应产生的游离羟基的O-酰基衍生物。

[0157] “功能性等同物”天然地包括可以从其他生物获得的多肽以及天然存在的变体。例如，可以通过序列比较建立同源序列区域的区域，并且可以基于本发明的具体参数确定等同酶。

[0158] “功能性等同物”也包括本发明多肽的片段，优选地各个结构域或序列基序，它们例如显示所希望的生物学功能。

[0159] 另外，“功能性等同物”是融合蛋白，所述融合蛋白具有上文所述的多肽序列或从中衍生的功能性等同物之一和处于功能性N末端或C末端接合（即不存在融合蛋白诸部分的相互功能妨碍）的至少一个功能不同的其他异源序列。这些异源序列的非限制性例子例如是信号肽、组氨酸锚状物或酶。

[0160] 根据本发明也包括根据本发明也包括的“功能性等同物”是具体所公开蛋白质的同源物。这些同源物拥有如上文所述的百分数同一性值。所述值指与具体所公开氨基酸序列的同一性，并可以根据Pearson和Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85 (8), 1988, 2444-2448的算法计算。

[0161] 也可以从BLAST比对、算法blastp（蛋白质-蛋白质BLAST）或通过如下文给出的Clustal设置计算出同一性%值。常见的同一性%值例如为50%或更大，例如至少60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0162] 本发明同源多肽的同一性百分数尤其意指氨基酸残基相对于本文中具体所述氨基酸序列之一的总长度的同一性%。

[0163] 在蛋白质可能糖基化的情况下，本发明的“功能性等同物”包括文所命名类型的蛋

白质,所述蛋白质处于去糖基化和糖基化形式以及可以通过改变糖基化模式来获得的修饰形式。

[0164] 本发明蛋白质或多肽的此类功能性等同物或同源物可以通过诱变例如点突变、加长或缩短所述蛋白质来产生。

[0165] 本发明蛋白质或多肽的此类功能性等同物或同源物可以通过筛选突变体(例如短缩突变体)的组合数据库鉴定。例如,可以通过在核酸水平组合诱变(例如通过酶促连接合成性寡核苷酸的混合物)产生蛋白质变体的多样化数据库。存在可以用于从简并的寡核苷酸序列产生潜在同源物数据库的众多方法。可以在自动DNA合成仪上实施简并基因序列的化学合成,并且可以将合成性基因随后连接于合适的表达载体中。简并基因的使用使得在一种混合物中产生编码所需蛋白质序列集合的全部序列成为可能。合成简并寡核苷酸的方法是本领域技术人员已知的(例如Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura等人(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura等人, (1984) *Science* 198:1056; Ike等人(1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477)。

[0166] 在现有技术中,几项技术已知用于筛选通过点突变或缩短法产生的组合数据库的基因产物并且用于筛选cDNA文库中具有所选特性的基因产物。这些技术可以适应于快速筛选通过组合诱变本发明同源物所产生的基因库。最常用于筛选庞大基因库的基于高通量分析的技术包括在可以复制的表达载体中克隆基因库、用所得载体数据库转化合适的细胞并在这样的条件下表达组合基因,在所述条件下检测所需的活性有助于编码检测到其产物的基因的载体分离。递归总体诱变(REM),一项提高数据库中功能性突变体频率的技术,可以与筛选试验组合地使用,旨在鉴定同源物(Arkin和Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave等人(1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331)。

[0167] 3.2编码核酸序列

[0168] 本发明也涉及编码如本文中所定义的酶/蛋白质的核酸序列。

[0169] 本发明也涉及与本文中具体公开的序列具有某种“同一性”程度的核酸。两种核酸之间的“同一性”意指每种情况下在该核酸的全长范围内核苷酸的同源性。

[0170] 例如,同一性可以借助Informax (USA) 公司Vector NTI软件包7.1程序,使用Clustal方法(Higgins DG, Sharp PM. 在微型计算机上快速和灵敏的多重序列比对 (Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer). *Comput Appl. Biosci.* 1989年4月;5(2):151-1)用以下设置计算:

[0171] 多重比对参数:

	空位开口罚分	10
	空位延伸罚分	10
	空位分离罚分范围	8
[0172]	空位分离罚分	关闭
	比对延迟的同一性 %	40
	残基特异性空位	关闭
	亲水残基空位	关闭
[0173]	转折权重	0
[0174]	配对比对参数:	
	FAS 算法	开启
	K-tuple 大小	1
[0175]	空位罚分	3
	窗大小	5
	最佳对角线数目	5

[0176] 备选地,同一性可以根据Chenna,Ramu,Sugawara,Hideaki,Koike,Tadashi,Lopez,Rodrigo,Gibson,Toby J,Higgins,Desmond G,Thompson,Julie D.Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs.(2003)Nucleic Acids Res 31(13):3497-500,网页:<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#>和以下设置确定

	DNA 空位开口罚分	15.0
	DNA 空位延伸罚分	6.66
	DNA 矩阵	同一性
[0177]	蛋白质空位开口罚分	10.0
	蛋白质空位延伸罚分	0.2
	蛋白质矩阵	Gonnet
	蛋白质/DNA 末端空位	-1
	蛋白质/DNA 空位距离	4

[0178] 本文中提及的全部核酸序列(单链和双链DNA和RNA序列,例如cDNA和mRNA)可以按已知方式通过化学合成从核苷酸结构单元产生,例如通过各个重叠的互补性双螺旋核酸结构单元的片段缩合来产生。寡核苷酸的化学合成可以例如以已知方式通过亚磷酸酰胺(phosphoramidite)方法(Voet,第2版,Wiley Press,New York,第896-897页)进行。合成性

寡核苷酸的积聚和借助DNA聚合酶Klenow片段填补缺口和连接反应以及一般克隆技术在 Sambrook等人(1989)中描述,见下文。

[0179] 本发明也涉及编码以上多肽及其功能性等同物之一的核酸序列(单链和双链DNA和RNA序列,例如cDNA和mRNA),所述核酸序列可以例如使用人工核苷酸类似物获得。

[0180] 本发明涉及编码本发明多肽或蛋白质或其生物学活性区段的分离的核酸分子,并且还涉及可以用作例如鉴定或扩增本发明编码性核酸的杂交探针或引物的核酸片段。

[0181] 本发明的核酸分子可以额外含有来自编码性基因序列3'和/或5'末端的非翻译序列。

[0182] 本发明还涉及与具体所述的核苷酸序列或其区段互补的核酸分子。

[0183] 本发明的核苷酸序列使得产生可以用于鉴定和/或克隆其他细胞类型和生物中同源序列的探针和引物成为可能。此类探针或引物一般包含在“严格”条件(见下文)与本发明核酸序列的有义链或对应反义链的至少约12个、优选至少约25个,例如约40、50或75个连续核苷酸杂交的核苷酸序列区域。

[0184] “分离的”核酸分子与存在于该核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分开,并且如果该核酸分子通过重组DNA技术产生,还可以基本上不含细胞物质或细胞培养基、或如果它被化学地合成,可以不含化学前体或其它化学品。

[0185] 可以借助分子生物学标准技术和根据本文提供的序列信息,分离本发明的核酸分子。例如,可以使用具体公开的完整序列之一或其区段作为杂交探针和(如在例如 Sambrook, J., Fritsch, E.F.和Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989中描述的)的标准杂交技术,从合适的cDNA文库分离cDNA。此外,可以使用基于这种序列所构建的寡核苷酸引物,通过聚合酶链反应分离包含所公开序列之一或其区段的核酸分子。以这种方式扩增的核酸可以克隆在合适的载体中并且可以通过DNA测序来表征。本发明的寡核苷酸也可以通过标准合成方法产生,例如使用自动DNA合成仪产生。

[0186] 本发明的核酸序列或其衍生物、这些序列的同源物或部分可以例如通过常规杂交技术或PCR技术从其他细菌分离,例如借助基因组文库或cDNA文库。这些DNA序列在标准条件下与本发明的序列杂交。

[0187] “杂交”意指多核苷酸或寡核苷酸在标准条件下与几乎互补性序列结合,因而在这些条件下非互补性配偶物之间不发生非特异性结合的能力。为此,所述序列可以是90-100%互补。互补序列能够相互特异性结合的特性例如用于RNA印迹或DNA印迹中或用于PCR或RT-PCR的引物结合中。

[0188] 保守区域的短寡核苷酸有利地用于杂交。然而,也可能使用本发明核酸的较长片段或完整序列用于杂交。这些标准条件根据所用的核酸(寡核苷酸、较长片段或完整序列)或根据何种类型的核酸-DNA或RNA用于杂交而变化。例如,DNA:DNA杂合体的解链温度比相同长度的DNA:RNA杂合体的解链温度低约10°C。

[0189] 例如,根据具体的核酸,标准条件意指在浓度0.1至5x SSC (1x SSC=0.15M NaCl, 15mM柠檬酸钠, pH 7.2) 或额外存在50%甲酰胺下的缓冲剂水溶液中42和58°C之间的温度,例如42°C在5x SSC, 50%甲酰胺中。有利地,DNA:DNA杂交分子的杂交条件是0.1x SSC和在

约20℃至45℃之间、优选在约30℃至45℃之间的温度。对于DNA:RNA杂交分子,杂交条件有利地是0.1x SSC和在约30℃至55℃之间、优选在约45℃至55℃之间的温度。所述的这些杂交温度是在甲酰胺不存在下大约100个核苷酸长度及50%G+C含量的核酸的计算解链温度值的实例。DNA杂交的实验条件在相关遗传学教材(例如Sambrook等人,1989)中描述,并且可以例如根据核酸的长度、杂合体的类型或G+C含量,使用本领域技术人员已知的公式计算。本领域技术人员可以从以下教材获得关于杂交的其他信息:Ausubel等人(编著),1985, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York; Hames和Higgins(编著),1985, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown(编著),1991, *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford。

[0190] “杂交”尤其可以在严格性条件下实施。此类杂交条件例如在Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 引自: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第9.31-9.57页或在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中描述。

[0191] “严格”杂交条件尤其意指:在42℃于50%甲酰胺、5x SSC(750mM NaCl, 75mM柠檬酸三钠)、50mM磷酸钠(pH 7.6)、5x Denhardt溶液、10%硫酸葡聚糖和20g/ml变性剪切鲑精DNA组成的溶液中温育过夜,接着在65℃用0.1x SSC洗涤滤膜。

[0192] 本发明还涉及具体公开或可衍生的核酸序列的衍生物。

[0193] 因而,本发明的其他核酸序列可以从本文中具体公开的序列衍生并且可以因添加、替换、插入或缺失单个或几个核苷酸而与所公开的序列不同,并且也编码具有所需特性谱的多肽。

[0194] 本发明也包括这样的核酸序列,其包含所谓沉默突变或根据特殊来源或宿主生物的密码子选择,与具体所述序列以及其天然存在变体例如剪接变体或等位变体相比,已经被改变。

[0195] 本发明也涉及可以通过保守性核苷酸替换(即所讨论的氨基酸被具有相同电荷、大小、极性和/或溶解度的氨基酸置换)获得的序列。

[0196] 本发明还涉及因序列多态性从具体公开的核酸衍生的分子。这些遗传多态性可以因自然变异存在于群体内部的个体之间。这些天然的变异通常引起基因核苷酸序列的1至5%变异。

[0197] 本发明核酸序列的衍生物意指例如在衍生的氨基酸水平上具有至少60%同源性、优选地至少80%同源性、极特别优选在整个序列范围内至少90%同源性(就氨基酸水平上的同源性而言,应当参考上文对所述多肽给出的细节)的等位变体。有利地,同源性可以在序列的局部区域内较高。

[0198] 另外,衍生物也应当理解为是本发明核酸序列的同源物,例如动物、植物、真菌或细菌同源物、编码性和非编码性DNA序列的缩短序列、单链DNA或RNA。例如,同源物在DNA水平在本文具体公开的序列中所给出的整个DNA区域内具有至少40%、优选地至少60%、特别优选地至少70%、极特别优选地至少80%的同源性。

[0199] 另外,衍生物应理解为是例如带有启动子的融合物。添加至所述核苷酸序列的启动子可以通过至少一个核苷酸交换、至少一个插入、倒位和/或缺失进行修饰,尽管不损害

所述启动子的功能性或效力。另外,所述启动子的效力可以通过改变它们的序列而增加或者可以完全以甚至不同属的生物的更有效启动子交换。

[0200] 3.3功能性突变体的制备

[0201] 熟练技术人员还知晓产生具有本文公开的具体序列的功能性突变体的方法。

[0202] 取决于所用的技术,熟练技术人员可以在基因或非编码核酸区域(例如,其可以对调节基因表达重要)中产生任意或定向突变并且此后,可以产生合适的基因文库。因此所需要的分子生物学方法是本领域完全熟知的并且例如由 Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning*. 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 描述。

[0203] 熟练技术人员熟知修饰基因和因此修饰所编码蛋白质的方法,例如

[0204] -位点特异性诱变,其中特异性替换基因的单个或多个核苷酸(Trower MK(编著)1996;*In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey),

[0205] -饱和诱变,其中在基因的任何位置,可以交换或添加任何氨基酸的密码子(Kegler-Ebo DM, Dockett CM, DiMaio D(1994) *Nucleic Acids Res* 22:1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcárel R, Stunnenberg HG(1994) *Nucleic Acids Res* 22:541; Barik S(1995) *Mol Biotechnol* 3:1),

[0206] -易错聚合酶链反应(PCR),其中借助不正确发挥功能的DNA-聚合酶的作用,使核苷酸序列突变(Eckert KA, Kunkel TA(1990) *Nucleic Acids Res* 18:3739);

[0207] -SeSaM方法(序列饱和法),其中通过聚合酶避免优选的置换(Schenk等人, *Biospektrum*, 第3卷, 2006, 277-279)

[0208] -使基因在增变株系中传代,所述增变株系显示核苷酸序列突变的出现增加,例如,因缺陷型DNA修复机制所致(Greener A, Callahan M, Jerpseth B(1996) *An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain*. 引自:Trower MK(编著) *In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey), 或

[0209] -DNA改组,其中形成并消化密切相关的基因汇集物并且其中利用这些片段作为PCR反应的模板,并且其中形成全长嵌合基因(Stemmer WPC(1994) *Nature* 370:389; Stemmer WPC(1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747)。

[0210] 通过应用所谓的定向进化技术(参见例如 Reetz MT 和 Jaeger K-E(1999), *Topics Curr Chem* 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH(1999), *Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution*, 引自: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology), 熟练技术人员将能够大规模特异性制备功能突变体。在第一步骤中,生成特定蛋白质的文库,例如,通过应用上文提到的任一方法生成。此后,表达所述文库,例如通过应用细菌系统或噬菌体展示系统。

[0211] 表达显示所需特征谱的功能性突变体的那些基因可以接受选择并经受进一步突变。突变和选择或筛选的步骤可以迭代重复直至获得的突变体之一显示所需的特征谱。

[0212] 通过迭代法,可以进行有限数目的突变,例如1至5个突变,并且可以评价它们对所讨论的酶特征的影响并且可以逐步选择其他改善的突变体。所述选择的突变体随后可以按照基本上相同的方式经受进一步突变。待评价的单突变体的数目可以按这种方式显著地减少。

[0213] 本发明的教导内容提供了关于所讨论的酶/蛋白质的结构和序列的重要信息,基于所述信息,应当可以产生具有所需的修饰的特征谱的其他酶/蛋白质。尤其,可以确定所谓的热点,即可能潜在适用于进一步突变以修饰或产生所需的酶/蛋白质特征的序列区域。

[0214] 3.4根据本发明所用的构建体

[0215] 本发明也涉及表达构建体,其含有处于调节性核酸序列的遗传控制下的编码本发明多肽或融合蛋白的核酸序列;以及包含这些表达构建体中至少之一者的载体。

[0216] 根据本发明,“表达单元”意指具有表达活性的核酸,该核酸包含如本文中所定义的启动子,并且与一种待表达的核酸或一种基因功能性连接后,调节该核酸或该基因的表达,即其转录和翻译。因而在这种环境下,它也称作“调节性核酸序列”。除启动子之外,其他调节元件也可以存在,例如增强子。

[0217] 根据本发明,“表达盒”或“表达构建体”意指表达单元,其与待表达的核酸或待表达的基因功能性连接。与表达单元相反,表达盒因而不仅包含调节转录和翻译的核酸序列,还包含应当由于转录和翻译而表达为蛋白质的核酸序列。

[0218] 在本发明的上下文中,术语“表达”或“过量表达”描述微生物中由对应DNA编码的一种或多种酶的胞内活性产生或增加。为此,例如可以在生物钟插入基因、由另一种基因置换现存基因、增加基因或诸基因的拷贝数、使用强启动子或使用编码具有高活性的对应酶的基因,并且任选地可以组合这些措施。

[0219] 优选地,本发明的此类构建体包含在各自编码序列上游的启动子和3'-下游的终止子序列,并且任选地还包含常规调节元件,在每种情况下它们与编码序列功能性连接。

