

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480023830.0

[51] Int. Cl.

C07K 14/39 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100567321C

[22] 申请日 2004.5.28

[21] 申请号 200480023830.0

[30] 优先权

[32] 2003.6.18 [33] DE [31] 10327454.5 - 41

[86] 国际申请 PCT/EP2004/005831 2004.5.28

[87] 国际公布 WO2004/111083 德 2004.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.20

[73] 专利权人 IEP 有限责任公司

地址 德国威斯巴登

[72] 发明人 A·古普塔 A·齐默

M·博布科瓦

[56] 参考文献

WO 9318138 A 1993.9.16

WO 02086126 A 2002.10.31

"HORSE LIVER ALCOHOL DEHYDROGEN-ASE AN ILLUSTRATIVE EXAMPLE OF THE POTENTIAL OF ENZYMES IN ORGANIC SYNTHESIS. JONES J B. ENZYME ENGINEERING, Vol. 6. 1982

"NAD⁺ - dependent (S) - specific secondary alcohol dehydrogenase involved in stereoinversion of 3 - pentyn - 2 - ol catalyzed by *Nocardia fusca* AKU 212. XIE SHENG, XUE ET AL. BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, Vol. 63 No. 10. 1999

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 王景朝

权利要求书 8 页 说明书 32 页

[54] 发明名称

来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶

[57] 摘要

本发明涉及由毕赤氏酵母属的酵母,更特别的由荚膜毕赤氏酵母获得的依赖于 NADH 的氧化还原酶。所说的氧化还原酶之后用于有机酮化合物到对应的(S) - 羟基化合物的对映体选择性还原的酶促方法和用于在两相体系中使用来自荚膜毕赤氏酵母的分离的,重组过表达的氧化还原酶对映体选择性制备(S) - 羟基化合物的酶促方法。

1.分离的氧化还原酶，其包括 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，且具有在 NADH 和水存在下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物的酶活性，其中所述酶具有每 mg 蛋白质超过 $1\ \mu\text{mol}$ 的比活性，基于乙基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。

2. 分离的氧化还原酶，其由在严格条件下与 SEQ ID NO: 8 或其互补序列杂交的核酸序列编码，所述氧化还原酶具有在 NADH 和水存在下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物的酶活性，其中所述酶具有每 mg 蛋白质超过 $1\ \mu\text{mol}$ 的比活性，基于乙基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。

3.融合蛋白质，特征在于其包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的氧化还原酶，其通过肽键在 N-端基或羧基-端基末端连结到进一步的多肽上。

4.核酸序列，其编码根据 SEQ ID NO: 9 的氧化还原酶。

5.克隆载体，特征在于其包含一个或几个根据权利要求 4 的核酸序列。

6.表达载体，特征在于其包含一个或几个根据权利要求 4 的核酸序列并且以适当的方式连接到表达控制序列上。

7.宿主细胞，其是细菌，酵母，昆虫，植物或哺乳动物细胞并且已经用根据权利要求 6 的表达载体转化或转染。

8.羰基化合物对映体选择性还原成对应的 (S)-羟基化合物的方法，其特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶，NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物，和

b) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

9.根据权利要求 8 的方法，特征在于具有下式 I 的化合物用作羰基化合物

R1-C(O)-R2 (I)

包含来自以下的 R1 部分

- 1) - (C₁-C₂₀) -烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,
- 2) - (C₂-C₂₀) -烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个, 三个或四个双键,
- 3) - (C₂-C₂₀) -炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并包含一个, 二个, 三个或四个三键,
- 4) - (C₆-C₁₄) -芳基,
- 5) - (C₁-C₈) -烷基- (C₆-C₁₄-) -芳基,
- 6) - (C₅-C₁₄) -杂环, 其是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次, 或
- 7) - (C₃-C₇) -环烷基,

其中在 1)-7) 下提到的 R1 部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

- a) -OH,
- b) 卤素,
- c) -NO₂ 或
- d) -NH₂ 和

包含来自以下的 R2 部分

- 1) - (C₁-C₆) -烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,
- 2) - (C₂-C₆) -烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个或三个双键,
- 3) - (C₂-C₆) -炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并包含一个或二个三键,

4) - (C₀-C₁₀) -烷基-C(O)-O-(C₁-C₆) -烷基, 其中烷基是线性的或分支的并且是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次,

其中在 1)-4) 下提到的 R2 部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

- a) -OH,

- b) 卤素,
- c) $-\text{NO}_2$ 或
- d) $-\text{NH}_2$.

10. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于
R1 部分被氟, 氯, 溴或碘取代一, 二或三次。

11. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于
R2 部分被氟, 氯, 溴或碘取代一, 二或三次。

12. 根据权利要求 8 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

13. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

14. 根据权利要求 8 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用脱氢酶和共底物还原成 NADH, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

15. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1-2 之一项或几项的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用脱氢酶和共底物还原成 NADH, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

16. 根据权利要求 8 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

17. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

18. 根据权利要求 8 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应,

c) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

d) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

19. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应,

c) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

d) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

20. 根据权利要求 8 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 同时用脱氢酶和共底物还原成 NADH,

c) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

d) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

21. 根据权利要求 9 的方法, 特征在于

a) 在根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NADH 和水存在的

条件下将羰基化合物还原成对应的(S)-羟基化合物,

b)通过氧化还原酶形成的NAD同时用脱氢酶和共底物还原成NADH,

c)在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

d)分离形成的手性(S)-羟基化合物。

22.根据权利要求12-15和18-21任一项的方法, 特征在于用作共底物的是乙醇, 2-丙醇, 2-丁醇, 2-戊醇或2-辛醇。

23.根据权利要求14、15、20和21中任一项的方法, 特征在于来自面包酵母的博伊丁氏假丝酵母或近平滑假丝酵母的依赖于NADH的醇脱氢酶用作脱氢酶。

24.根据权利要求14、15、20和21中任一项的方法, 特征在于依赖于NADH的甲酸脱氢酶用作脱氢酶并且甲酸的盐用作共底物。

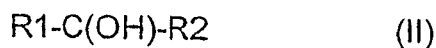
25. 根据权利要求24的方法, 特征在于所述甲酸的盐是甲酸铵, 甲酸钠或甲酸钙。

26.根据权利要求16、17、20和21中任一项的方法, 特征在于乙醚, 叔丁基甲基醚, 二异丙基醚, 二丁基醚, 乙酸丁酯, 庚烷, 己烷或环己烷用作有机溶剂。

27.根据权利要求16、17、20和21中任一项的方法, 特征在于有机相占总反应体积的5%-80%。

28. 根据权利要求27的方法, 特征在于有机相占总反应体积的10%-40%。

29.具有下式II的手性(R)-羟基化合物的回收方法,



其包含来自以下的R1部分

1) -(C₁-C₂₀)-烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,

2) -(C₂-C₂₀)-烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个, 三个或四个双键,

3) -(C₂-C₂₀)-炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并包含一个, 二个, 三个或四个三键,

4) - (C₆-C₁₄) - 芳基,

5) - (C₁-C₈) - 烷基 - (C₆-C₁₄) - 芳基,

6) - (C₅-C₁₄) - 杂环, 其是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次, 或

7) - (C₃-C₇) - 环烷基,

其中在 1)-7) 下提到的 R1 部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

a) -OH,

b) 卤素,

c) -NO₂ 或

d) -NH₂ 和

包含来自以下的 R2 部分

1) - (C₁-C₆) - 烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,

2) - (C₂-C₆) - 烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个或三个双键,

3) - (C₂-C₆) - 炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并包含一个或二个三键,

4) - (C₀-C₁₀) - 烷基-C(O)-O-(C₁-C₆) - 烷基, 其中烷基是线性的或分支的并且是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次,

其中在 1)-4) 下提到的 R1 部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

a) -OH,

b) 卤素,

c) -NO₂ 或

d) -NH₂,

特征在于

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NAD 和水培养, 和

b) 分离残余的具有式 II 的手性 (R) - 羟基化合物。

30. 根据权利要求 29 的方法, 特征在于

R1 部分被氟, 氯, 溴或碘取代一, 二或三次。

31. 根据权利要求 29 的方法, 特征在于

R2 部分被氟, 氯, 溴或碘取代一, 二或三次。

32. 根据权利要求 29 具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物的回收方法, 特征在于

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NAD 和水培养,

b) 通过氧化还原酶形成的 NADH 用共底物氧化成 NAD, 和

c) 分离残余的具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物。

33. 根据权利要求 29 具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物的回收方法, 特征在于

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NAD 和水培养,

b) 通过氧化还原酶形成的 NADH 用脱氢酶和共底物氧化成 NAD, 和

c) 分离残余的具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物。

34. 根据权利要求 29 具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物的回收方法, 特征在于

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NAD 和水培养,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

c) 分离残余的具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物。

35. 根据权利要求 29 具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物的回收方法, 特征在于

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据权利要求 1 或 2 的氧化还原酶, NAD 和水培养,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应,

c) 通过氧化还原酶形成的 NADH 用脱氢酶和共底物氧化成 NAD, 和

d) 分离残余的具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物。

36. 根据权利要求 32、33、和 35 中任一项的方法，特征在于丙酮用作共底物。

来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶

本发明涉及氧化还原酶，羰基化合物到对应的(S)-羟基化化合物的对映体选择性还原的方法和涉及获得手性(R)-羟基化化合物的方法。

对于药理活性化合物，芳族物质，信息素，农业化学药品或酶抑制剂的合成光学活性羟基化合物是具有广泛应用的有价值的手性组分。

同时，合适于在生物催化中大规模应用并且可以以低成本足够量地获得的羰基还原酶的数量是极其有限的。下面的依赖NADH的S-特异性羰基还原酶是已知的：来自马肝的醇脱氢酶(HLADH)(Enzyme Engineering, 6卷, 1982, 107页),

来自酵母的醇脱氢酶(YADH)(Alcohol dehydrogenases: The Enzymes (1963), 25-83页. 纽约: Academic Press),

来自近平滑假丝酵母的羰基还原酶(CPCR)(US 5,523,223和US 5,763,236), 来自红串红球菌(RECR)(US 5,523,223)和深色诺卡氏菌(Norcardia fusca)的羰基还原酶(Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(10)(1999), 1721-1729页), 来自博伊丁氏假丝酵母的醇脱氢酶(Biochim., Biophys. Acta 716, (1982), 298-307页)或

来自硫磺矿硫化叶菌(Sulfolobus Solfataricus)的醇脱氢酶(FEMS Microbiology Letters, 170(1999), 31-39页)。

以上提到的羰基还原酶迄今没有一种被大规模使用。其中的主要原因，除了通常太窄的底物谱或低的酶对映体选择性，首先是所说的酶的可得性。迄今不可能足量地和低成本地提供大部分以上提到的酶。