[0220] 根据本发明,“启动子”、“具有启动子活性的核酸”或“启动子序列”意指意指与待转录的核酸功能性连接时调节该核酸转录的核酸。

[0221] 在这种情况下,“功能性”或“有效”连接意指例如具有启动子活性的核酸之一和待转录核酸序列和任选地其他调节元件(例如能够使核酸转录的核酸序列及例如终止子)以如此方式依次连接,从而所述每种调节元件可以在该核酸序列的转录中履行其功能。这不必然需要化学意义上的直接连接。遗传调控序列如增强子序列也能够从更远位置或甚至从其它DNA分子上对靶序列发挥它们的作用。优选这样的排列,其中待转录的核酸序列位于启动子序列之后(即在3'端),从而这两个序列彼此共价地结合。启动子序列与待转基因表达的核酸序列之间的距离可以小于200bp(碱基对)或小于100bp或小于50bp。

[0222] 除了启动子和终止子之外,可以提及的其他调节元件的例子是靶向序列、增强子、多腺苷酸化信号、选择标记、扩增信号、复制起点等。合适的调节序列例如在Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中描述。

[0223] 本发明的核酸构建体特别包含从本文中具体所提及的那些序列或其衍生物和同源物中选出的序列,以及可以从本文中具体所提及的氨基酸序列中衍生的核酸序列,其中所述的序列有利地与控制(例如增加)基因表达的一种或多种调节信号有效或功能性连接。

[0224] 除这些调节序列之外,对这些序列的天然调节作用仍可以在实际的结构基因之前存在,并且任选地可能已经遗传地改变,从而关闭天然调节作用并且已经增加所述基因的表达。核酸构建体也可以具有更简单的设计,即,在编码序列之前不插入任何额外的调节信号并且不消除天然启动子连同其调节作用。相反,使天然调节序列沉默,从而调节作用不再

发生并且基因表达增加。

[0225] 优选的核酸构建体还有利地含有与启动子功能性连接的引起核酸序列表达增加的一个或多个前述增强子序列。也可以在DNA序列的3'端插入额外的有利序列,如其他调节元件或终止子。本发明核酸的一个或多个副本可以含于该构建体中。该构建体也可以含有其他标记,如抗生素抗性或缺陷型补充基因,任选地用于对构建体选择。

[0226] 在启动子如cos⁻、tac⁻、trp⁻、tet⁻、trp-tet⁻、lpp⁻、lac⁻、lpp-lac⁻、lacIq⁻、T7⁻、T5⁻、T3⁻、gal⁻、trc⁻、ara⁻、rhaP (rhaPBAD) SP6⁻、λ-PR⁻中或在有利地用于革兰氏阴性细菌的λ-PL启动子中含有合适调节序列的实例。在例如革兰氏阳性细菌启动子ce、amy和SP02,在酵母或真菌启动子ADC1、MFα、AC、P-60、CYC1、GAPDH、TEF、rp28、ADH中含有其他有利的调节序列。人工启动子也可以用于调节。

[0227] 为表达,将核酸构建体插入宿主生物中,其中所述的核酸构建体有利地位于引起所述基因在该宿主中最佳表达的载体(例如质粒或噬菌体)中。除质粒和噬菌体外,载体也理解为意指本领域技术人员已知的全部其他载体,例如,病毒如SV40、CMV、杆状病毒和腺病毒、转座子、IS元件、噬菌粒、粘粒和线性或环状DNA。这些载体可以在宿主生物中自主复制或可以按染色体方式复制。这些载体代表本发明的又一实施方案。

[0228] 合适的质粒例如是大肠杆菌中的pLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pHS1、pKK223-3、pDHE19.2、pHS2、pPLc236、pMBL24、p1_G200、pUR290、p1N-111113-B1、λgt11或pBdCI;诺卡氏菌型放线菌(Nocardioform actinomycetes)中的pJAM2;链霉菌属(Streptomyces)中的p1J101、p1J364、p1J702或p1J361;芽孢杆菌(bacillus)中的pUB110、pC194或pBD214;棒状杆菌(Corynebacterium)中的pSA77或pAJ667;真菌中的pALS1、p1L2或pBB116;酵母中的2αM、pAG-1、YEpl3或pEMBLye23或植物中的pLGV23、pGHIac⁺、pBIN19、pAK2004或pDH51。前述质粒代表可能质粒的小部分选择。其它质粒是本领域技术人员熟知的并且将会在例如书籍Cloning Vectors(编者Pouwels P.H.等人,Elsevier,Amsterdam-New York-Oxford,1985,ISBN0 444 904018)中找到。实验部分中还提到其他合适的质粒。

[0229] 在载体的又一个实施方案中,含有本发明核酸构建体或本发明核酸的载体可以有利地以线性DNA形式插入微生物中并且通过异源或同源重组整合到宿主生物的基因组中。这种线性DNA可以包含线性化载体如质粒或仅包含本发明的核酸构建体或核酸。

[0230] 为异源基因在生物中的最佳表达,有利的是根据生物中所用的特定密码子选择改变核酸序列。该密码子选择可以基于计算机评价所讨论生物的其他已知基因来轻易确定。

[0231] 本发明表达盒的产生基于合适启动子与合适的编码性核苷酸序列及终止子信号或多腺苷酸化信号的融合。为此使用如在例如T.Maniatis,E.F.Fritsch和J.Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY(1989)及在T.J.Silhavy,M.L.Berman和L.W.Enquist,Experiments with Gene Fusions,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY(1984)以及Ausubel,F.M.等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Assoc.和Wiley Interscience(1987)中描述的常见重组和克隆技术。

[0232] 将重组核酸构建体或基因构建体有利地插入用于合适的宿主生物内表达的宿主特异性载体中,以引起所述基因在宿主中最佳表达。载体是本领域技术人员熟知的并且将

在例如“Cloning Vectors” (Pouwels等人, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) 中找到。

[0233] 3.5可以根据本发明使用的宿主

[0234] 根据上下文, 术语“微生物”意指起始微生物(野生型)或本发明的基因修饰微生物或这两者。

[0235] 根据本发明, 术语“野生型”意指对应的起始微生物并且不需要必然对应于天然存在的生物。

[0236] 借助本发明的载体, 可以产生重组微生物, 所述重组微生物已经用例如至少一种本发明载体转化并可以用于本发明的发酵生产。

[0237] 有利地, 将以上所述的本发明重组构建体插入合适的宿主系统并表达。优选地, 使用本领域技术人员熟悉的常见克隆与转染方法, 例如共沉淀、原生质体融合、电穿孔、逆转录病毒转染等, 旨在确保所述核酸在对应表达系统中表达。合适的系统例如在Current Protocols in molecular Biology, F. Ausubel等人, Publ. Wiley Interscience, New York 1997或者Sambrook等人, molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989中描述。

[0238] 本发明的宿主生物或多种宿主生物优选地含有本文发明中所述的编码根据上述定义的酶活性的核酸序列、核酸构建体或载体至少之一。

[0239] 3.6酶促产生本发明的产物

[0240] 生物催化转化反应可以在液体、优选地含水反应介质中进行, 含有待转化的底物(伯醇或仲醇)、要求的酶活性(适应于醇底物类型的胺脱氢酶和伯或仲ADH), 由辅因子补充、氮源或铵源、缓冲剂和任选地其他成分, 例如适于稳定酶活性的其他成分。

[0241] 反应混合物可以是均相的或非均相的, 优选地是均相的。

[0242] 在适宜时, 可以按0.1至80体积%的合适比例添加有机共溶剂。任选地, 底物可以预先溶解于有机共溶剂中并且随后添加至水介质。

[0243] 可以将反应混合物以合适的强度, 在10℃至80℃、10℃至50℃或25℃至40℃如25℃至30℃范围内的合适温度搅拌或振摇合适的时间段。在足够的反应时间例如1至120小时或10至24小时后, 可以提取产物。

[0244] 如上文定义的所需酶的等分试样以溶解方式或分散方式(例如固定化形式)、按适宜的酶浓度和活性并以进行生物转化的适宜相对比例提供。

[0245] 将存在(以过量, 即超过等摩尔量的底物)氮源, 例如铵盐, 如氯化铵, 所述氮源可以本身充当缓冲剂, 例如氯化铵缓冲剂。

[0246] 理想地, 基本上仅添加氨、氨盐至酶、辅因子和底物。

[0247] 但是, 反应也可以在缓冲体系中进行。因此, 反应也可以在含有合适缓冲剂例如磷酸盐或硼酸盐缓冲剂的缓冲反应介质中、优选地在约7至约10、如8至9的pH范围内进行。

[0248] 其他反应细节可以取自实验部分。

[0249] 3.7本发明胺的产生方法

[0250] 本发明还涉及用于生物催化或发酵(完整细胞)产生胺、尤其式(I)胺的方法。

[0251] 可以按分批法或按补料分批或重复补料分批法连续或不连续地培育如根据本发

明使用的表达/携带所需酶活性的重组微生物。将在Chmiel (Bioprozesstechnik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991))的教材中或Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994))的教材中找到对已知培育方法的综述。

[0252] 待使用的培养基必须以适宜的方式满足具体菌株的要求。对多种微生物的培养基的描述在美国细菌学学会手册“普通细菌学方法手册”(Manual of Methods for General Bacteriology) (Washington D.C., USA, 1981)中给出。

[0253] 在发酵生产情况下,可以根据本发明使用的这些培养基通常包含一种或多种碳源、氮源、无机盐、维生素和/或微量元素。

[0254] 优选的碳源是糖,如单糖、二糖或多糖。极好的碳源例如是葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、核糖、山梨糖、核酮糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、淀粉或纤维素。糖也可以通过复杂化合物如糖蜜或来自糖精炼的其他副产品添加至培养基。也可以有利的是添加多种碳源的混合物。其他可能碳源是油和脂肪,如大豆油、葵花籽油、花生油和椰子油,脂肪酸如棕榈酸、硬脂酸或亚麻酸、醇如甘油、甲醇或乙醇和有机酸如乙酸或乳酸。

[0255] 氮源通常是有机或无机氮化合物或含有这些化合物的物质。氮源的实例包括氨气或铵盐,如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵或硝酸铵、硝酸盐、脲、氨基酸或复杂氮源,如玉米浆、大豆粉、大豆蛋白、酵母提取物、肉汁和其他等。氮源可以独立地使用或作为混合物使用。

[0256] 可以在培养基中存在的无机盐化合物包含钙、镁、钠、钴、钼、钾、锰、锌、铜和铁的氯化物、磷酸盐或硫酸盐。

[0257] 含硫无机化合物例如硫酸盐、亚硫酸盐、连二亚硫酸盐、连四硫酸盐、硫代硫酸盐、硫化物以及有机硫化合物如硫醇和硫醚可以用作硫源。

[0258] 磷酸、磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或对应的含钠盐可以用作磷源。

[0259] 可以添加螯合剂至培养基,目的在于维持溶液中的金属离子。特别合适的螯合剂包含二羟基酚,如儿茶酚或原儿茶酸酯或有机酸如柠檬酸。

[0260] 根据本发明使用的发酵培养基也可以含有其他生长因子,如维生素或生长促进剂,它们包括例如生物素、核黄素、硫胺素、叶酸、烟酸、泛酸酯和吡哆醇。生长因子和盐经常来自培养基的复杂组分,如酵母提取物、糖蜜、玉米浆等。此外,可以将合适的前体添加至培养基。培养基中化合物的精确组成主要取决于具体的实验并且必须针对每种具体情况分别决定。关于培养基优化的信息可以在教材“Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach? Publ. P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997) 第53-73页, ISBN 0199635773)中找到。也可以从供应商处获得生长培养基,如标准1 (Merck) 或BHI (心脑血管浸液, DIFCO) 等。

[0261] 通过加热(在2.0巴和121°C, 20分钟)或通过无菌过滤,将培养基的全部组分灭菌。所述组分可以一起灭菌或根据需要分别灭菌。培养基的全部组分可以在培养伊始存在或任选地可以连续地或通过分批补料添加。

[0262] 培养物的温度正常是在15°C和45°C之间,优选地是25°C至40°C并且在实验期间可以保持恒定或可以变动。培养基的pH值应当在5至8.5的范围内,优选地在7.0附近。可以在培育期间通过添加碱性化合物如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水或酸性化合物如磷酸或硫

酸控制用于生长的pH值。消泡剂例如脂肪酸聚乙二醇酯可以用于控制起泡。为了维持质粒的稳定性,可以将具有选择作用的合适物质例如抗生素添加至培养基。将氧或含氧气体混合物例如空气送入培养物旨在维持有氧条件。培养物的温度通常是20℃至45℃。持续培养直至大量的所需产物已经形成。这通常在10小时至160小时内实现。

[0263] 可以任选地通过高频超声波、通高压例如在弗氏细胞压碎器中、通过渗透作用、通过去垢剂、裂解酶或有机溶剂的作用、借助均化器或通过所列几种方法的组合破坏细胞。

[0264] 可以表达为进行预期生物转化所需要的酶活性,即由单一种或两种或更多种、尤其两种或三种重组微生物提供。

[0265] 本领域已知适应于制备重组微生物携带并表达为进行本发明方法所需要的一种或多种或甚至全部酶活性的载体和方法,例如对于单个基因:pET-系统、Novagen或pBAD-系统,Invitrogen;用于两个基因的质粒-系统例如pACYC-Duet1,Novagen)

[0266] 在备选的更优选的实施方案中,本发明的生产方法不像经典发酵过程那样进行。反而,携带(表达)所需要的酶活性(至少一种或优选地全部所需要的酶活性)的(重组)细胞可以与含有所需要底物和辅底物如NAD(H)和/或NADP(H)的反应介质接触。所述培养基还可以含有支持预期生产过程的常规添加物,如缓冲剂,目的是在控制过程期间反应介质的pH。细胞可以如此使用(如从细胞培养物获得那样使用)或可以预处理以增加细胞对底物、辅底物和产物分子的通透性。例如,细胞可以经历温度处理(例如,任选地反复的冻/融循环和/或在环境温度储存以实现所需的通透性)。

[0267] 进行这类过程的合适方案是熟练技术人员已知的。

[0268] 3.8酶固定

[0269] 如果固定如根据本发明所要求的酶,则它与惰性载体连接。合适的载体材料是本领域已知的并且例如在EP-A-1149849、EP-A-1069183和DE-OS100193773以及其中引用的参考文献中公开(所述全部文献就载体材料而言特别地涵盖)。合适的载体材料的例子是粘土、粘土矿物如高岭石、硅藻土、珍珠岩、二氧化硅、氧化铝、碳酸钠、碳酸钙、纤维素粉、阴离子交换材料、合成聚合物如聚苯乙烯、丙烯酸树脂、酚醛树脂、聚氨酯、聚烯烃如聚乙烯和聚丙烯。为了制备结合载体的酶,载体材料通常以细粉末形式使用,其中多孔形式是优选的。载体材料的粒度通常不超过5mm,尤其2mm。在至少一种酶存在于完整细胞制备物中的情况下,所述完整细胞制备物可以按游离或固定化形式存在。合适的载体材料例如是藻酸该或角叉菜胶。酶以及细胞可以直接由戊二醛连接。广泛类型的固定方法是本领域已知的(例如J.Lalonde和A.Margolin“Immobilization of Enzymes”引自K.Drauz和H.Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002,V第III卷,991-1032,Wiley-VCH, Weinheim)。

[0270] 3.9产物分离

[0271] 本发明的方法学还可以包括回收如根据本发明产生的化合物的步骤。术语“回收”包括从培养基或反应介质提取、收获、分离或纯化化合物。可以根据本领域已知的任何常规分离或纯化方法回收化合物,所述方法包括但不限于用常规树脂处理(例如,阴离子或阳离子交换树脂、非离子型吸附树脂等)、用常规吸收剂(例如,活性炭、硅胶、纤维素、氧化铝等)处理、改变pH、溶剂提取(例如,用常规溶剂如醇、乙酸乙酯、己烷等提取)、蒸馏、透析、过滤、浓缩、结晶、重结晶、pH调整、冻干等。

[0272] 3.10具体的胺脱氢酶

[0273] 优选地使用两种具体的胺脱氢酶:L-AmDH和Ph-AmDH。

[0274] a) L-AmDH:

[0275] L-AmDH源自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) (也称作嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)) 亮氨酸脱氢酶。野生型酶的序列已经在以下论文中公开:

[0276] S.Nagata, K.Tanizawa, N.Esaki, Y.Sakamoto, T.Ohshima, H.Tanaka, K.Soda, *Biochemistry* 1988, 27, 9056-9062。

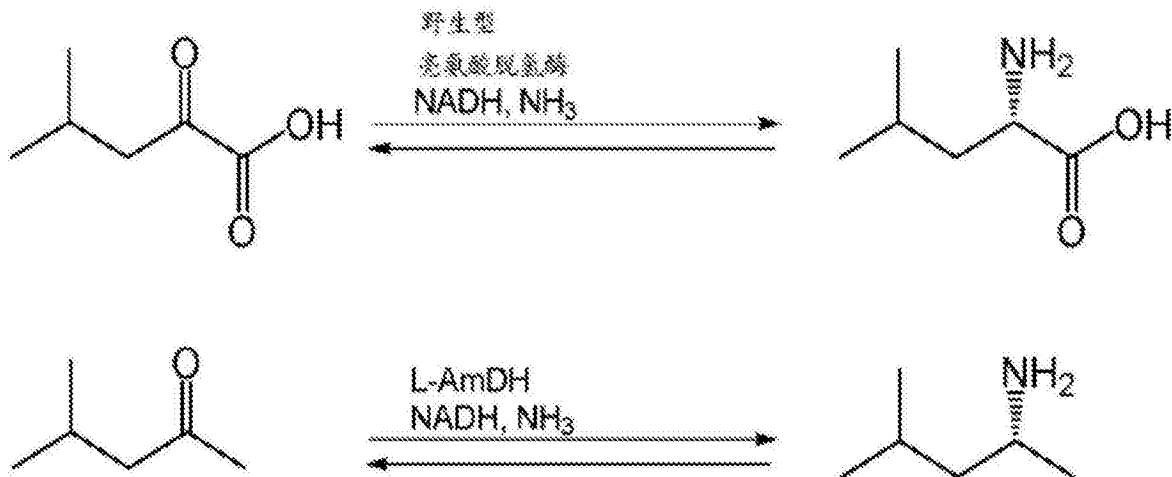
[0277] 关于嗜热脂肪芽孢杆菌野生型亮氨酸脱氢酶的序列, 施加以下突变以获得L-AmDH变体:

[0278] K68S-E114V-N262L-V291C

[0279] 由于来自嗜热脂肪芽孢杆菌的野生型亮氨酸脱氢酶的晶体结构不可获得, 故而可以通过研究类似酶即来自红球菌属物种(*Rhodococcus* sp.) M4的苯丙氨酸脱氢酶的晶体结构, 归属突变的功能。来自红球菌属物种M4的苯丙氨酸脱氢酶的晶体结构以不完整形式以及完整形式(PDB:1C1D和1BW9)可获得。

[0280] 遭突变的全部四个氨基酸残基均位于酶的活性位点。赖氨酸残基和天冬酰胺残基(在嗜热脂肪芽孢杆菌亮氨酸脱氢酶的序列中分别是K68和N262)与属于 α -酮酸底物的羧基部分的两个氧原子直接相互作用。因此, K68和N262在底物借助其带电荷侧链的结合过程中发挥重要作用。从嗜热脂肪芽孢杆菌亮氨酸脱氢酶的支架开始, 首先如下突变这两个位置: K68S和N262L。因此, 将两个带电荷的氨基酸残基替换为其他更疏水的不带电荷残基如丝氨酸和亮氨酸。引入的新残基允许与缺少羧基部分的非天然底物疏水相互作用。因此, L-AmDH偏好地接受甲基异丁酮, 这对应于将天然底物的羧基部分置换成甲基。第三突变涉及嗜热脂肪芽孢杆菌亮氨酸脱氢酶的残基V291。这个残基必然与红球菌属物种M4野生型苯丙氨酸脱氢酶的脯氨酸相关。因此, V291必然涉及相对于活性位点中K68和N262的位置从对面结合底物。从文献数据中看, V291C突变似乎有助于在不影响 k_{cat} 值的情况下降低甲基异丁酮的 K_m 值。第四突变涉及残基E114, 该残基被改变成缬氨酸。这个位置对应于红球菌属物种M4的同源苯丙氨酸脱氢酶中的脯氨酸。这个突变的影响难以基于同源酶的晶体结构合理化, 因为残基E114必须明显远离底物安置。从文献数据中看, 这个突变似乎可能有助于增加甲基异丁酮的 k_{cat} (大约2个数量级)。但是, 相邻残基的协同效应必然也发挥重要作用。通过以下方案说明底物接受性的变化:

[0281]



[0282] b) Ph-AmDH

[0283] 其他优选的酶是源自栗褐芽胞杆菌 (*Bacillus badius*) 苯丙氨酸脱氢酶的Ph-AmDH。文献中报道了野生型酶的序列：

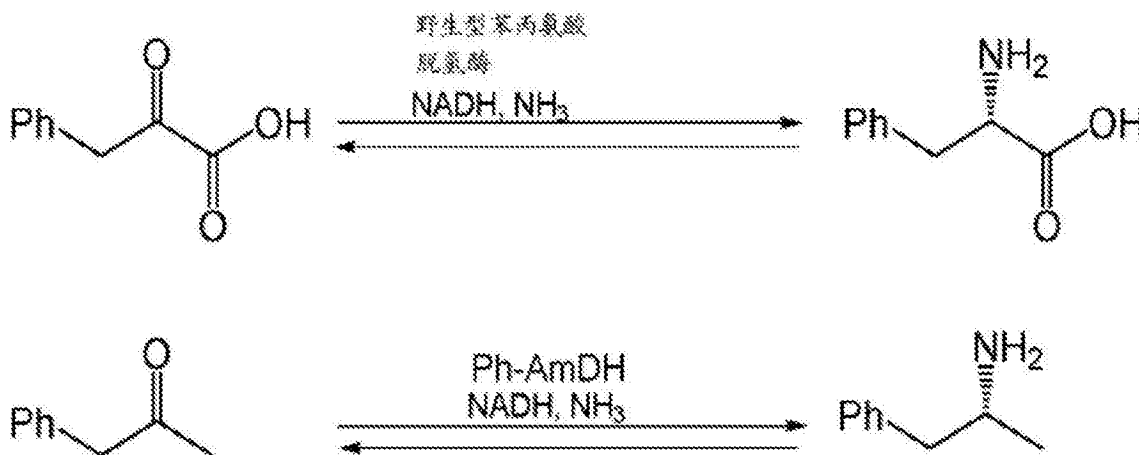
[0284] A. Yamada, T. Dai ri, Y. Ohno, X.-L. Huang, Y. Asano, Biosci. Biotech. Biochem. 1995, 59 (10), 1994-1995.

[0285] 关于野生型苯丙氨酸脱氢酶的序列，施加以下突变以获得Ph-AmDH变体：

[0286] K78S-N277L。

[0287] 来自栗褐芽胞杆菌的苯丙氨酸脱氢酶与来自嗜热脂肪芽胞杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的亮氨酸脱氢酶共有相关的序列相似性 (48% 同一性、66% 相似性)。因此，高度保守的残基K78和N277也涉及结合天然底物的α-酮酸的羧基部分。如先前在L-AmDH的情况下所述，两个协同性突变即赖氨酸 (K78) 至丝氨酸和天冬酰胺 (N277) 至亮氨酸产生针对目标非自然底物 (苯基丙酮及其衍生物) 的最好变体。在这种情况下无需进一步突变以增加酶活性。通过以下方案说明底物接受的变化：

[0288]



[0289] 实验部分

[0290] 除非另外声明，否则已经通过使用如基因工程、借助培育微生物发酵生产化学化合物和产物分析及分离中使用的标准设备、方法、化学品和生物化学物进行以下实验。还参见如上文援引的Sambrook等人和Chmiel等人。

[0291] 材料和方法

[0292] a) 一般方法

[0293] 以牛血清白蛋白作为标准品,使用Uptima BC测定蛋白质纯化试剂盒(Interchim, Montlucon, 法国),确定蛋白质浓度。在Mini-Sub Cell GT(BioRad, 慕尼黑)中进行SDS-PAGE。蛋白质用SimplyBlue™Safe Stain(Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)染色。

[0294] 使用配备FID检测器的Agilent 7890A GC系统,通过GC进行分析。使用氢作为载气。

[0295] 关于单步骤还原性胺化(实施例6),使用Agilent J&W DB-1701柱(30m, 250 μ m, 0.25 μ m),通过GC测量酮转化成相关的胺。

[0296] 用以下GC程序参数分析化合物1-13的反应(图3, 实施例6):进样器250 $^{\circ}$ C;恒定压力1巴;温度程序80 $^{\circ}$ C/保持6.5分钟;160 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持5分钟;280 $^{\circ}$ C/速率20 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持2分钟。

[0297] 用以下GC程序参数分析化合物14和15的反应(图3, 实施例6):进样器250 $^{\circ}$ C;恒定压力1巴;温度程序60 $^{\circ}$ C/保持6.5分钟;100 $^{\circ}$ C/速率20 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持1分钟;280 $^{\circ}$ C/速率20 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持2分钟。

[0298] 在胺产物衍生化成对应的乙酰胺后,使用手性GC柱(Agilent Chropack Chirasil Dex-CB柱, 25m, 320 μ m, 0.25 μ m)通过GC分析光学活性胺的对映体过量。通过添加溶解于乙酸酐(40微升)中的4-(N,N-二甲基氨基)吡啶(2mg),进行衍生化。将样品振摇大约1小时。随后将样品用水洗涤并用MgSO₄干燥。随后如下测量衍生化的化合物的ee值。

[0299] 用以下GC程序参数分析从还原性胺化化合物1-9(图3, 实施例6)获得的衍生化胺的ee:进样器200 $^{\circ}$ C;恒定流量1.7mL/分钟;温度程序100 $^{\circ}$ C/保持2分钟;130 $^{\circ}$ C/速率1 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持5分钟;170 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持10分钟;180 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持0分钟。

[0300] 用以下GC程序参数分析从还原性胺化化合物10-13(图3, 实施例6)获得的衍生化胺的对映体过量:进样器200 $^{\circ}$ C;恒定流量1.7mL/分钟;温度程序60 $^{\circ}$ C/保持2分钟;100 $^{\circ}$ C/速率5 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持2分钟;118 $^{\circ}$ C/速率1 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持5分钟;170 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持1分钟。

[0301] 关于立体翻转时醇的借氢生物胺化(实施例7)和构象保持时醇的借氢生物胺化(实施例8),使用更长的Agilent J&W DB-1701柱(60m, 250 μ m, 0.25 μ m),通过GC测量酮转化成相关的胺,所述的柱允许在单次运行中分离醇底物、酮中间体和胺产物。使用以下GC程序参数:80 $^{\circ}$ C/保持6.5分钟;160 $^{\circ}$ C/速率5 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持10分钟;280 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持2分钟。如先前所描述,在衍生化后,使用手性GC柱(Agilent Chropack Chirasil Dex-CB柱, 25m, 320 μ m, 0.25 μ m)通过GC分析光学活性胺的对映体过量。使用以下GC程序参数:进样器200 $^{\circ}$ C;恒定流量1.7mL/分钟;温度程序100 $^{\circ}$ C/保持2分钟;130 $^{\circ}$ C/速率1 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持5分钟;170 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持10分钟;180 $^{\circ}$ C/速率10 $^{\circ}$ C分钟 $^{-1}$ /保持0分钟。

[0302] b) 化学品

[0303] 全部化学品均购自Fluka-Sigma-Aldrich(慕尼黑, 德国)或Acros Organics(Geel, 比利时)。BDG-醛和BDG-胺由BASF提供。

[0304] c) 酶

[0305] GDH: 该酶购自Codexis。在实验-葡萄糖氧化成葡糖酸内酯-中用来同时还原NAD成

NADH的反应用这种类型的任何酶实施。备选地,为了再生NAD(P)H,可以使用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的GDH(Lampel,K.A.等人,Journal of Bacteriology,1986,166,(1),238)。这个氨基酸序列以AAA22463.1(SEQ ID NO:7)保藏于GenBank。

[0306] 全部蛋白质均在大肠杆菌中重组产生并且为了更易分离,任选地可以携带His标签:

[0307] Ph-AmDH(SEQ ID NO:2):如Abrahamson,M.J.等人,Advanced Synthesis and Catalysis,2013,355,(9),1780-1786和Abrahamson,M.J.等人,Angew.Chem.Int Ed,2012,51,3969描述的栗褐芽孢杆菌的苯丙氨酸脱氢酶的突变蛋白。野生型蛋白质(SEQ ID NO:1)还由Asano,Y.等人,European Journal of Biochemistry,1987,188,(1),153描述。

[0308] L-AmDH(SEQ ID NO:4):嗜热脂肪地芽孢杆菌的亮氨酸脱氢酶的突变蛋白。

[0309] L-AmDH源自嗜热脂肪地芽孢杆菌的亮氨酸脱氢酶。野生型酶的序列已经在以下论文中公开:S.Nagata,K.Tanizawa,N.Esaki,Y.Sakamoto,T.Ohshima,H.Tanaka,K.Soda,Biochemistry 1988,27,9056-9062。关于嗜热脂肪地芽孢杆菌的野生型亮氨酸脱氢酶的序列,施加以下突变以获得L-AmDH变体:K68S-E114V-N262L-V291C

[0310] 定制合成L-AmDH基因和Ph-AmDH基因(参考Carlson,R.,Nat Biotechnol.2009,27,1091)并且克隆入对应的表达载体。

[0311] AA-ADH(SEQ ID NO:5):参见WO 2005/108590der BASF SE或Höffken,H.W.等人,Biochemistry,2006,45,(1),82。

[0312] LBv-ADH(SEQ ID NO:6)。如此处所用的突变体是文献已知的:Schlieben,N.H.等人,Journal of Molecular Biology,2005,349,(4),801.DE19610984A1中描述了处于其野生型形式的生物催化剂。

[0313] HL-ADH(SEQ ID NO:8):使用同种型E,与同种型S相反,所述同种型E与乙醇反应,但是不与类固醇反应(参见Park,H.D.等人,J.boil.Chem.1991 266,(20)13296)

[0314] ADH-A(SEQ ID NO:9):参见Kosjek等人,Biotechnol.Bioeng.,(2004)86,(1)55和US 7,569,375

[0315] (ADH-hT):参见R.Cannio,M.Rossi,S.Bartolucci,Eur.J.Biochem.1994,222,345-352;b)X.Zhang,T.C.Bruice,Biochemistry 2007,46,837-843

[0316] d)基因的克隆

[0317] 例行DNA操作、PCR和重组质粒构建如(Sambrook J和Russell DW(2001)Molecular Cloning:a Laboratory Manual,第3版,Cold Spring.Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)中所述那样进行。

[0318] 实施例1:酶制备物

[0319] 1.1氧化性步骤的酶(醇氧化)

[0320] 通过依赖NADH的醇脱氢酶进行如例举的氧化性步骤。不能使用NADPH-依赖性醇脱氢酶(ADH),因为所例举的反应级联的偶联的第二还原性步骤由严格依赖NADH的胺脱氢酶(AmDH)催化。

[0321] 伯醇的氧化由单个伯醇脱氢酶进行。合适的伯醇脱氢酶是来自马肝的醇脱氢酶(HL-ADH)(a)D.H.Park,B.V.Plapp,J.Biol.Chem.1991,266,13296-13302;b)S.Al-Karadaghi,E.S.Cedergren-Zeppezauer,S.Hovmoller,K.Petratos,H.Terry,K.S.Wilson,

Acta Crystallogr. Sect. D1994, 50, 793-807) 或来自嗜热脂肪地芽孢杆菌的醇脱氢酶 (ADH-hT) (a) R. Cannio, M. Rossi, S. Bartolucci, Eur. J. Biochem. 1994, 222, 345-352; b) X. Zhang, T. C. Bruice, Biochemistry 2007, 46, 837-843)。

[0322] 通过两种立体互补性醇脱氢酶氧化仲醇的外消旋混合物。合适的普雷洛格 (V. Prelog, Pure Appl. Chem. 1964, 9, 119-130) NADH-依赖性醇脱氢酶是来自赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) 的脱氢酶 'A' (ADH-A) (B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, Biotechnol. Bioeng. 2004, 86, 56-62) 多种其他的普雷洛格 ADH 原则上是合适的。

[0323] 自然界中反普雷洛格 NADH-依赖性醇脱氢酶罕见。文献中已经描述了来自雷弗森菌属物种 (*Leifsonia* sp.) 和短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 的酶 (a) K. Inoue, Y. Makino, T. Dairi, N. Itoh, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006, 70, 418-426; b) S. Leuchs, L. Greiner, Chem. Biochem. Eng. Q. 2011, 25267-281)。然而, 在本发明中, 工程化的短乳杆菌 ADH (LBv-ADH) 已经作为反 ADH 使用 (N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Muller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, J. Mol. Biol. 2005, 349 801-813)。

[0324] 1.1.1 马肝醇脱氢酶 (HL-ADH) (SEQ ID NO:8)

[0325] HL-ADH 的基因克隆于 pET-28 载体中。克隆以酶总是过量表达为 N 末端加 His6 标签的酶的方式进行。根据来自供应商的标准方案, 在大肠杆菌 BL21 中转化质粒。在琼脂平板 LB/卡那霉素 ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素) 上培育菌落。大肠杆菌 BL21/HL-ADH 的单菌落取自琼脂平板并将它接种在 LB/Kan ((v.s.w/o 琼脂) 中并且在 37°C , 170 转/分钟持续 16 小时培育过夜。随后, 4 份由补充有 Zn^{2+} ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZnCl}_2$) 的 LB/K 培养基 ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 构成的大型培养物 ($4\times 800\text{mL}$) 用过夜培养物接种 (各自 15 mL)。在 2 小时后检查 OD_{600} 并且发现它略微高于 0.7。随后, 用 IPTG (终浓度 0.5 mM) 诱导培养物。将培养物在 170 转/分钟在 20°C 振摇 18 小时。收获培养物、离心并将沉淀物用 NaCl 水溶液 ($5\%\text{ww}^{-1}$) 洗涤。将沉淀物冷冻并贮存在 -20°C 。

[0326] 1.1.2 来自赤红球菌的醇脱氢酶 'A' (ADH-A) (SEQ ID NO:9)