在以上提到的羰基还原酶的应用中产生的另一个问题是辅因子NADH或NADPH的再生。已知的方法使用底物偶联的辅酶再生，例如用2-丙醇，或酶偶联的辅酶再生，例如用甲酸脱氢酶。

用甲酸脱氢酶的酶偶联的辅酶再生的缺点是其低的比活性(4-10 U/mg)，因此，即使重组的甲酸脱氢酶也是相对昂贵的(J. Biotechnol. Bioeng.[1999]64, 187-193页)。

用异丙醇的底物偶联的辅酶再生的缺点是不利的平衡位置和对于

使用的共底物，例如异丙醇不足的酶稳定性。

本发明的目的是提供氧化还原酶，其特征在于广的底物谱，高的对映体选择性和对于有机溶剂的高稳定性。

所说的目的通过氧化还原酶以这样一种方法达到，即使得其在 NADH 和水存在的条件下将羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物。

现在已经发现以上提到的现有技术方法的缺点可以通过新的氧化还原酶避免。

本发明合适地涉及氧化还原酶，其可以从毕赤氏酵母属或假丝酵母属的酵母，特别是从荚膜毕赤氏酵母(*Pichia capsulata*)中获得。

在进一步的实施方案中，本发明涉及来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶，其具有根据 SEQ ID NO: 8 的 DNA-序列和根据 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列。这些序列在附后的序列列表中描述。

在一种实施方案中，本发明涉及氧化还原酶，其中超过 70% 的氨基酸与氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 是相同的并且其具有每 mg 蛋白质超过 1 μ mol 的比活性，基于乙基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。优选其中 80%-99.5%，特别是 90%-99.5%，更特别是 99%-99.5% 是与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列相同的氨基酸的氧化还原酶。通过在实施例 1 中描述的试验体系进行根据 SEQ ID NO: 9 的氧化还原酶或其如以下所定义的衍生物或其类似物的比活性测定。

根据本发明的氧化还原酶特征是它比具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的氧化还原酶具有另外 1-40 个氨基酸或少 1-40 个氨基酸并且它具有每 mg 蛋白质超过 1 μ mol 的比活性，基于乙基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。优选与在 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列中的相比其中多或少存在 1-25 个氨基酸，特别是 2-20 个氨基酸，或优选 3-10 个氨基酸的氧化还原酶。

进一步地，本发明涉及氧化还原酶，其具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列并且通过可水溶聚合物修饰一次，两次，三次，四次或五次和其中比活性达到每 mg 蛋白质超过 1 μ mol，基于乙基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。例如，可水溶聚合物是聚乙二醇。聚乙二醇的结合优选在根据 SEQ ID NO: 9 的蛋白质的 N-端基末端发生。根据 SEQ ID NO: 9 的氧化还原酶也可以与固体，例如聚

乙烯，聚苯乙烯，多糖，纤维素或纤维素衍生物结合。

进一步地，本发明涉及代表具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的片段的蛋白质片段，每个片段具有 5-30 个氨基酸数量。优选具有 SEQ ID NO: 9 的片段，其具有 6-25 个氨基酸，特别 8-20 个氨基酸或 10-18 个氨基酸，特别是氨基酸序列 SEQ ID NO: 10 的链长。所说的片段可以，例如，用于发现根据本发明的来自荚膜毕赤氏酵母或来自任何其他微生物的氧化还原酶。

进一步地，本发明涉及融合蛋白，其特征在于它代表具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 或具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的片段的氧化还原酶，具有 5-30 个数量的通过肽键在 N-端基或羧基-端基末端连接到进一步的多肽上的氨基酸。融合蛋白可以，例如，更易于从其它的蛋白质上分离并存在在细胞中更大量地表达。

进一步地，本发明涉及抗体，其特异性地结合到根据 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的氧化还原酶上。根据已知的方法通过免疫接种合适的哺乳动物进行所说的抗体的制备并随后获得该抗体。抗体可以是单克隆的或多克隆的。

本发明还涉及分离的核酸序列，其为根据 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 的氧化还原酶编码。

进一步地，本发明涉及分离的氧化还原酶的 DNA-序列，其在 NADH 和水存在的条件下催化羧基化合物到对应的 (S)-羟基化合物的还原，其中 DNA-序列选自

a) 具有根据 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列的 DNA-序列，或各个互补链，

b) 杂交一个或几个根据 a) 的 DNA-序列的 DNA-序列或杂交其互补链的 DNA-序列，杂交在严格的条件下发生，和

c) DNA-序列，其由于遗传密码的简并编码通过一个或几个根据 a) 或 b) 的 DNA-序列编码的蛋白质。

杂交中普遍的条件在 Sambrook 和 Russel, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 卷 1, 章 1, Protocol 30-32 中描述。

进一步地，本发明涉及 DNA-序列，其中超过 70% 的核酸碱基与根据 SEQ ID NO: 8 的 DNA-序列或与其互补链是相同的并且编码氧化还原酶，该氧化还原酶具有每 mg 蛋白质超过 1 μ mol 的比活性，基于乙

基-4-氯-3-氧代丁酸到 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸的反应。优选其中 80%-99.5%，特别是 90%-99.5%，更特别是 99%-99.5% 的核酸碱基与根据 SEQ ID NO: 8 的 DNA-序列相同的 DNA-序列。

进一步地，本发明涉及具有 10-50 个核酸碱基的核酸序列，其具有对应根据 SEQ ID NO: 8 的 DNA-序列的一部分或几部分或对应其互补链的序列。优选具有 15-45 个以上提到的 DNA-序列的核酸碱基，特别是 20-40 个碱基或 30-40 个核酸碱基的核酸序列。以上提到的核酸序列作为分子探针或作为聚合酶链反应 (PCR) 的引物是合适的。