[0327] 赤红球菌 ADH- 'A' 的基因克隆于 pET-21 载体中。克隆以酶总是过量表达为 C 末端加 His6 标签的酶的方式进行。根据来自供应商的标准方案, 在大肠杆菌 Tuner (DE3) 中转化质粒。在琼脂平板 LB/氨苄青霉素 ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上培育菌落。大肠杆菌 BL21/ADH- 'A' 的单菌落取自琼脂平板并将它接种在 LB/Amp ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素) 中并且在 37°C , 170 转/分钟持续 16 小时培育过夜。随后, 6 份由补充有 Zn^{2+} ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZnCl}_2$) 的 LB/Amp ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 构成的大型培养物 ($4\times 500\text{mL}$) 用过夜培养物接种 (各自 10 mL)。将培养物在 30°C 和 170 转/分钟培育 24 小时。随后, 将培养物用 IPTG (终浓度 2 mM) 诱导并且进一步以 170 转/分钟在 20°C 振摇 24 小时。收获培养物、离心并将沉淀物用 NaCl 水溶液 ($5\%\text{ww}^{-1}$) 洗涤。将沉淀物冷冻并贮存在 -20°C 。

[0328] 1.1.3 来自短乳杆菌的醇脱氢酶 (LBv-ADH) (SEQ ID NO:6)

[0329] 如 Schlieben, N. H. 等人, Journal of Molecular Biology, 2005, 349, (4), 801 中公开那样进行制备。

[0330] 1.1.4 来自 *Aromatoleum aromaticum* 的醇脱氢酶 (AA-ADH) (SEQ ID NO:5)

[0331] 如 H. W. Höffken, Duong Minh, T. Friedrich, M. Breuer, B. Hauer, R. Reinhardt,

R.Rabus, J.Heider, Biochemistry 2006, 45 82-93中公开那样进行制备。

[0332] 1.2还原性步骤(胺化)的酶

[0333] 通过由严格依赖NADH的胺脱氢酶(AmDH)进行所列举方法的还原性胺化步骤。这些酶转化酮(即,拥有低级烷基取代基)以及醛。

[0334] 具体地说,已经使用两种胺脱氢酶。第一种酶是源自栗褐芽胞杆菌的野生型苯丙氨酸脱氢酶(Ph-AmDH)的K78S、N277L变体。(EC 1.4.1.20, UniProt-ID: Q59224)。第二种酶是源自嗜热脂肪地芽胞杆菌的野生型亮氨酸脱氢酶(L-AmDH)的K68S、E114V、N262L、V291C变体(EC 1.4.1.9, GenBank-ID: M22977)。

[0335] 两个基因均已经化学地定制合成(参考Carlson, R., Nat. Biotechnol., 2009, 27, 1091)并且克隆入对应的表达载体。

[0336] 1.2.1源自栗褐芽胞杆菌的苯丙氨酸脱氢酶(Ph-AmDH) (SEQ ID NO:2)的胺脱氢酶变体

[0337] 源自栗褐芽胞杆菌的苯丙氨酸脱氢酶的Ph-AmDH变体的基因克隆于pET-28b载体中。克隆以酶总是过量表达为N末端加His6标签的酶的方式进行。根据来自供应商的标准方案,在大肠杆菌BL21 (DE3)中转化质粒。在琼脂平板LB/卡那霉素(50mg L⁻¹)上培育菌落。大肠杆菌BL21/Ph-AmDH的单菌落取自琼脂平板并将它接种在LB/Kan (50mg L⁻¹)中并且在37°C, 170转/分钟持续16小时培育过夜。随后,4份由LB/K (50mg L⁻¹)构成的大型培养物(4×800mL)用过夜培养物接种(各自15mL)。在2小时后检查OD₆₀₀并且发现它大约是0.7。随后,将培养物用IPTG(终浓度0.5mM)诱导并且进一步以170转/分钟在20°C振摇24小时。收获培养物、离心并将沉淀物用NaCl水溶液(5% wv⁻¹)洗涤。将沉淀物冷冻并贮存在-20°C。湿细胞总量是15.2g。

[0338] 将两根Ni²⁺柱(5mL×2)用水(50mL)洗涤并用裂解缓冲液(10mM咪唑, pH 8, 50mM KH₂PO₄, 300mM NaCl, 50mL)按流量2.4mL min⁻¹条件化。含有AmDH变体的湿细胞(约9.2g)悬浮于裂解缓冲液(40mL, 10mM咪唑缓冲液, pH 8, 50mM KH₂PO₄, 300mM NaCl)中。

[0339] 起初通过在20°C以150转/分钟振摇30-40分钟,用溶菌酶(1mg mL⁻¹)破裂完整细胞。将混合物用裂解缓冲液稀释直至80mL。随后,通过超声处理(5分钟,幅度45%,脉冲开启20秒,脉冲关闭40秒)完成破裂。将悬液离心(20000转/分钟,1小时,4°C)并且将上清液首先经0.45μm滤器过滤并且随后将0.20μm滤器过滤。将溶液装入先前条件化的柱(流量2mL min⁻¹)中。将柱用洗涤缓冲液(咪唑25mM, pH 8, 50mM KH₂PO₄, NaCl 225mM, 75mL)按流量2mL min⁻¹洗涤。随后用洗脱缓冲液1(5mL×14级分,咪唑200mM, pH 8, 50mM KH₂PO₄, NaCl 225mM)洗脱柱。随后,使用洗脱缓冲液2(7-8mL×5级分,咪唑350mM, pH 8, 50mM mM KH₂PO₄, NaCl 225mM),增加咪唑浓度。Bradford测定法以及SDS-凝胶PAGE显示AmDH从级分2至级分18洗脱。SDS-凝胶PAGE显示以升高的纯度(>80%)获得AmDH。

[0340] 纯化的酶溶液对磷酸钾缓冲液(8L, pH 8, 50mM)透析过夜。将酶从40mL浓缩直至9mL。酶浓度是53mg mL⁻¹。获得的AmDH最终量因此是477mg,从9.2g湿细胞获得,等于1.9L培养物(在不优化的情况下)。

[0341] 1.2.2源自嗜热脂肪地芽胞杆菌的亮氨酸脱氢酶(L-AmDH)的胺脱氢酶变体。(SEQ ID NO:4)

[0342] 如下进行制备:

[0343] 源自嗜热脂肪地芽孢杆菌亮氨酸脱氢酶的L-AmDH变体的基因克隆于pET-21载体中。克隆以酶总是过量表达为C末端加His6标签的酶的方式进行。根据来自供应商的标准方案,在大肠杆菌BL21 (DE3) 中转化质粒。大肠杆菌BL21/L-AmDH的单菌落取自琼脂平板(LB-Amp) 并将它接种在LB/Amp培养基(50mL, 100mg L⁻¹) 中并且在37°C, 170转/分钟培育过夜。此日后,4份大型培养物(4×800mL) 用过夜培养物接种(15mL)。在2小时后检查OD₆₀₀并且发现它略微高于0.7。随后,将培养物用IPTG(0.5mM) 诱导并且进一步在20°C, 170转/分钟振摇24小时。收获培养物、离心并且移除培养基。用NaCl洗涤沉淀物。

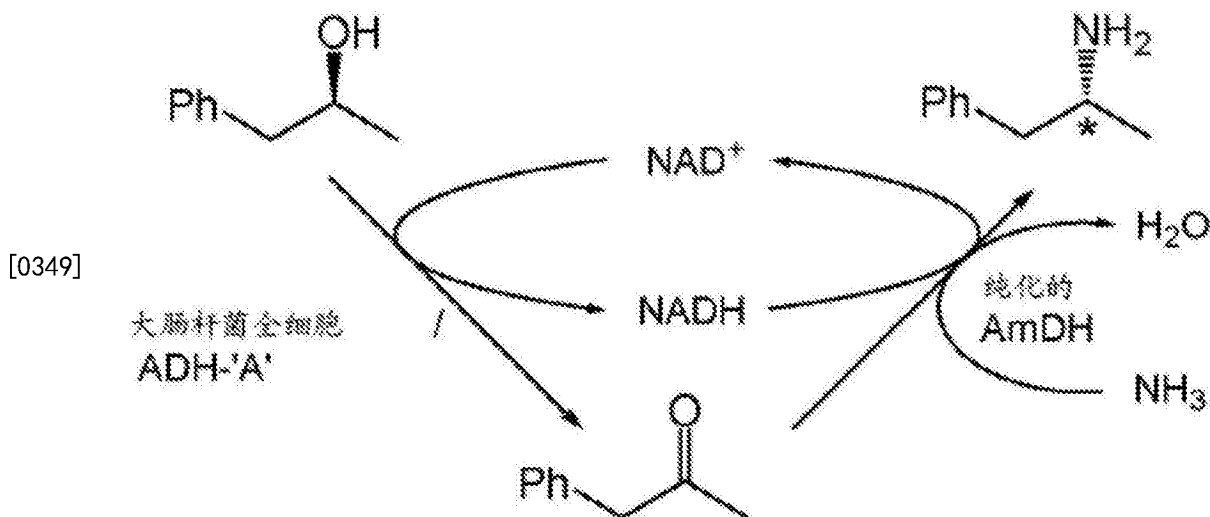
[0344] 将一根5mL Ni²⁺柱用水(25mL) 洗涤并用咪唑裂解缓冲液(10mM咪唑, pH 8, 50mM KH₂PO₄, 300mM NaCl, 25mL) 按流量3mL min⁻¹条件化。

[0345] 将含有L-AmDH的湿沉淀物(约6g) 悬浮于裂解缓冲液(25mL, 10mM咪唑缓冲液, pH 8, 50mM KH₂PO₄, 300mM NaCl) 中并且通过添加溶菌酶(1mg mL⁻¹) 和在20°C在150转/分钟振摇30-40分钟来破裂。将混合物用裂解缓冲液稀释直至50mL。随后,通过超声处理(5分钟,幅度45%, 脉冲开启20秒, 脉冲关闭40秒) 完成破裂。将悬液离心(20000转/分钟, 1小时, 4°C) 并且将上清液首先经0.45μm滤器过滤并且随后将0.20μm滤器过滤。将溶液装入先前条件化的柱(流量2mL min⁻¹) 中。将柱用洗涤水(25mL) 并且随后缓冲液(咪唑25mM, pH 8, 50mM KH₂PO₄, NaCl 225mM, 75mL) 洗涤。随后用洗脱缓冲液(3mL×12级分, 咪唑500mM, pH 8, 50mM KH₂PO₄, NaCl 225mM) 洗脱柱。Bradford测定法以及SDS-凝胶PAGE显示L-AmDH从级分2至级分5洗脱。SDS-凝胶PAGE还显示以高度纯化形式(>90%) 获得酶。

[0346] 纯化的酶溶液对磷酸钾缓冲液(8L, pH 8, 50mM) 透析过夜。将酶从40mL浓缩直至9mL。酶浓度是20mg mL⁻¹。获得的L-AmDH最终量因此是180mg, 从6g湿细胞获得, 等于1.6L培养物(在不优化的情况下)。

[0347] 实施例2: 用于胺化醇的氧化还原自足生物催化级联

[0348] 已经进行方案4中描述的级联:



[0350] 方案4. ADH与AmDH组合时醇的氧化还原自足胺化的原理的证据。

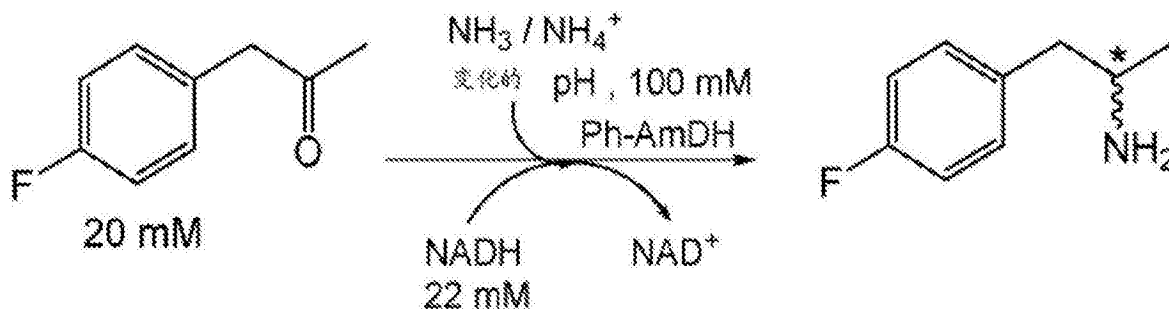
[0351] 进行普雷洛格醇脱氢酶ADH-'A' 与胺脱氢酶Ph-AmDH组合的初步实验。ADH-'A' 在不作任何进一步纯化的情况下以过量表达该催化剂的大肠杆菌完整细胞(约10mg完整细胞) 形式使用。AmDH作为纯化酶(50或100μL, 53mg mL⁻¹) 使用。AmDH如先前所述那样纯化。使用(S)-苯基2-丙醇(20mM) 作为测试底物。反应在如先前所述那样配制的氨/氯化铵缓冲剂

(1mL, 240mM, pH 9.6) 中进行。使用催化量的辅因子 NAD^+ (1mM)。将反应在170转/分钟的回转摇床中在30℃振摇1天。添加KOH (100 μL , 10N) 并且随后用EtOAc (2 \times 500 μL) 提取, 进行后处理。以25%转化 (注意仅240mM的低氨浓度)、完美化学选择性和以光学纯形式 (ee>99%) 获得胺产物(R)-苯基2-丙胺。因此, 我们展示了双酶级联的可行性。

[0352] 实施例3: 使用N端加His6标签的Ph-AmDH胺化的pH研究

[0353] 在不同pH和使用多种缓冲体系就胺化而言研究酶Ph-AmDH (来自栗褐芽胞杆菌的WT苯丙氨酸脱氢酶的AmDH变体) (方案3):

[0354]



[0355] 方案3. 使用Ph-AmDH的还原性胺化

[0356] 缓冲液由氨和铵种类构成。铵阳离子的反阴离子衍生自氯化物、硫酸盐、乙酸盐、磷酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、草酸盐或甲酸盐。

[0357] 使用对-氟-苯基-丙酮作为测试底物 (20mM)。在这组试验中, NADH以化学计量数量以10%过量 (1.1当量, 22mM) 使用。

[0358] 从蒸馏水中的氨溶液开始 (100mM氨浓度), 配制缓冲液。初始的pH是约11.5。随后, 通过取得这种氨溶液的等分试样并且通过添加后续等分试样的给定酸 (氢氯酸、硫酸、乙酸、磷酸、硼酸、柠檬酸、草酸、甲酸) 调节pH至不同值, 配制了离子种类不同和pH不同的多种缓冲体系。研究的pH范围显然取决于与氨组合的酸的性质。例如, 氯化铵缓冲体系在pH 8.2和初始pH约11.5之间存在。因此, 在这个pH范围在氯化铵缓冲液中研究生物催化还原性胺化。其他更弱的酸还允许研究中性pH以及中度酸性pH。

[0359] 图1中总结结果。与选择的缓冲液的类型无关, 总是在pH 8和9之间观察到最高转化。在测试的全部缓冲体系当中, 在pH 8.2-8.7的氯化铵就转化而言产生最好的结果。出于这个原因, 在开始时选择pH 8.7的氯化铵缓冲液作为进一步实验的缓冲液。

[0360] 还测量了生物胺化的对映体过量。胺产物的ee值%是>99% (R)。

[0361] 实验详情:

[0362] 通过将特定氨/铵离子缓冲液 (450 μL) 与酶溶液 (50 μL , 20U, 储存在磷酸盐缓冲液中pH 8, 50mM) 混合, 配制每份样品。添加酶溶液时, 氨/铵离子缓冲液的pH不变动, 这归因于缓冲液中高浓度的氨/铵离子。NADH以化学计量数量 (1.1当量, 22mM, 15.6mg mL⁻¹) 使用并且预溶解于氨缓冲液中。最终添加底物对-氟-苯基丙酮 (20mM, 1.34 μL)。将反应在30℃在回转摇床中以150转/分钟振摇38小时。通过添加KOH (100 μL , 10N) 终止反应, 用EtOAc (2 \times 300 μL) 提取并通过GC-FID分析样品。

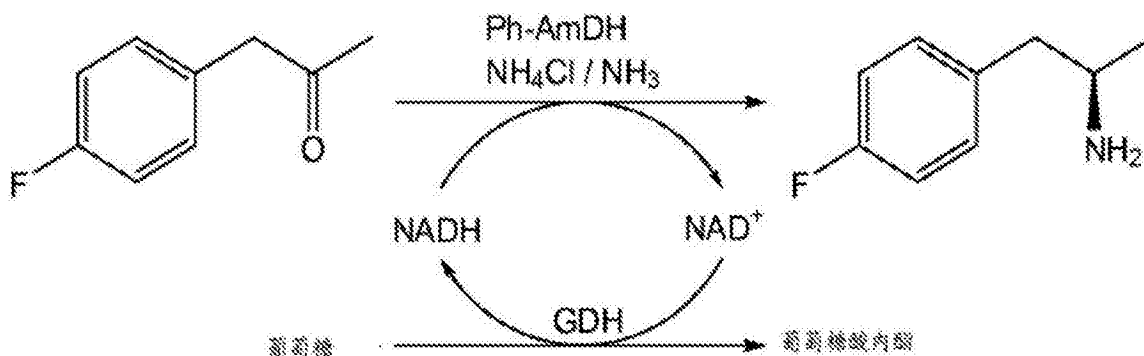
[0363] 在衍生化成对应乙酰胺后, 通过GC在手性相上分析对映体过量的胺。通过添加溶解于乙酸酐 (50mL) 中的4-(N,N-二甲基氨基) 吡啶 (3mg), 进行衍生化。在用水洗涤并且干燥

(MgSO₄)后,测量衍生化的化合物的ee值。

[0364] 实施例4:使用Ph-AmDH连同催化性NADH在多种浓度的氨/氯化铵缓冲液中还原性胺化

[0365] 在多种铵/氨浓度(这里,浓度指溶液中存在的游离氨和铵阳离子种类的总量)的氯化铵缓冲液(pH 8.7)中实施测试底物对-氟-苯基丙酮(20mM)的还原性胺化。在这组实验中,辅因子NADH按催化量(1mM)使用并且使用葡萄糖脱氢酶(GDH)和葡萄糖使其再循环(方案4):

[0366]



[0367] 方案4. 使用Ph-AmDH和催化性NADH的生物催化还原性胺化。

[0368] 反应在以下氯化铵缓冲液中在pH 8.7实施:100mM-200mM-381mM-566mM-727mM-893mM-1293mM-1695mM。反应在30℃实施16小时。表1中总结结果:

[0369] 表1

[0370]

样品	铵/氨浓度 [mM]	转化 [%]
----	---------------	-----------

[0371]

1	100	19.25
2	200	75.79
3	381	91.44
4	566	97.28
5	727	99.61
6	893	99.66
7	1293	99.92
8	1695	99.95

[0372] 当使用约700mM氨/铵时,对-氟-苯基丙酮(20mM)的生物催化还原性胺化导致定量转化(>99.5)。辅因子NADH按催化量(1mM)使用并且用GDH/葡萄糖再循环。胺产物的ee>99% (R)

[0373] 实验详情:

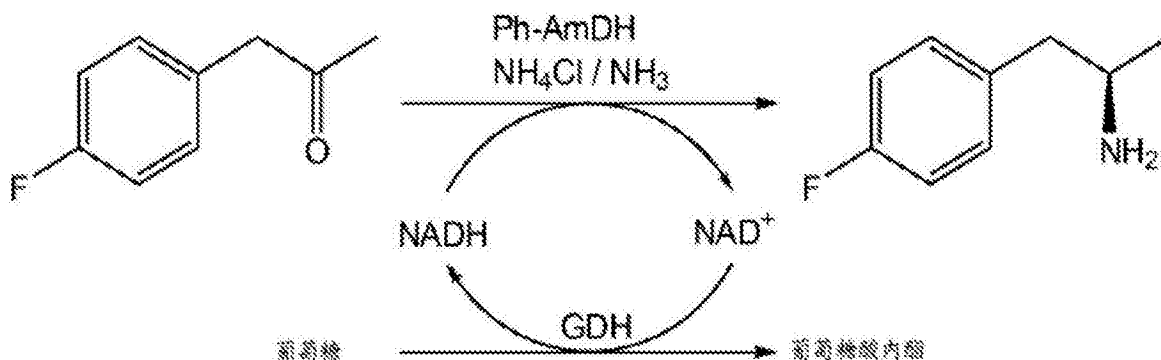
[0374] 使用含有催化性NADH(1mM,0.76mg mL⁻¹),GDH(Codexis,5mg,粗制冻干提取物)和葡萄糖(3当量,60mM,10.8mg mL⁻¹)的特定氨/氯化铵缓冲液(450μL),配制每份样品。随后,添加酶溶液(50μL,20U,储存在磷酸盐缓冲液中pH 8,50mM)。添加酶溶液时,氨/氯化铵缓冲液的pH未显著变动,这归因于缓冲液中高浓度的铵。最终添加底物对-氟-苯基丙酮(20mM,1.34μL)。将反应在30℃在回转摇床中以150转/分钟振摇16小时。通过添加KOH(100μL,10N)终止反应。将样品用EtOAc提取(2×300μL)并通过GC-FID分析。

[0375] 如先前所述那样测量对映体过量。

[0376] 实施例5:使用氯化铵/氨缓冲液(pH 8.7,727mM)还原性胺化的时间研究

[0377] 在先前的成组实验中,显示当应用35倍过量的氨/铵种类时,对-氟-苯基丙酮(20mM)的生物催化还原性胺化在16小时内提供定量转化。在这个进一步实验中,我们监测在相同反应条件(pH 8.7,727mM氨/铵种类,30℃)下的时间期间底物至胺产物的转化。用GDH和葡萄糖如先前所描述那样再循环催化性NADH(1mM)。

[0378]



[0379] 图2中描述结果。在这些反应条件下,定量转化在12小时后实现。胺产物的ee>99% (R)

[0380] 实验详情:

[0381] 使用含有催化性NADH(1mM,0.76mg mL⁻¹),GDH(Codexis,5mg,粗制冻干提取物)和葡萄糖(3当量,60mM,10.8mg mL⁻¹)的氨/氯化铵缓冲液(450μL),配制每份样品。随后,添加酶溶液(50μL,20U,储存在磷酸盐缓冲液中pH 8,50mM)。在添加酶溶液后,氨加铵阳离子的终浓度是727mM。添加酶溶液时,氨/氯化铵缓冲液的pH未显著变动,这归因于缓冲液中高浓度的铵。最终添加底物对-氟-苯基丙酮(20mM,1.34μL)。将反应在30℃在回转摇床中以150转/分钟振摇。通过添加KOH(100μL,10N)终止反应。将样品用EtOAc提取(2×300μL)并通过GC-FID分析。

[0382] 如先前所述那样测量对映体过量。

[0383] 实施例6:Ph-AmDH的底物范围

[0384] 现有技术中从未确定Ph-AmDH转化一组酮底物的底物范围。仅少数底物的初始反应速率已经通过分光光度测定法测定。因此,针对一组底物(包括芳基酮以及烷基酮)研究Ph-AmDH催化的生物催化还原性胺化(图3):

[0385] 底物浓度是20mM。使用氨/氯化铵缓冲液(pH 8.7,727mM)。使用GDH和葡萄糖如先前所提到那样再循环催化性NADH(1mM)。反应在30℃进行16小时。表2中报告结果。

[0386] 表2

[0387]

底物	转化
1	>99
2	22
3	15
4	88
5	5
6	10
7	71
8	68
9	n.c.
10	26
11	32
12	3
13	2
14	10
15	96

[0388] n.c. = 无转化

[0389] 测试的全部底物测试均转化, 苯乙酮例外。

[0390] 测量了转化底物1的ee。ee>99% (R)。

[0391] 实验详情:

[0392] 使用含有催化性NADH (1mM, 0.76mg mL⁻¹), GDH (Codexis, 5mg, 粗制冻干提取物) 和葡萄糖 (3当量, 60mM, 10.8mg mL⁻¹) 的氨/氯化铵缓冲液 (450μL), 配制每份样品。随后, 添加酶溶液 (50μL, 20U, 储存在磷酸盐缓冲液中pH 8, 50mM)。在添加酶溶液后, 氨加铵阳离子的终浓度是727mM。添加酶溶液时, 氨/氯化铵缓冲液的pH未显著变动, 这归因于缓冲液中高浓度的铵。最终添加底物 (20mM)。将反应在30°C在回转摇床中以150转/分钟振摇16小时。通过添加KOH (100μL, 10N) 终止反应。将样品用EtOAc提取 (2×300μL) 并通过GC-FID分析。

[0393] 如先前所述那样测量ee。

[0394] 实施例7: 立体翻转时醇的借氢生物胺化

[0395] 在这组实验中, 通过来自 *Aromatoleum aromaticum* 的普雷洛格醇脱氢酶 (AA-ADH) 与Ph-AmDH组合, 实施 (S)-苯基-2-丙醇 (20mM) 的胺化。由于Ph-AmDH是 (R)-选择性的, 总体生物胺化过程在构象反转的情况下推进。酶以其纯化形式使用。生物胺化在氨/氯化铵缓冲液中在pH 8.7中实施。

[0396] 使用 (S)-苯基-2-丙醇 (20mM) 和催化性NAD⁺ 在1mM浓度 (5mol%) 进行初步实验。在第一组实验中, 氨/氯化铵的浓度从100mM变动至4680mM, 旨在研究在30°C时24小时反应时间后对转化的影响。

[0397] 氨/氯化铵缓冲液按以下浓度使用:

[0398] 100mM-200mM-400mM-1000mM-1500mM-2000mM-2500mM-3000mM-3500mM-4000mM-4680mM。表3中报告结果。

[0399] 表3

$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ [mM]	胺	醇	酮
100	4.86	91.61	3.44
200	11.55	83.74	4.71
[0400] 400	31.50	62.19	6.31
1000	59.05	36.01	4.94
1500	75.20	20.42	4.38
2000	87.14	8.53	4.33
2500	83.52	12.31	4.17
3000	84.84	10.83	4.33
[0401] 3500	74.72	19.89	5.39
4000	80.56	14.54	4.90
4680	59.75	35.08	5.17

[0402] 在第一组实验中,24小时反应时间后观察到的最高转化是87%。胺产物的ee值>99% (R)。使用2M氨/氯化铵实现这个ee值。底物按20mM浓度使用。因此,2M氨/氯化铵缓冲液用于其他实验。

[0403] 在第二组实验中,来自Aromatoleum aromaticum的普雷洛格醇脱氢酶(AA-ADH)与Ph-AmDH组合,在这段时间期间监测(S)-苯基-2-丙醇(20mM)的转化。配制不同的样品并在不同时间使其猝灭:

[0404] 1小时-3小时-6小时-12小时-18小时-24小时-48小时-结束(144小时)。底物浓度保持在20mM,而辅因子 NAD^+ 的浓度变动:1mM-0.5mM-0.2mM-0.1mM。在表4中和图4、图5、图6和图7中报告这些实验的结果。

[0405] 终产物的ee>99% (R)

[0406] 表4

[0407]

时间 [h]	转化 [%]											
	NAD ⁺ [1 mM]			NAD ⁺ [0.5 mM]			NAD ⁺ [0.2 mM]			NAD ⁺ [0.1 mM]		
	Am	Alc	Ket	Am	Alc	Ket	Am	Alc	Ket	Am	Alc	Ket
1	4.02	89.91	6.07	2.07	94.79	3.14	1.30	97.07	1.63	0.57	98.51	0.92
3	11.77	81.20	7.03	8.44	86.89	4.67	5.07	91.85	3.08	1.74	95.99	2.27
6	25.78	68.21	6.01	9.91	87.01	3.08	7.54	90.76	1.70	2.87	96.12	1.01
12	47.80	46.56	5.64	37.50	59.46	3.04	13.87	84.77	1.36	5.95	93.27	0.78
18	58.55	36.28	5.17	40.02	57.01	2.97	22.03	76.51	1.46	8.58	90.55	0.87
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35.15	63.55	1.30	15.56	83.44	1.00
48	91.10	5.74	3.16	87.00	10.51	2.49	40.07	58.19	1.74	n.d.	n.d.	n.d.
结束	93.15	4.91	1.94	92.61	5.96	1.43	75.92	22.86	1.22	34.35	64.86	0.79

[0408] Am = (R)-苯基-2-丙胺

[0409] Alc = (S)-苯基-2-丙醇

[0410] Ket = 苯基丙酮

[0411] 实验详情:

[0412] AA-ADH在大肠杆菌中过量表达并且由BASF作为冷冻粗制的细胞提取物供应。将等分试样的粗制细胞提取物解冻和离心。移除细胞残片并将上清液首先通过脱盐柱。随后,通过离子交换色谱(IEC)和体积排阻色谱(SEC)纯化酶溶液。将纯化的酶溶液载入PD10柱并用储存缓冲液(Tris-HCl pH 8, 50mM, 含有ZnSO₄ 0.1mM)洗脱。将酶溶液浓缩、在液氮中冷冻并在-80°C贮存。

[0413] 在大肠杆菌中过量表达携带N末端His₆标签的Ph-AmDH。在细胞破裂后,将裂解物离心并移除细胞残片。过滤上清液并且通过Ni²⁺亲和色谱纯化酶溶液。纯化的酶溶液在磷酸盐缓冲液(pH 8, 50mM)中透析。随后使用生物素酰化的人凝血酶(GE Healthcare)切去Ph-AmDH的N末端His₆标签。通过添加链霉亲和素琼脂糖珠随后离心和过滤,移除残余的凝血酶。再次使用Ni²⁺亲和色谱,将Ph-AmDH与切割的His₆标签分离。将最终的酶溶液在磷酸盐缓冲液(pH 8, 50mM)中透析过夜、浓缩、在液氮中冷冻并在-80°C贮存。

[0414] 代表性生物催化胺化:使用含有催化性含有催化性NAD⁺(终浓度1mM, 0.76mg mL⁻¹)的氨/氯化铵缓冲液(430μL), 配制每份样品。添加AA-ADH酶溶液(20μL, 47mg mL⁻¹, 在Tris-HCl缓冲液中pH 8, 50mM)和Ph-AmDH溶液(50μL, 20U, 储存在磷酸盐缓冲液中pH 8, 50mM)。(添加酶溶液时,氨/氯化铵缓冲液的pH未显著变动,这归因于缓冲液中高浓度的氨/铵离子。溶液中报告的氨/铵离子浓度考虑了因添加酶溶液所致的稀释的影响)。最终添加底物(20mM, 1.34μL)。将反应在30°C在回转摇床中以150转/分钟振摇24小时。通过添加KOH(100μL, 10N)终止反应。将样品用EtOAc提取(2×300μL)并通过GC-FID分析。

[0415] 相同方案应用于时间研究。唯一差异是变动的辅因子NAD⁺浓度(1mM、0.5mM、0.2mM、0.1mM)。

[0416] 如先前所述那样测定ee。

[0417] 实施例8:构象保持时醇的借氢生物胺化

[0418] 在这组实验中,通过源自短乳杆菌的反普雷洛格醇脱氢酶变体(LBv-ADH)与Ph-AmDH组合,实施(R)-苯基-2-丙醇(20mM)的胺化。由于Ph-AmDH是(R)-选择性的,总体生物胺化过程在构象保持的情况下推进。酶以其纯化形式使用。如先前所描述,生物胺化的初步尝试在氨/氯化铵缓冲液中在pH 8.7中实施。

[0419] 使用(R)-苯基-2-丙醇(20mM)和催化性NAD⁺在1mM浓度(5mol%)进行初步实验。在第一组实验中,氨/氯化铵的浓度从200mM变动至2500mM,旨在研究在30°C时24小时反应时间后对转化的影响。

[0420] 氨/氯化铵缓冲液按以下浓度使用:200mM-500mM-1000mM-1500mM-2000mM-2500mM。表5中报告结果。

[0421] 表5

$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ [mM]	胺	醇	酮
200	1.37	96.40	2.23
500	1.31	97.18	1.51
1000	0.59	98.45	0.96
1500	0.16	99.19	0.65
2000	n.d.	99.44	0.56
2500	n.d.	99.42	0.58

[0422] 在第一组实验中,24小时反应时间后观察到的最高转化仅是1.37%。实际上,在使用的反应条件下出现酶沉淀(可能是LBv-ADH)。

[0424] 归因于LBv-ADH在pH>8.5在铵种类存在下的稳定性较低,我们决定在较低pH开展这个级联。但是,氯化铵缓冲液的理论pH下限值是约8.2。因此,氯化铵缓冲液的缓冲能力在pH 8.5总是极低。因此,我们决定改变用于这个级联的缓冲液类型。在针对采用Ph-AmDH还原性胺化所测试的缓冲体系当中(如上文报道),甲酸盐、草酸盐、乙酸盐和柠檬酸盐最佳。我们选择甲酸盐作为缓冲体系,因为它在pH约7时显示最高的缓冲能力。另外,草酸盐、乙酸盐和柠檬酸盐能充当整合剂。必须避免这一点,原因在于以下事实:Zn²⁺是本发明中使用的醇脱氢酶的必需催化性离子。另外,LBv-ADH拥有对其稳定性必需的配位的Mg²⁺(即结构性镁)。另外,在反应缓冲液中还添加外源Mg²⁺。显示这种添加增加纯化期间野生型LB-ADH的稳定性。

[0425] 这组试实验中使用含有Mg²⁺(作为1mM浓度的MgCl₂六水合物)的HCOONH₄/NH₃缓冲液。使用(R)-苯基-2-丙醇(20mM)和催化性NAD⁺在1mM浓度(5mol%)进行实验。pH变动:7-7.5-8-8.5。氨/铵离子的浓度变动:0.5M-1M-2M。反应在回转摇床上在30°C,180转/分钟进行24小时。表6中报告结果。

[0426] 终产物的ee>99%(R)

[0427] 表6

[0428]

样品	pH	NH ₃ /NH ₄ ⁺ 浓度 [M]	转化[%]		
			胺	醇	酮
1	7	0.5	4.04	94.20	1.76
2	7	1	8.14	90.03	1.83
3	7	2	21.11	76.75	2.14
4	7.5	0.5	5.17	92.95	1.88
5	7.5	1	19.26	78.17	2.57
6	7.5	2	73.64	22.52	3.84
7	8	0.5	4.50	93.39	2.11
8	8	1	14.04	83.09	2.86
9	8	2	93.80	2.08	4.12
10	8.5	0.5	2.56	94.93	2.51
11	8.5	1	7.90	89.61	2.48
12	8.5	2	73.85	22.06	4.09