进一步地，本发明涉及包含一个或几个以上提到的核酸或 DNA 序列的克隆载体。进一步地，本发明涉及位于细菌，昆虫，植物或哺乳动物细胞内的并包含一个或几个以上提到的核酸或 DNA 序列的表达载体，该序列以合适的方式连接到表达控制序列上。进一步地，本发明涉及宿主细胞，其是细菌，酵母，昆虫，植物或哺乳动物细胞并已经用表达载体转化或转染。

前面提到的 DNA-序列或氨基酸序列的同一性通过与各个蛋白质或 DNA 序列的部分序列相同的氨基酸或核酸碱基的数量相加并除以氨基酸或核酸碱基的总数并乘以一百计算的。

合适的克隆载体是，例如 ppCR-Script, pCMV-Script, pBlue script (Stratagene), pDrive 克隆载体 (Quiagen, Hilden, 德国), pS Blue, pET Blue, pET LIC-载体 (Novagen, Madison, 美国) 和 TA-PCR 克隆载体 (Invitrogen, Karlsruhe, 德国)。

合适的表达载体是，例如 pKK223-3, pTrc99a, pUC, pTZ, pSK, pBluescript, pGEM, pQE, pET, PHUB, pPLc, pKC30, pRM1/pRM9, pTrxFus, pAS1, pGEx, pMAL 或 pTrx。

合适的表达控制序列是，例如 trp-lac (tac)-启动子, trp-lac (trc)-启动子, lac-启动子, T7-启动子或 λ pL-启动子。

来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶是具有 34 ± 2 kDa 的分子量 (在 SDS-凝胶中测定) 和 140 ± 10 kDa 的分子量 (通过凝胶渗透层析测定) 的同型四聚体。氧化还原酶的最佳温度范围是 40℃-45℃，还原反应的最佳 pH 是 6.5-7.0 和氧化反应的最佳 pH 是 7.8-8.2。来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶显示了好的温度和 pH 稳定性并且在 5.5-8.5 的 pH 范围和 15℃-40℃ 的温度范围稳定 5 小时，并且显示了在有机溶剂中的高

稳定性。

酶可以特别从来自毕赤氏酵母属的酵母分离并且可以在分光光度试验中在合适底物，例如乙基-4-氯-3-氧代丁酸盐(butyrate)或 2-丁酮存在的条件下通过在 340nm 下的 NADH 的减少检测。

克隆根据本发明的来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶并且可以在具有 1 000-10 000 U/g *E.coli* 湿重的活性的大肠杆菌 (*E.coli*) 中过表达。该酶不昂贵并且可以大量获得。数据库中的序列对比显示根据本发明的来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶是依赖锌的羧基还原酶。

本发明还涉及从荚膜毕赤氏酵母中获得氧化还原酶的方法。为此目的，为来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶编码的 DNA 例如在合适的原核或真核微生物中表达。优选地，来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶转化成 *E.coli* 菌株并特别在 *E.coli* BL21star (DE3) 细胞中表达。

可以获得来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶，例如培养以上提到的重组 *E.coli* 细胞，诱导氧化还原酶的表达并且之后，大约 10-18 小时 (h) 后，通过超声处理或在球磨机中用玻璃珠湿研磨消化细胞 (Retsch GmbH, Haan, 德国, 10min, 24Hz)。获得的细胞提取物可以直接使用或进一步纯化。为此目的，例如离心细胞提取物，并且获得的上清液经过离子交换层析，例如通过在 Q-Sepharose Fast Flow® 装置 (Pharmacia) 中的离子交换层析。

进一步地，本发明涉及羧基化合物对映选择性还原成对应的 (S)-羟基化合物的方法，该方法特征在于

a) 在根据权利要求 1-9 的一项或几项的氧化还原酶，NADH 和水存在的条件下羧基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物，和

b) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

根据本发明的方法具有高的使用寿命，超过 95% 的制备的手性 (S)-羟基化合物的对映体纯度和基于加入的羧基化合物的高产率。

术语“NADH”理解成还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

术语“NAD”理解成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

术语“羧基化合物”理解成例如具有下式 I 的化合物。



基团 R1 是, 例如

1) - (C₁-C₂₀)-烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,

2) - (C₂-C₂₀)-烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个, 三个或四个双键, 取决于链长,

3) - (C₂-C₂₀)-炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并任选包含一个, 二个, 三个或四个三键,

4) - (C₆-C₁₄)-芳基,

5) - (C₁-C₈)-烷基- (C₆-C₁₄)-芳基,

6) - (C₅-C₁₄)-杂环, 其是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次, 或

7) - (C₃-C₇)-环烷基,

其中在 1)-7) 下提到的部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

a) -OH,

b) 卤素, 例如氟, 氯, 溴或碘,

c) -NO₂ 或

d) -NH₂.

基团 R2 是, 例如

1) - (C₁-C₆)-烷基, 其中烷基是线性链的或分支的,

2) - (C₂-C₆)-烯基, 其中烯基是线性链的或分支的并包含一个, 二个或三个双键, 取决于链长,

3) - (C₂-C₆)-炔基, 其中炔基是线性链的或分支的并任选包含一个或二个三键,

4) - (C₀-C₁₀)-烷基-C(O)-O-(C₁-C₆)-烷基, 其中烷基是线性的或分支的并且是未取代的或被卤素, 羟基, 氨基或硝基取代一至三次,

其中在 1)-4) 下提到的部分是未取代的或彼此独立地被以下基团取代一, 二或三次

a) -OH,

b) 卤素, 例如氟, 氯, 溴或碘,

c) -NO₂ 或

d) -NH₂.