[0429] 在这组实验中,24小时反应时间后观察到的最高转化是93.80%。这是使用2M氨/甲酸铵缓冲液在pH 8实现的。底物按20mM浓度使用。

[0430] 实验详情:

[0431] LBv-ADH在大肠杆菌中过量表达并且由BASF作为冷冻粗制的细胞提取物供应。将等分试样的粗制细胞提取物解冻和离心。移除细胞残片并将上清液首先通过脱盐柱。随后,通过离子交换色谱(IEC)和体积排阻色谱(SEC)纯化酶溶液。将纯化的酶溶液载入PD10柱并用储存缓冲液(Tris-HCl pH 8,50mM,含有MgCl₂ 1mM和NAD⁺0.1mM)洗脱。将酶溶液浓缩、在液氮中冷冻并在-80℃贮存。

[0432] 如先前所述那样纯化Ph-AmDH。

[0433] 代表性生物催化胺化:使用含有催化性NAD⁺(终浓度1mM,0.76mg mL⁻¹)的氨/甲酸铵缓冲液(425μL),配制每份样品。添加LBv-ADH酶溶液(25μL,38mg mL⁻¹,在Tris-HCl缓冲液中pH 8,50mM)和Ph-AmDH溶液(50μL,20U,储存在磷酸盐缓冲液中pH 8,50mM)。(添加酶溶液时,氨/甲酸铵缓冲液的pH未显著变动,这归因于缓冲液中高浓度的氨/铵离子。溶液中报告的氨/铵离子浓度考虑了因添加酶溶液所致的稀释的影响)。最终添加底物(20mM,1.34μL)。将反应在30℃在回转摇床中以150转/分钟振摇24小时。通过添加KOH(100μL,10N)终止反应。将样品用EtOAc提取(2×300μL)并通过GC-FID分析。

[0434] 如先前所述那样测定ee。

[0435] 表7:SEQ ID NO列表

[0436]

SEQ ID NO:	缩写名	描述/起源	类型
1	Ph-DH	栗褐芽胞杆菌(野生型序列)	AS
2	Ph-AmDH	具有胺脱氢酶活性的 Ph-DH 突变体	AS
3	L-DH	嗜热脂肪地芽胞杆菌(野生 型序列)	AS
4	L-AmDH	具有胺脱氢酶活性的 L-DH 突变体	AS
5	AA-ADH	<i>Aromatoleum</i> <i>aromaticum</i> (野生型序列)	AS
6	LBv-ADH	短乳杆菌(突变体序列)	AS
7	GDH	枯草芽胞杆菌	AS
8	HL-ADH	普氏野马 (<i>Equus ferus</i> <i>cabalus</i>)	AS
9	ADH-A	赤红球菌	AS
10	ADH-hT	嗜热脂肪地芽胞杆菌	AS

[0437] AS=氨基酸序列

[0438] NS=核苷酸序列

[0439] 通过引用的方式并入如本文中援引的文献。

序列表

<110> BASF SE
 <120> 醇类的氧化还原自足性生物催化胺化
 <130> M/54453
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 380
 <212> FAT
 <213> 粟褐芽胞杆菌
 <400> 1
 Met Ser Leu Val Glu Lys Thr Ser Ile Ile Lys Asp Phe Thr Leu Phe
 1 5 10 15
 Glu Lys Met Ser Glu His Glu Gln Val Val Phe Cys Asn Asp Pro Ala
 20 25 30
 Thr Gly Leu Arg Ala Ile Ile Ala Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro
 35 40 45
 Ala Leu Gly Gly Cys Arg Met Gln Pro Tyr Asn Ser Val Glu Glu Ala
 50 55 60
 Leu Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ser Lys Gly Met Thr Tyr Lys Cys Ala
 65 70 75 80
 Ala Ser Asp Val Asp Phe Gly Gly Gly Lys Ala Val Ile Ile Gly Asp
 85 90 95
 Pro Gln Lys Asp Lys Ser Pro Gln Leu Phe Arg Ala Phe Gly Gln Phe
 100 105 110
 Val Asp Ser Leu Gly Gly Arg Phe Tyr Thr Gly Thr Asp Met Gly Thr
 115 120 125
 Asn Met Glu Asp Phe Ile His Ala Met Lys Gln Thr Asn Cys Ile Val
 130 135 140
 Gly Val Pro Glu Ala Tyr Gly Gly Gly Asp Ser Ser Ile Pro Thr
 145 150 155 160
 Ala Met Gly Val Leu Tyr Gly Ile Lys Ala Thr Asn Lys Met Leu Phe
 165 170 175
 Gly Lys Asp Asp Leu Gly Gly Val Thr Tyr Ala Ile Gln Gly Leu Gly
 180 185 190
 Lys Val Gly Tyr Lys Val Ala Glu Gly Leu Leu Glu Glu Gly Ala His
 195 200 205
 Leu Phe Val Thr Asp Ile Asn Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ile Glu Glu
 210 215 220
 Lys Ala Lys Thr Thr Ser Gly Ser Val Thr Val Val Ala Ser Asp Gly
 225 230 235 240
 Ile Tyr Ser Gln Glu Ala Asp Val Phe Val Pro Cys Ala Phe Gly Gly
 245 250 255
 Val Val Asn Asp Glu Thr Met Lys Gln Phe Lys Val Lys Ala Ile Ala
 260 265 270
 Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Leu Thr Glu Asp His Gly Arg His Leu
 275 280 285
 Ala Asp Lys Gly Ile Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr Ile Val Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Leu Ile Gln Val Ala Asp Glu Leu Tyr Glu Val Asn Lys Glu Arg
 305 310 315 320
 Val Leu Ala Lys Thr Lys His Ile Tyr Asp Ala Ile Leu Glu Val Tyr
 325 330 335
 Gln Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ile Thr Thr Met Glu Ala Ala Asn Arg
 340 345 350

[0001]

Met Cys Glu Gln Arg Met Ala Ala Arg Gly Arg Arg Asn Ser Phe Phe
 355 360 365

Thr Ser Ser Val Lys Pro Lys Trp Asp Ile Arg Asn
 370 375 380

<210> 2
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> P5DH 突变体

<400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10

Arg Gly Ser His Met Ser Leu Val Glu Lys Thr Ser Ile Ile Lys Asp
 20 25 30

Phe Thr Leu Phe Glu Lys Met Ser Glu His Glu Gln Val Phe Cys
 35 40 45

Asn Asp Pro Ala Thr Gly Leu Arg Ala Ile Ile Ala Ile His Asp Thr
 50 55 60

Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Cys Arg Met Gln Pro Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Val Glu Glu Ala Leu Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ser Lys Gly Met Thr
 85 90 95

Tyr Ser Cys Ala Ala Ser Asp Val Asp Phe Gly Gly Gly Lys Ala Val
 100 105 110

Ile Ile Gly Asp Pro Gln Lys Asp Lys Ser Pro Glu Leu Phe Arg Ala
 115 120 125

Phe Gly Gln Phe Val Asp Ser Leu Gly Gly Arg Phe Tyr Thr Gly Thr
 130 135 140

Asp Met Gly Thr Asn Met Glu Asp Phe Ile His Ala Met Lys Glu Thr
 145 150 155 160

Asn Cys Ile Val Gly Val Pro Glu Ala Tyr Gly Gly Gly Asp Ser
 165 170 175

Ser Ile Pro Thr Ala Met Gly Val Leu Tyr Gly Ile Lys Ala Thr Asn
 180 185 190

Lys Met Leu Phe Gly Lys Asp Asp Leu Gly Gly Val Thr Tyr Ala Ile
 195 200 205

Gln Gly Leu Gly Lys Val Gly Tyr Lys Val Ala Glu Gly Leu Leu Glu
 210 215 220

Glu Gly Ala His Leu Phe Val Thr Asp Ile Asn Glu Gln Thr Leu Glu
 225 230 235 240

Ala Ile Gln Glu Lys Ala Lys Thr Thr Ser Gly Ser Val Thr Val Val
 245 250 255

Ala Ser Asp Glu Ile Tyr Ser Gln Glu Ala Asp Val Phe Val Pro Cys
 260 265 270

Ala Phe Gly Gly Val Val Asn Asp Glu Thr Met Lys Gln Phe Lys Val
 275 280 285

Lys Ala Ile Ala Gly Ser Ala Asn Leu Gln Leu Leu Thr Glu Asp His
 290 295 300

Gly Arg His Leu Ala Asp Lys Gly Ile Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr Ile
 305 310 315 320

Val Asn Ser Gly Gly Leu Ile Gln Val Ala Asp Glu Leu Tyr Glu Val
 325 330 335

Asn Lys Glu Arg Val Leu Ala Lys Thr Lys His Ile Tyr Asp Ala Ile

[0002]

```

340          345          350
Leu Glu Val Tyr Cln Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ile Thr Thr Met Glu
355          360          365

Ala Ala Asn Arg Met Cys Glu Gln Arg Met Ala Ala Arg Gly Arg Arg
370          375          380

Asn Ser Phe Phe Thr Ser Ser Val Lys Pro Lys Trp Asp Ile Arg Asn
385          390          395          400

<210> 3
<211> 429
<212> PRT
<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<400> 3
Met Glu Leu Phe Lys Tyr Met Glu Thr Tyr Asp Tyr Glu Cln Val Leu
1          5          10          15

Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala Ile His
20          25          30

Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Met Trp Met Tyr
35          40          45

Asn Ser Glu Glu Glu Ala Leu Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Gly
50          55          60

Met Thr Tyr Lys Asn Ala Ala Ala Gly Leu Asn Leu Gly Gly Gly Lys
65          70          75          80

Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys Asp Lys Asn Glu Ala Met Phe
85          90          95

Arg Ala Phe Gly Arg Phe Ile Gln Gly Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Thr
100         105         110

Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Val Ala Asp Met Asp Ile Ile Tyr Cln
115         120         125

Glu Thr Asp Tyr Val Thr Gly Ile Ser Pro Glu Phe Gly Ser Ser Gly
130         135         140

Asn Pro Ser Pro Ala Thr Ala Tyr Gly Val Tyr Arg Gly Met Lys Ala
145         150         155         160

Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Ser Asp Ser Leu Glu Gly Lys Val Val
165         170         175

Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala Tyr His Leu Cys Arg His Leu
180         185         190

His Glu Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr Asp Ile Asn Lys Glu Val
195         200         205

Val Ala Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly Ala Lys Ala Val Asp Pro Asn
210         215         220

Asp Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile Phe Ala Pro Cys Ala Leu Gly
225         230         235         240

Gly Ile Ile Asn Asp Gln Thr Ile Pro Gln Leu Lys Ala Lys Val Ile
245         250         255

Ala Gly Ser Ala Asp Asn Gln Leu Lys Glu Pro Arg His Gly Asp Ile
260         265         270

Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Ile Asn Ala
275         280         285

Gly Gly Val Ile Asn Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn Arg Glu
290         295         300

Arg Ala Met Lys Lys Ile Glu Gln Ile Tyr Asp Asn Ile Glu Lys Val
305         310         315         320

Phe Ala Ile Ala Lys Arg Asp Asn Ile Pro Thr Tyr Val Ala Ala Asp
325         330         335
    
```

[0003]

Arg Met Ala Glu Glu Arg Ile Glu Thr Met Arg Lys Ala Ala Ser Eln
 340 345 350

Phe Leu Gln Asn Gly His His Ile Leu Ser Arg Arg Pro Arg Pro Leu
 355 360 365

Thr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Arg Arg Ala Asp Asp Gly Gly Thr Thr
 370 375 380

Thr Met Gln Glu Gln Lys Phe Arg Ile Leu Thr Ile Asn Pro Gly Ser
 385 390 395 400

Thr Ser Thr Lys Ile Gly Val Phe Glu Asn Glu Arg Ala Ile Ala Ser
 405 410 415

Lys Lys Arg Ser Ala Thr Arg Ala Gly Ala Ser Ala Ile
 420 425

<210> 4
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> L-DH 突变体

<400> 4

Met Glu Leu Phe Lys Tyr Met Glu Thr Tyr Asp Tyr Glu Gln Val Leu
 1 5 10 15

Phe Cys Gln Asp Lys Glu Ser Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala Ile His
 20 25 30

Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu Gly Gly Thr Arg Met Trp Met Tyr
 35 40 45

Asn Ser Glu Glu Glu Ala Leu Glu Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Gly
 50 55 60

Met Thr Tyr Ser Asn Ala Ala Ala Gly Leu Asn Leu Gly Gly Gly Lys
 65 70 75 80

Thr Val Ile Ile Gly Asp Pro Arg Lys Asp Lys Asn Glu Ala Met Phe
 85 90 95

Arg Ala Phe Gly Arg Phe Ile Gln Gly Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Thr
 100 105 110

Ala Val Asp Val Gly Thr Thr Val Ala Asp Met Asp Ile Ile Tyr Gln
 115 120 125

Glu Thr Asp Tyr Val Thr Gly Ile Ser Pro Glu Phe Gly Ser Ser Gly
 130 135 140

Asn Pro Ser Pro Ala Thr Ala Tyr Gly Val Tyr Arg Gly Met Lys Ala
 145 150 155 160

Ala Ala Lys Glu Ala Phe Gly Ser Asp Ser Leu Glu Gly Lys Val Val
 165 170 175

Ala Val Gln Gly Val Gly Asn Val Ala Tyr His Leu Cys Arg His Leu
 180 185 190

His Glu Glu Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr Asp Ile Asn Lys Glu Val
 195 200 205

Val Ala Arg Ala Val Glu Glu Phe Gly Ala Lys Ala Val Asp Pro Asn
 210 215 220

Asp Ile Tyr Gly Val Glu Cys Asp Ile Phe Ala Pro Cys Ala Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Ile Ile Asn Asp Gln Thr Ile Pro Gln Leu Lys Ala Lys Val Ile
 245 250 255

Ala Gly Ser Ala Asp Leu Gln Leu Lys Glu Pro Arg His Gly Asp Ile
 260 265 270

Ile His Glu Met Gly Ile Val Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Ile Asn Ala
 275 280 285

[0004]

Gly Gly Cys Ile Asn Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn Arg Glu
 290 295 300

Arg Ala Met Lys Lys Ile Glu Gln Ile Tyr Asp Asn Ile Glu Lys Val
 305 310 315 320

Phe Ala Ile Ala Lys Arg Asp Asn Ile Pro Thr Tyr Val Ala Ala Asp
 325 330 335

Arg Met Ala Glu Glu Arg Ile Glu Thr Met Arg Lys Ala Ala Ser Gln
 340 345 350

Phe Leu Gln Asn Gly His His Ile Leu Ser Arg Arg Pro Arg Pro Leu
 355 360 365

Thr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Arg Arg Ala Asp Asp Gly Gly Thr Thr
 370 375 380

Thr Met Gln Glu Gln Lys Phe Arg Ile Leu Thr Ile Asn Pro Gly Ser
 385 390 395 400

Thr Ser Thr Lys Ile Gly Val Phe Glu Asn Glu Arg Ala Ile Ala Ser
 405 410 415

Lys Lys Arg Ser Ala Thr Arg Ala Gly Ala Ser Ala Ile
 420 425

<210> 5
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Arothron maculatus.