术语手性“(S)-羟基化合物”理解成例如具有下式II的化合物，



其中-OH-基团通常位于相对于其连接的碳原子的(S)-构型中，并且R1和R2具有在式I中相同的意思。

然而，如果羰基基团或卤原子位于与醇接近的位置，则名称改变并且之后对映体选择性醇也称作(R)-醇。然而，这仅仅是名称并且不改变根据本发明的氧化还原酶怎样进行还原的立体选择性方法的问题。

术语“芳基”，理解成在环内包含6-14个碳原子的芳族碳部分。(C₆-C₁₄)芳基部分是，例如，苯基，萘基，1-萘基，2-萘基，联苯基，2-联苯基，3-联苯基和4-联苯基，蒽基或茛基。联苯基部分，萘基部分和特别是苯基部分是优选的芳基部分。术语“卤素”，理解成氟，氯，溴和碘的元素。术语“-(C₁-C₂₀)-烷基”，烃部分理解成碳链，其是线性-链或分支的并包含1-20个碳原子，例如甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，叔丁基，戊基，己基，庚基，辛基，壬基或癸基。术语“-C₀烷基”，理解成共价键。

术语“-(C₃-C₇)环烷基”，理解成环烃部分，例如环丙基，环丁基，环戊基，环己基或环庚基。

术语“-(C₅-C₁₄)杂环”代表部分或完全饱和的单环或双环5元-14元杂环。杂原子的例子是N，O和S。术语“-(C₅-C₁₄)杂环”的例子是衍生自吡咯，呋喃，噻吩，咪唑，吡唑，噁唑，异噁唑，噻唑，异噻唑，四唑，1,2,3,5-噁噻二唑-2-氧化物，三唑酮，噁二唑酮，异噁唑酮，噁二唑啉硫酮，被F，-CN，-CF₃或-C(O)-O-(C₁-C₄)烷基取代的三唑，3-羟基吡咯-2,4-二酮，5-氧代-1,2,4-噻二唑，吡啶，吡嗪，嘧啶，引哚，异引哚，引唑，2,3-二氮杂萘，喹啉，异喹啉，喹喔啉，喹唑啉，噌啉的部分，所说的杂环的吡啶-和苯-anellated的，环戊-，环己-或环庚-anellated的衍生物。该部分特别优选2-或3-吡咯基，苯基吡咯基，例如4-或5-苯基-2-吡咯基，2-呋喃基，2-噻吩基，4-咪唑基，甲基咪唑基，例如1-甲基-2-，-4-或-5-咪唑基，1,3-噻唑-2-基，2-吡啶基，3-吡啶基，4-吡啶基，2-，3-或4-吡啶-N-氧化物，2-吡嗪基，2-，4-或5-嘧啶基，2-，3-或5-引哚基，取代的2-引哚基，例如1-甲基，5-

甲基, 5-甲氧基-, 5-苄氧基-, 5-氯-或 4,5-二甲基-2-吡啶基, 1-苄基-2-或-3-吡啶基, 4,5,6,7-四氢-2-吡啶基, 环庚[b]-5-吡咯基, 2-, 3-或 4-喹啉基, 1-, 3-或 4-异喹啉基, 1-氧代-1,2-二氢-3-异喹啉基, 2-喹啉基, 2-苯并呋喃基, 2-苯并噻吩基, 2-苯并噁唑基或苯并噻唑基或二氢吡啶基 (dihydropyridyl), 吡咯烷基, 例如 2-或 3- (N-甲基吡咯烷基), 咪唑基, 吗啉基, 硫代吗啉基, 四氢噻吩基或苯并二氧戊环基。

优选的具有式 I 的化合物是, 例如, 乙基-4-氯-乙酰乙酸酯, 甲基乙酰乙酸酯, 乙基-8-氯-6-氧代辛酸, 乙基-3-氧代戊酸酯, 4-羟基-2-丁酮, 乙基-2-氧代戊酸酯, 乙基-2-氧代-4-苯基丁酸, 丙酮酸乙酯, 乙醛酸乙基苯基酯, 1-苯基-2-丙酮, 2,3-二氯乙酰苯, 乙酰苯, 2-辛酮, 3-辛酮或 2-丁酮。

对应形成的 S-醇是, 例如, (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸, 乙基-(S)-2-羟基-4-苯基丁酸, (S)-2-辛醇或 (R)-乙基-8-氯-6-羟基辛酸。

合适的氧化还原酶来自, 例如荚膜毕赤氏酵母。在根据本发明的方法中, 氧化还原酶可以以完全纯化的状态或以部分纯化的状态使用。该方法用根据本发明的氧化还原酶或用包含根据本发明的氧化还原酶的细胞进行。在这样做的过程中, 使用的细胞可以以天然的, 可渗透的或溶胞的状态提供。优选地, 使用根据 SEQ ID NO: 9 的克隆氧化还原酶。

使用的氧化还原酶的体积活性是 100 单位/ml (U/ml) -5 000 U/ml, 优选-大约 500 U/ml。

每 kg 反应的具有式 I 的化合物使用 5 000-2 000 000 U 的氧化还原酶, 优选大约 10 000-200 000 U。由此, 酶单位 1 U 对应每分钟反应 1 μ mol 具有式 I 的化合物需要的酶的数量。