<400> 5

Met Thr Gln Arg Leu Lys Asp Lys Leu Ala Val Ile Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Asn Gly Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Arg Phe Ala Val Glu Gly Ala
 20 25 30

Asp Ile Ala Ile Ala Asp Leu Val Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ala Ala
 35 40 45

Ile Arg Asn Leu Gly Arg Arg Val Leu Thr Val Lys Cys Asp Val Ser
 50 55 60

Gln Pro Gly Asp Val Glu Ala Phe Gly Lys Gln Val Ile Ser Thr Phe
 65 70 75 80

Gly Arg Cys Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Tyr Pro Leu Ile
 85 90 95

Pro Phe Asp Glu Leu Thr Phe Glu Gln Trp Lys Lys Thr Phe Glu Ile
 100 105 110

Asn Val Asp Ser Gly Phe Leu Met Ala Lys Ala Phe Val Pro Gly Met
 115 120 125

Lys Arg Asn Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Leu Thr Ser Thr Thr Tyr
 130 135 140

Trp Leu Lys Ile Glu Ala Tyr Thr His Tyr Ile Ser Thr Lys Ala Ala
 145 150 155 160

Asn Ile Gly Phe Thr Arg Ala Leu Ala Ser Asp Leu Gly Lys Asp Gly
 165 170 175

Ile Thr Val Asn Ala Ile Ala Pro Ser Leu Val Arg Thr Ala Thr Thr
 180 185 190

Glu Ala Ser Ala Leu Ser Ala Met Phe Asp Val Leu Pro Asn Met Leu
 195 200 205

Gln Ala Ile Pro Arg Leu Gln Val Pro Leu Asp Leu Thr Gly Ala Ala
 210 215 220

Ala Phe Leu Ala Ser Asp Asp Ala Ser Phe Ile Thr Gly Gln Thr Leu
 225 230 235 240

[0005]

Ala Val Asp Gly Gly Met Val Arg His
245

<210> 6
<211> 251
<212> PRT
<213> 短乳杆菌

<400> 6

Ser Asn Arg Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr Leu
1 5 10 15

Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala Lys
20 25 30

Val Met Ile Thr Asp Arg His Ser Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala Lys
35 40 45

Ser Val Gly Thr Pro Asp Gln Ile Gln Phe Phe Gln His Asp Ser Ser
50 55 60

Asp Glu Asp Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Ala Thr Glu Lys Ala Phe
65 70 75 80

Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Asn Lys
85 90 95

Ser Val Glu Glu Thr Thr Thr Ala Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ala Val
100 105 110

Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg Met
115 120 125

Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile Glu
130 135 140

Gly Phe Val Gly Asp Pro Ser Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys Gly
145 150 155 160

[0006] Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu Lys
165 170 175

Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys Thr
180 185 190

Pro Leu Val Asp Asp Leu Pro Gly Ala Glu Glu Ala Met Ser Gln Arg
195 200 205

Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala Tyr
210 215 220

Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asn Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly Ser
225 230 235 240

Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
245 250

<210> 7
<211> 260
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌

<400> 7

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu
85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
130 135 140

Ser Val His Ala Phe Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala Ser
145 150 155 160

Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr Ala
165 170 175

Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn Thr
180 185 190

Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp Val
195 200 205

Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile Ala
210 215 220

Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Ser Tyr Val Thr Gly
225 230 235 240

Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe Gln
245 250 255

Ala Gly Arg Gly
260

<210> 8
<211> 395
<212> PRT
<213> 马
<400> 8

Met Gly Ser Ser His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ser Thr Ala Gly Lys Val Ile Lys Cys Lys Ala
20 25 30

Ala Val Leu Trp Glu Glu Lys Lys Pro Phe Ser Ile Gln Glu Val Glu
35 40 45

Val Ala Pro Pro Lys Ala His Glu Val Arg Ile Lys Met Val Ala Thr
50 55 60

Gly Ile Cys Arg Ser Asp Asp His Val Val Ser Gly Thr Leu Val Thr
65 70 75 80

Pro Leu Pro Val Ile Ala Gly His Glu Ala Ala Gly Ile Val Glu Ser
85 90 95

Ile Gly Glu Gly Val Thr Thr Val Arg Pro Gly Asp Lys Val Ile Pro
100 105 110

Leu Phe Thr Pro Gln Cys Gly Lys Cys Arg Val Cys Lys His Pro Glu
115 120 125

Gly Asn Phe Cys Leu Lys Asn Asp Leu Ser Met Pro Arg Gly Thr Met
130 135 140

Gln Asp Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Arg Gly Lys Pro Ile His His
145 150 155 160

Phe Leu Gly Thr Ser Thr Phe Ser Gln Tyr Thr Val Val Asp Glu Ile
165 170 175

Ser Val Ala Lys Ile Asp Ala Ala Ser Pro Leu Glu Lys Val Cys Leu
180 185 190

Ile Gly Cys Gly Phe Ser Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val Lys Val Ala
195 200 205

Lys Val Thr Gln Gly Ser Thr Cys Ala Val Phe Gly Leu Gly Gly Val

[0007]

```

210          215          220
Gly Leu Ser Val Ile Met Gly Cys Lys Ala Ala Gly Ala Ala Arg Ile
225          230          235          240
Ile Gly Val Asp Ile Asn Lys Asp Lys Phe Ala Lys Ala Lys Glu Val
245          250          255
Gly Ala Thr Glu Cys Val Asn Pro Gln Asp Tyr Lys Lys Pro Ile Gln
260          265          270
Glu Val Leu Thr Glu Met Ser Asn Gly Gly Val Asp Phe Ser Phe Glu
275          280          285
Val Ile Gly Arg Leu Asp Thr Met Val Thr Ala Leu Ser Cys Cys Gln
290          295          300
Glu Ala Tyr Gly Val Ser Val Ile Val Gly Val Pro Pro Asp Ser Gln
305          310          315          320
Asn Leu Ser Met Asn Pro Met Leu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Trp Lys
325          330          335
Gly Ala Ile Phe Gly Gly Phe Lys Ser Lys Asp Ser Val Pro Lys Leu
340          345          350
Val Ala Asp Phe Met Ala Lys Lys Phe Ala Leu Asp Pro Leu Ile Thr
355          360          365
His Val Leu Pro Phe Glu Lys Ile Asn Glu Gly Phe Asp Leu Leu Arg
370          375          380
Ser Gly Glu Ser Ile Arg Thr Ile Leu Thr Phe
385          390          395
<210> 9
<211> 345
<212> PRT
<213> 赤红球菌
<400> 9
Met Lys Ala Val Gln Tyr Thr Glu Ile Gly Ser Glu Pro Val Val Val
1 5 10 15
Asp Ile Pro Thr Pro Thr Pro Gly Pro Gly Glu Ile Leu Leu Lys Val
20 25 30
Thr Ala Ala Gly Leu Cys His Ser Asp Ile Phe Val Met Asp Met Pro
35 40 45
Ala Ala Gln Tyr Ala Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly
50 55 60
Val Gly Thr Val Ala Glu Leu Gly Glu Gly Val Thr Gly Phe Gly Val
65 70 75 80
Gly Asp Ala Val Ala Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Ala Cys His
85 90 95
Ala Cys Ala Arg Gly Arg Glu Asn Tyr Cys Thr Arg Ala Ala Asp Leu
100 105 110
Gly Ile Thr Pro Pro Gly Leu Gly Ser Pro Gly Ser Met Ala Glu Tyr
115 120 125
Met Ile Val Asp Ser Ala Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp
130 135 140
Pro Val Ala Ala Ala Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His
145 150 155 160
Ala Ile Ser Arg Val Leu Pro Leu Leu Gly Pro Gly Ser Thr Ala Val
165 170 175
Val Ile Gly Val Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Ile Leu Arg
180 185 190
Ala Val Ser Ala Ala Arg Val Ile Ala Val Asp Leu Asp Asp Asp Arg
195 200 205

```

[0008]

Leu Ala Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Asp Ala Ala Val Lys Ser Gly
 210 215 220

Ala Gly Ala Ala Asp Ala Ile Arg Glu Leu Thr Gly Gly Gln Gly Ala
 225 230 235 240

Thr Ala Val Phe Asp Phe Val Gly Ala Gln Ser Thr Ile Asp Thr Ala
 245 250 255

Gln Gln Val Val Ala Val Asp Gly His Ile Ser Val Val Gly Ile His
 260 265 270

Ala Gly Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Met Ile Pro Phe Gly Ala
 275 280 285

Ser Val Val Thr Pro Tyr Trp Gly Thr Arg Ser Glu Leu Met Glu Val
 290 295 300

Val Ala Leu Ala Arg Ala Gly Arg Leu Asp Ile His Thr Glu Thr Phe
 305 310 315 320

Thr Leu Asp Glu Gly Pro Ala Ala Tyr Arg Arg Leu Arg Glu Gly Ser
 325 330 335

Ile Arg Gly Arg Gly Val Val Val Pro
 340 345

<210> 10
 <211> 337
 <212> FRT
 <213> 嗜热脂肪地芽孢杆菌

<400> 10

Met Lys Ala Ala Val Val Glu Gln Phe Lys Lys Pro Leu Gln Val Lys
 1 5 10 15

Glu Val Glu Lys Pro Lys Ile Ser Tyr Gly Glu Val Leu Val Arg Ile
 20 25 30

Lys Ala Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Ala Ala His Gly Asp
 35 40 45

Trp Pro Val Lys Pro Lys Leu Pro Leu Ile Pro Gly His Glu Gly Val
 50 55 60

Gly Val Ile Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr His Leu Lys Val Gly
 65 70 75 80

Asp Arg Val Gly Ile Pro Trp Leu Tyr Ser Ala Cys Gly His Cys Asp
 85 90 95

Tyr Cys Leu Ser Gly Gln Glu Thr Leu Cys Glu Arg Gln Gln Asn Ala
 100 105 110

Gly Tyr Ser Val Asp Gly Gly Tyr Ala Glu Tyr Cys Arg Ala Ala Ala
 115 120 125

Asp Tyr Val Val Lys Ile Pro Asp Asn Leu Ser Phe Glu Glu Ala Ala
 130 135 140

Pro Ile Phe Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Leu Lys Val Thr
 145 150 155 160

Gly Ala Lys Pro Gly Glu Trp Val Ala Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Leu
 165 170 175

Gly His Val Ala Val Gln Tyr Ala Lys Ala Met Gly Leu Asn Val Val
 180 185 190

Ala Val Asp Leu Gly Asp Glu Lys Leu Glu Leu Ala Lys Gln Leu Gly
 195 200 205

Ala Asp Leu Val Val Asn Pro Lys His Asp Asp Ala Ala Gln Trp Ile
 210 215 220

Lys Glu Lys Val Gly Gly Val His Ala Thr Val Val Thr Ala Val Ser
 225 230 235 240

Lys Ala Ala Phe Glu Ser Ala Tyr Lys Ser Ile Arg Arg Gly Gly Ala

[0009]

245 250 255
Cys Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Glu Glu Ile Pro Ile Pro Ile Phe
260 265 270
Asp Thr Val Leu Asn Gly Val Lys Ile Ile Gly Ser Ile Val Gly Thr
275 280 285
[0010] Arg Lys Asp Leu Gln Glu Ala Leu Gln Phe Ala Ala Glu Gly Lys Val
290 295 300
Lys Thr Ile Val Glu Val Gln Pro Leu Glu Asn Ile Asn Asp Val Phe
305 310 315 320
Asp Arg Met Leu Lys Gly Gln Ile Asn Gly Arg Val Val Leu Lys Val
325 330 335
Asp