进一步地, 本发明涉及羰基化合物对映体选择性还原成对应的 (S)-羟基化合物的方法, 其中

a) 在根据本发明的氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

使用的羰基化合物和氧化还原酶的量等于以上提到的在描述的方法

法中的量。对于根据本发明的方法合适的共底物是醇，例如乙醇，2-丙醇（异丙醇），2-丁醇，2-戊醇或2-辛醇。这些共底物通过根据本发明的氧化还原酶和 NAD 反应生成对应的酮和 NADH。由此，再生 NADH。

对于 NAD 到 NADH 的再生的共底物，例如异丙醇的量是 5%-50%，基于总体积，优选 8%-20%，特别是 10%-15%。

进一步地，本发明涉及(S)-羟基化合物对映体选择性回收的方法，其中

a) 在根据本发明的氧化还原酶，NADH 和水存在的条件下羰基化合物还原成对应的(S)-羟基化合物，

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用脱氢酶和共底物还原成 NADH，和

c) 分离形成的手性(S)-羟基化合物。

合适的脱氢酶是，例如，来自面包酵母，来自博伊丁氏假丝酵母或近平滑假丝酵母的依赖于 NADH 的醇脱氢酶。对于使用的醇脱氢酶合适的共底物是醇，例如乙醇，2-丙醇（异丙醇），2-丁醇，2-戊醇或2-辛醇。

进一步地，NAD 还原也可以通过甲酸脱氢酶（Tishkov 等，J. Biotechnol. Bioeng.[1999]64, 187-193，中试规模的生产和重组 NAD 和 NADP 特异性甲酸脱氢酶的分离(Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase)）进行。合适的甲酸脱氢酶的共底物是，例如，甲酸的盐，例如甲酸铵，甲酸钠或甲酸钙。

底物偶联的辅酶的再生优选使用仲醇，例如乙醇，2-丙醇（异丙醇），2-丁醇，2-戊醇或2-辛醇。因此，该方法优选在无另外的脱氢酶的条件下进行。

在本方法中优选向使用的水中添加缓冲液，例如具有 5-10 的 pH，优选 6-9 的 pH 的磷酸钾，三/HCl 或三乙醇胺缓冲液。缓冲液浓度是 10 mM-150 mM。

缓冲液还可以包含稳定或激活酶的离子，例如锌离子或镁离子。

温度是，例如，10℃-60℃，优选 30℃-55℃。

进一步地，本发明涉及(S)-羟基化合物对映体选择性回收的方法，

其中

a) 在氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应, 和

c) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

优选的有机溶剂是, 例如, 乙醚, 叔丁基甲基醚, 二异丙基醚, 二丁基醚, 乙酸丁酯, 庚烷, 己烷或环己烷。

如果使用另外的溶剂, 反应批料由含水相和有机相组成。有机相通过合适溶剂或通过本身不溶于水的底物形成, 在该溶剂中底物以溶解状态存在。

有机相占总反应体积的 5%-80%, 优选 10%-40%。

在根据本发明的两相体系中, 水形成一种液相, 和有机溶剂形成第二液相。另外, 可以任选提供固相或另一液相, 其例如产生自还未完全溶解的氧化还原酶和/或添加的酶或羰基化合物。然而, 优选没有固相的两种液相。优选两种液相机械混合以便在两液相之间形成大的表面积。

辅因子 NADH 的浓度是 0.01 mM-1 mM, 特别是 0.05 mM-0.2 mM, 基于含水相。

在根据本发明的方法中, 羰基化合物以基于总体积的 3%-30%, 优选 5%-15%, 特别是 10%的量使用。

进一步地, 本发明涉及羰基化合物对映体选择性还原成对应的 (S)-羟基化合物的方法, 其中

a) 在氧化还原酶, NADH 和水存在的条件下羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物,

b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应,

c) 通过氧化还原酶形成的 NAD 用共底物还原成 NADH, 和

d) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

使用的羰基化合物和氧化还原酶的量对应以上提到的方法。对于本方法合适的共底物是醇, 例如乙醇, 2-丙醇 (异丙醇), 2-丁醇, 2-戊醇或 2-辛醇。这些共底物通过氧化还原酶和 NAD 反应生成对应的酮和 NADH。由此, 再生 NADH。

对于 NAD 到 NADH 的再生的共底物, 例如异丙醇的量是 5%-

50%，基于总体积，优选 8%-20%，特别是 10%-15%。

进一步地，本发明涉及羰基化合物对映体选择性还原成对应的 (S)-羟基化合物的方法，其中

a) 在氧化还原酶，NADH 和水存在的条件下羰基化合物还原成对应的 (S)-羟基化合物，

b) 通过氧化还原酶形成的 NAD 同时用脱氢酶和共底物还原成 NADH，

c) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应，和

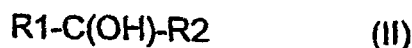
d) 分离形成的手性 (S)-羟基化合物。

对于醇脱氢酶优选在根据本发明的方法中使用进一步的稳定剂。合适的稳定剂是，例如，甘油，山梨糖醇，1,4-DL-二硫苏糖醇 (DTT) 或二甲基亚砷 (DMSO)。

例如，根据本发明的方法在由玻璃或金属制成的密闭反应容器中进行。为此目的，组分各自转移到反应容器中并在例如氮或空气氛下搅拌。取决于使用的底物和羰基化合物，反应时间达 1 小时-48 小时，特别是 2 小时-24 小时。

随后，后处理反应混合物。为此目的，分离含水相并过滤有机相。任选含水相可再萃取一次并可以象有机相一样后处理。之后，任选从过滤的有机相蒸发溶剂。以这种方法，获得了具有超过 99% 的对映体纯度和基本不含原料乙基-4-氯乙酰乙酸酯的产物 (R)-乙基-4-氯-3-羟基丁酸。产物蒸馏后，本方法的总产率达 50%-95%，基于使用的原料的量。

进一步地，本发明涉及具有下式 II 的手性 (R)-羟基化合物的回收方法，其包含如前面所定义的 R1 和 R2 部分。



在所说的方法中，

a) 包含具有式 II 的消旋化合物的混合物用根据本发明的氧化还原酶，NAD 和水培养，和

b) 分离残余的具有式 II 的手性 (R)-羟基化合物。

由此，具有式 II 的 (S)-羟基化合物反应成对应的酮化合物和 NADH。

进一步地，本发明涉及具有式II的手性(R)-羟基化合物的回收方法，其中

- a) 包含具有式II的消旋化合物的混合物用根据本发明的氧化还原酶，NAD和水培养，
- b) 通过氧化还原酶形成的NADH用共底物氧化成NAD，和
- c) 分离残余的具有式II的手性(R)-羟基化合物。

进一步地，本发明涉及具有式II的手性(R)-羟基化合物的回收方法，其中

- a) 包含具有式II的消旋化合物的混合物用根据本发明的氧化还原酶，NAD和水培养，
- b) 通过氧化还原酶形成的NADH用脱氢酶和共底物氧化成NAD，和
- c) 分离残余的具有式II的手性(R)-羟基化合物。

在另一实施方案中，本发明涉及具有式II的手性(R)-羟基化合物的回收方法，其中

- a) 包含具有式II的消旋化合物的混合物用根据本发明的氧化还原酶，NAD和水培养，
- b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应，和
- c) 分离残余的具有式II的手性(R)-羟基化合物。

根据本发明具有式II的手性(R)-羟基化合物的进一步的方法特征在于

- a) 包含具有式II的消旋化合物的混合物用根据本发明的氧化还原酶，NAD和水培养，
- b) 在有机溶剂存在的条件下进行该反应，
- c) 通过氧化还原酶形成的NADH用脱氢酶和共底物氧化成NAD，和
- d) 分离残余的具有式II的手性(R)-羟基化合物。

反应条件与在前面具有式I的酮化合物的对映体选择性还原方法中的基本相同。然而，仅仅具有式II的(S)-羟基化合物对映体选择性地氧化成对应的酮化合物，而非具有式I的酮化合物由具有式II的化合物的消旋混合物对映体选择性还原。因此，具有式II的(R)-羟基化合物保留并可以被分离。

进一步地，其对应的酮，例如丙酮用于 NAD 的再生方法而非用作共底物的醇，例如乙醇，2-丙醇（异丙醇），2-丁醇，2-戊醇或 2-辛醇。例如，丙酮和 NADH 用根据本发明的氧化还原酶或另外的脱氢酶反应成 NAD 和异丙醇。使用的酮的量是 5%-50%，基于总体积，优选 8%-20%和特别是 10%-15%。

在以下中，本发明通过实施例解释。

实施例

实施例 1: 对于 S-特异性醇脱氢酶酵母的筛选

为了筛选，许多不同的酵母菌株在以下的培养基（所有数据以 g/l 表示）中培养：酵母提取物（3），麦芽提取物（3），蛋白胨（5）和葡萄糖（10）。在 121℃ 下培养基灭菌并且在 25℃ 下和在 160 转/分钟（rpm）的摇动器上在未进一步调整 pH 的条件下培养酵母。随后，用 800 μ l 消化缓冲液（100 mM 三乙醇胺（TEA），pH=7.0）重悬浮 125mg 细胞，在球磨机（Retsch）中在 4℃ 下用 1g 玻璃珠混合并消化 10 分钟（min）。在 12 000rpm 下离心 2 min 后获得的上清液（溶菌产物）用于以下的活性筛选和测定对映体过量（ee-值）。乙基-4-氯乙酰乙酸酯和 2-氯-1-（3-氯苯基）乙烷-1-酮用作底物。

用于活性筛选的批料：

860 μ l 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$ pH = 7.0 1mM MgCl_2
20 μ l NADPH 或 NADH (10 mM)

20 μ l 溶菌产物

100 μ l 各个底物（100mM）

反应在 340nm 的波长下进行 1 分钟。

用于测定 ee-值的批料：

20 μ l 溶菌产物

100 μ l NADH 或 NADPH（50mM）

60 μ l 底物（乙基-4-氯乙酰乙酸酯 100mM）

24 小时(h)后，测定 ee 的批料用氯仿萃取并且通过气相色谱(GC)

测定对映体过量。

对映体过量计算如下：

$$ee(\%) = ((R\text{-醇} - S\text{-醇}) / (R\text{-醇} + S\text{-醇})) \times 100.$$

DSMZ 号	微生物名称	乙基-4-氯乙酰乙酸酯 以U/g细胞表示的活性寄生生物			
		NADH	NADPH	ee- 值 NADH	ee-值 NADPH
1345	解脂西洋著草酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	0	15	70 % S	
3434	耐热克鲁维氏酵母	0	6	--	---
3435	佐贝列式梅奇酵母	0	12	--	---
3795	乳克鲁维氏酵母	0	15	80 % S	90 % S
70130	不规则毕赤氏酵母 (<i>Pichia anomala</i>)	0	9	68 % S	90 % S
70169	成膜毕赤氏酵母 (<i>Pichia membranefaciens</i>)	0	8	--	---
70277	<i>Pichia angusta</i>	13	4.5	消旋物	30 % S
70382	巴斯德毕赤氏酵母	16	16	64 % S	81 % S
70638	<i>magnoliae</i> 假丝酵母	2.5	10	--	80 % R
70125	近平滑假丝酵母	25	11	52 % R	70 % S
2147	解甲醇毕赤氏酵母 (<i>Pichia methanolia</i>)	18	27	84 % S	90 % S
	解甲基假丝酵母 (<i>Candida methylica</i>)	8	13	94 % S	94 % S
70260	荚膜毕赤氏酵母	50	5	100 % R	