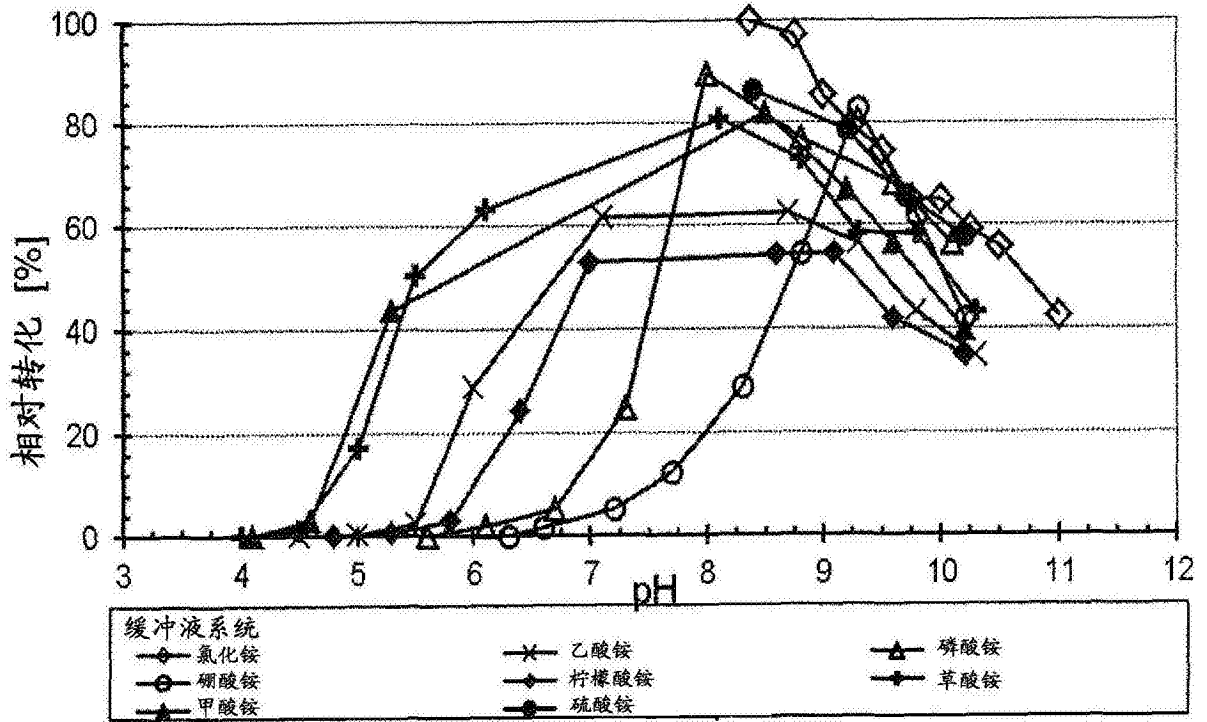


图1

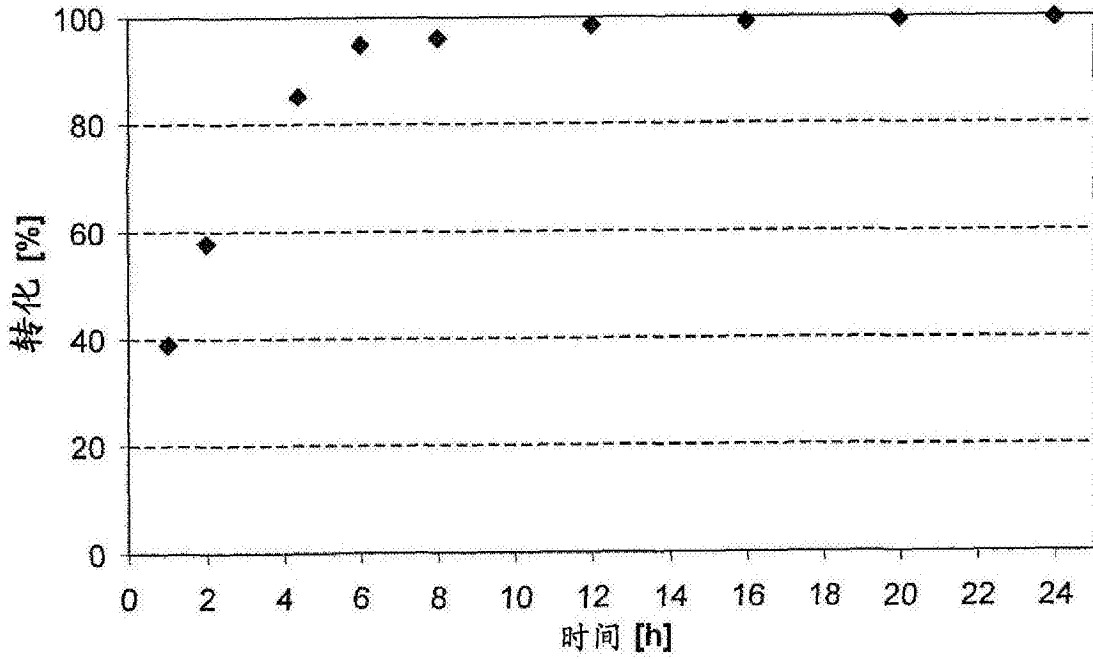


图2

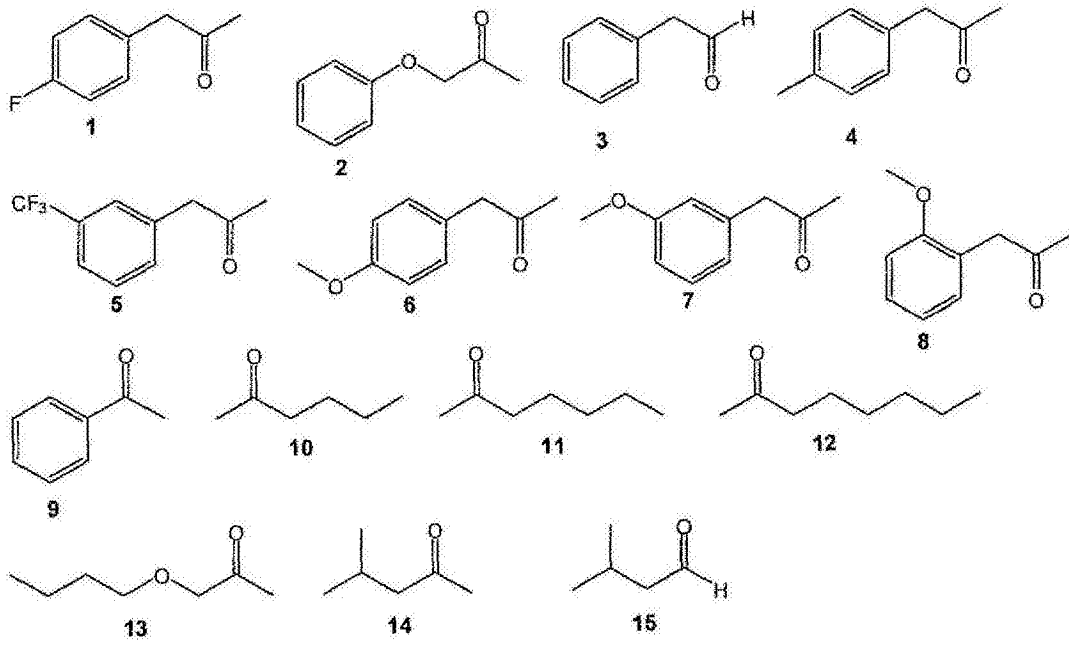


图3

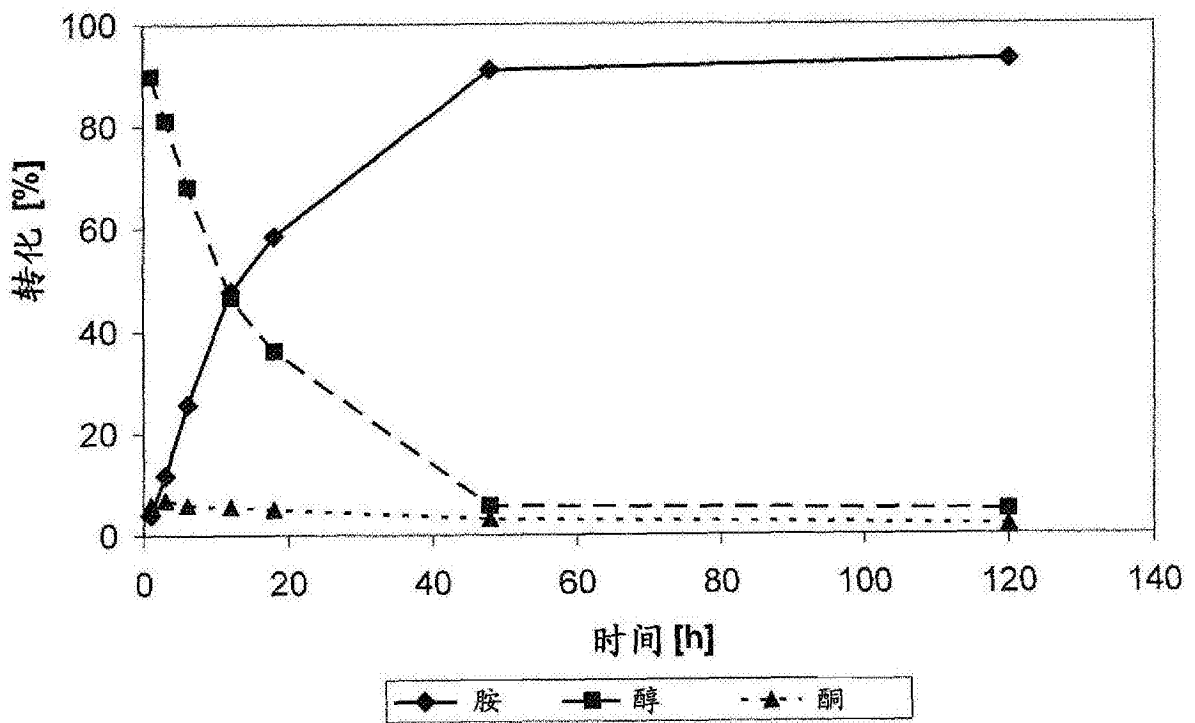


图4

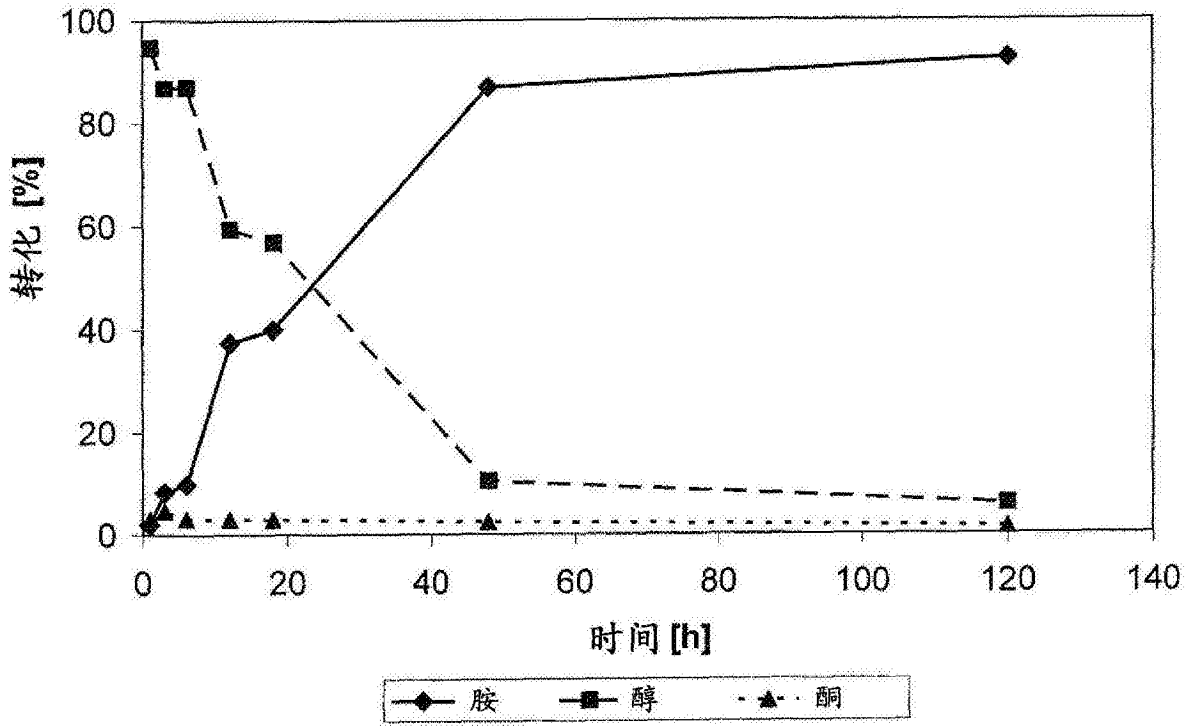


图5

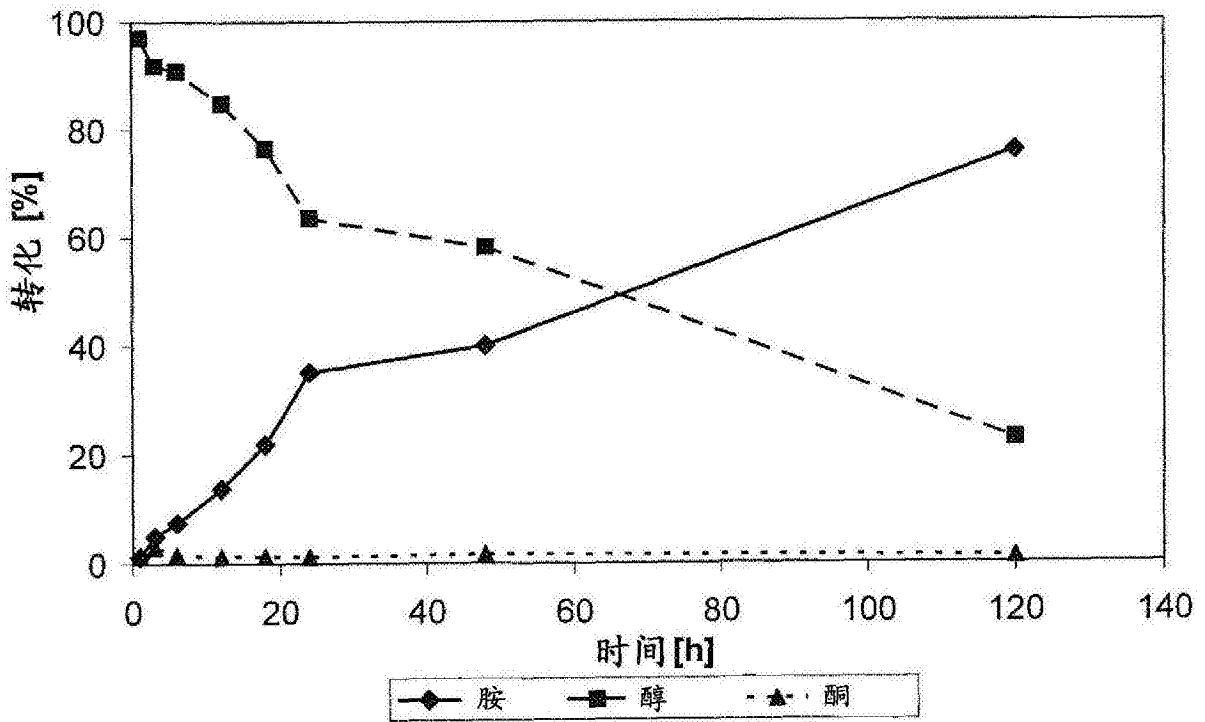


图6

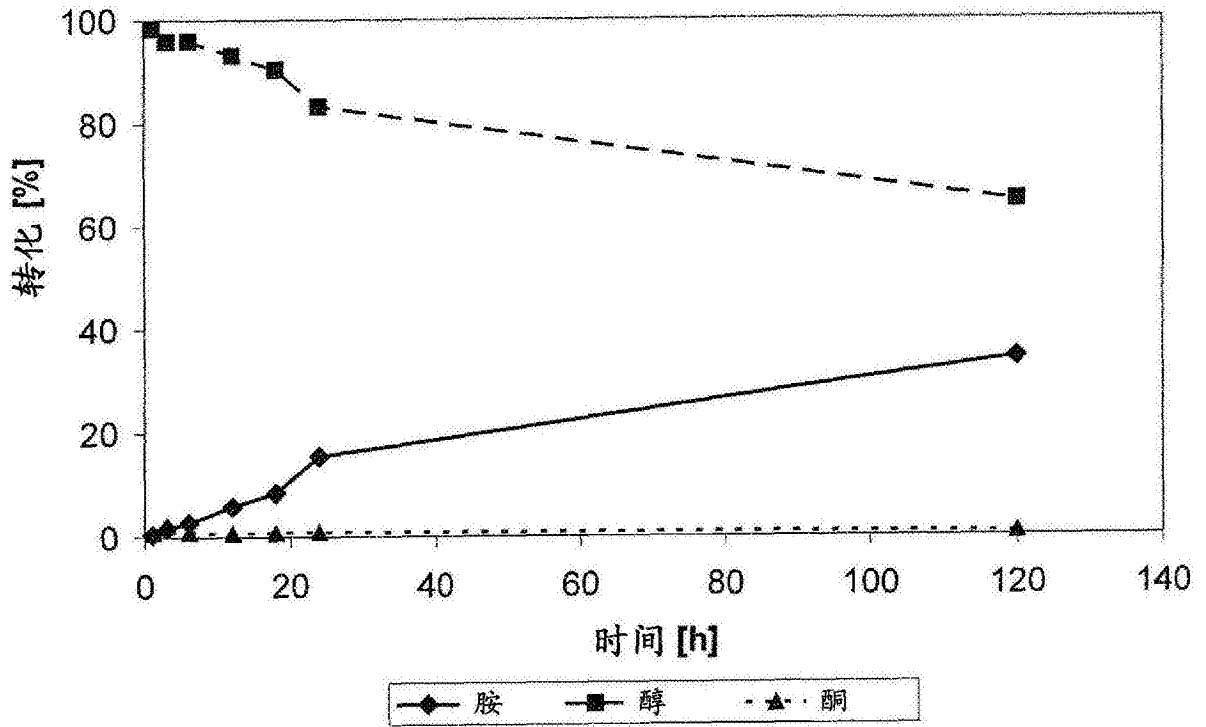


图7

<p>BAA08816 (1) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt) (1) 共有 (1)</p>	<pre> -----MSLVEKTSIIKDFTLFEKMESEHQVFCNDPATGLRAIIAHDFTLGPALG MGSSHHHHSSCLVPRGSHMSLVEKTSIIKDFTLFEKMESEHQVFCNDPATGLRAIIAHDFTLGPALG -----MSLVEKTSIIKDFTLFEKMESEHQVFCNDPATGLRAIIAHDFTLGPALG </pre>
<p>BAA08816 (52) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt) (72) 共有 (72)</p>	<pre> GCRMQPNYSVEEALEDALRLSKGMTYKCAASDVDFGGGKAVIIGDPQKDKSPELFRAFGQFVDSLGGRFYF GCRMQPNYSVEEALEDALRLSKGMTYKCAASDVDFGGGKAVIIGDPQKDKSPELFRAFGQFVDSLGGRFYF GCRMQPNYSVEEALEDALRLSKGMTYKCAASDVDFGGGKAVIIGDPQKDKSPELFRAFGQFVDSLGGRFYF </pre>
<p>BAA08816 (123) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt) (143) 共有 (143)</p>	<pre> GTDMGTNMEDFIHAMKETNCIVGVPEAYGGGGSSIPTAMGVLYGIKATNKMLFGKDDLGGVTYAIQGLGK GTDMGTNMEDFIHAMKETNCIVGVPEAYGGGGSSIPTAMGVLYGIKATNKMLFGKDDLGGVTYAIQGLGK GTDMGTNMEDFIHAMKETNCIVGVPEAYGGGGSSIPTAMGVLYGIKATNKMLFGKDDLGGVTYAIQGLGK </pre>
<p>BAA08816 (194) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt) (214) 共有 (214)</p>	<pre> VGYKVAEGLLEEGAHLEFVTDINEQTLLEAIQEKAKTTSGSVTVVASDEIYSQEADVFPVPCAFGGVVNDETMK VGYKVAEGLLEEGAHLEFVTDINEQTLLEAIQEKAKTTSGSVTVVASDEIYSQEADVFPVPCAFGGVVNDETMK VGYKVAEGLLEEGAHLEFVTDINEQTLLEAIQEKAKTTSGSVTVVASDEIYSQEADVFPVPCAFGGVVNDETMK </pre>
<p>BAA08816 (265) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt) (285) 共有 (285)</p>	<pre> QFKVKAIAGSANQLLTDHGRHLADKGI LYAPDYIVNSGGLIQVADELYEVNKERVLA KTKHIYDAILEV QFKVKAIAGSANQLLTDHGRHLADKGI LYAPDYIVNSGGLIQVADELYEVNKERVLA KTKHIYDAILEV QFKVKAIAGSANQLLTDHGRHLADKGI LYAPDYIVNSGGLIQVADELYEVNKERVLA KTKHIYDAILEV </pre>
<p>BAA08816 (336) 翻译莱褐芽胞杆菌 Phe-DH (F. Mutt)(356) 共有 (356)</p>	<pre> YQQAEILDQITTEAANRMCEQRMARGRNRNSFFTSVVKPKWDIRN YQQAEILDQITTEAANRMCEQRMARGRNRNSFFTSVVKPKWDIRN YQQAEILDQITTEAANRMCEQRMARGRNRNSFFTSVVKPKWDIRN </pre>

图 8

LeuDH_wt_iso2 (1) MELFKYMETDYEQVLFQDKESGLKAIIAIHDTTLGPALGGTRMMYNSEEEALEDALRLARGMTYKNAAGLNLGGKTVIIG
 LeuDH_mut_iso2 (1) MELFKYMETDYEQVLFQDKESGLKAIIAIHDTTLGPALGGTRMMYNSEEEALEDALRLARGMTYKNAAGLNLGGKTVIIG
 共有 (1) MELFKYMETDYEQVLFQDKESGLKAIIAIHDTTLGPALGGTRMMYNSEEEALEDALRLARGMTY KNAAGLNLGGKTVIIG

LeuDH_wt_iso2 (86) DPRKDKNEAMFRAFGRFIOGLNGRYITAEVDVGTTVADMDDIIYQETDYVTGISPEFGSSGNPSPATAYGVYRGMKAAAKEAFGSDS
 LeuDH_mut_iso2 (86) DPRKDKNEAMFRAFGRFIOGLNGRYITAEVDVGTTVADMDDIIYQETDYVTGISPEFGSSGNPSPATAYGVYRGMKAAAKEAFGSDS
 共有 (86) DPRKDKNEAMFRAFGRFIOGLNGRYITAEVDVGTTVADMDDIIYQETDYVTGISPEFGSSGNPSPATAYGVYRGMKAAAKEAFGSDS

LeuDH_wt_iso2 (171) LEGKVVAVQGVGNVAYHLCRHLHEEGAKLIVTDINKEVVARAVEEFGAKAVDPNDIYGVECDIFAPCALGGIINDQTIPOLKAKV
 LeuDH_mut_iso2 (171) LEGKVVAVQGVGNVAYHLCRHLHEEGAKLIVTDINKEVVARAVEEFGAKAVDPNDIYGVECDIFAPCALGGIINDQTIPOLKAKV
 共有 (171) LEGKVVAVQGVGNVAYHLCRHLHEEGAKLIVTDINKEVVARAVEEFGAKAVDPNDIYGVECDIFAPCALGGIINDQTIPOLKAKV

LeuDH_wt_iso2 (256) IAGSADNLQKKEPRHGDI IHEMGIVYAPDYVINAGGVINVADELYGNRERAMKKIEQIYDNIKVFALAKRDNIPTYVAADRMAE
 LeuDH_mut_iso2 (256) IAGSADNLQKKEPRHGDI IHEMGIVYAPDYVINAGGVINVADELYGNRERAMKKIEQIYDNIKVFALAKRDNIPTYVAADRMAE
 共有 (256) IAGSAD NLQKKEPRHGDI IHEMGIVYAPDYVINAGG INVADELYGNRERAMKKIEQIYDNIKVFALAKRDNIPTYVAADRMAE

LeuDH_wt_iso2 (341) ERLETMRKAAASQFLQNGHHILSRRPRLTAARAGLRRADDGGTTMQEQKFRILTINPGSTSTKIGVFENERAIA SKKRSATRAG
 LeuDH_mut_iso2 (341) ERLETMRKAAASQFLQNGHHILSRRPRLTAARAGLRRADDGGTTMQEQKFRILTINPGSTSTKIGVFENERAIA SKKRSATRAG
 共有 (341) ERLETMRKAAASQFLQNGHHILSRRPRLTAARAGLRRADDGGTTMQEQKFRILTINPGSTSTKIGVFENERAIA SKKRSATRAG

LeuDH_wt_iso2 (426) ASAI
 LeuDH_mut_iso2 (426) ASAI
 共有 (426) ASAI

图9