DSMZ 代表 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig

酶单位的定义：1 U 对应每分钟反应 1 μ mol 底物需要的酶的量

实施例 2：来自于荚膜毕赤氏酵母依赖于 NADH 的 (S)-特异性氧化还原酶的分离

为了从荚膜毕赤氏酵母 (*P.capsulata*) 中分离依赖于 NADH 的氧化还原酶，微生物如实施例 1 描述培养。一旦达到稳定期，收获细胞并通过离心从培养基中分离。通过使用玻璃珠湿研磨进行酶释放但也可以通过其它的消化方法取得。为此目的，用 400ml 消化缓冲液

(100mM 三乙醇胺, 1mM MgCl_2 , pH=7.0) 悬浮 100g *P.capsulata* 并通过弗氏细胞压碎器均化。

离心 (7000rpm) 后获得的粗提取物之后进一步纯化并通过 FPLC (快速蛋白质液相层析) 后处理。

根据本发明的氧化还原酶可以在 Q-Sepharose Fast Flow (Messrs.Pharmacia) 和 Uno Q (Biorad, 慕尼黑, 德国) 上通过离子交换层析以两个连续的步骤纯化。为此目的, 离心后获得的溶菌产物直接应用于 Q-Sepharose FF-柱, 该柱用 50mM 的磷酸钾缓冲液, pH=7.0 平衡, 并用增加的线性盐梯度洗脱。在这样做的过程中, 在 0.2-0.3 M NaCl 下洗脱氧化还原酶。合并包含氧化还原酶的级分并通过超滤 (排阻限 10kDa) 浓缩至适当的体积。随后, 后处理浓缩的氧化还原酶级分并进一步通过 Uno Q 纯化, 使用以上提到的相同缓冲液。由此酶在 0.1 M NaCl 下洗脱。

紧随其后, 通过凝胶渗透 (Superdex 200 HR; Pharmacia, 100mM 三乙醇胺, pH=7.0, 0.15 M NaCl) 测定获得的纯化的氧化还原酶的分子量。

过氧化氢酶 (232kDa), 醛缩酶 (158kDa), 清蛋白 (69.8kDa) 和卵清蛋白 (49.4kDa) 用作分子量标准。

下表 2 总结了获得的结果。

表 2:

纯化步骤	体积 [ml]	活性 [U/ml]	总活性 [U]	比活性 [U/mg]	产率
粗提取物	360	2.0	752	0.07	100 %
Q-Sepharose	67	5.3	358	5	47 %
Uno Q	3.5	14	50	41	6.6 %

氧化还原酶的酶活性在根据实施例 1 (批料活性筛选) 的试验体系中测定, 并且根据 Lowry 等, *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951): 265-275 或 Peterson 等, *Analytical Biochemistry*, 100(1979): 201-220 进行蛋白质数量的测定。酶活性与蛋白质数量的商产生了比活性, 其中每分钟 $1 \mu\text{mol}$ 的转化率对应 1 单位 (U)。

通过凝胶渗透测定的根据本发明的氧化还原酶的分子量在天然状态下是 $140 \pm 10 \text{ kDa}$ 。

实施例 3: 根据本发明的氧化还原酶的 N-末端序列的测定

凝胶渗透后, 根据实施例 2 的酶制剂在 10% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 凝胶中分级并转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF-膜) 上。在大约 35-45 kDa 下的显著带 (band) 通过埃德曼降解 (procise 492 (PE-Biosystems)) 进行 N-末端序列测定。获得以下的 N-末端序列。

SEQ ID NO: 10

KTQAGYIFKKGA

实施例 4: 来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶的克隆

真核微生物荚膜毕赤氏酵母属于糖酵母科。所说的生物的基因结构显示了外显子-内含子排列。因此, 为了确定为对映体选择性氧化还原酶编码的基因序列由荚膜毕赤氏酵母的活性细胞制备 cDNA 文库。

4.1 由荚膜毕赤氏酵母细胞制备总的 RNA

600mg 来自荚膜毕赤氏酵母的新细胞重悬浮于 2.5ml 冰冷的 LETS (10mM 三-HCl, pH=7.4, 10mM EDTA, 100mM LiCl, 0.2% SDS) 缓冲液中。向所说的细胞悬浮液中添加 5ml (大约 20g) 在硝酸中洗涤过并用 3 ml 苯酚 (pH 7.0) 平衡过的玻璃珠。因此, 整个批料交替一次摇动 30 秒 (Vortex Genie, Scientific Industries Inc., 纽约, 美国) 和在冰上冷却 30 秒并处理总共 10 分钟。随后, 添加另外 5 ml 冰冷的 LETS 缓冲液。所说的细胞悬浮液在 11000g 和 4℃ 下离心 5 分钟。除去含水相并用相同体积的苯酚: 氯仿: 3-甲基-1-丁醇 (24: 24: 1) 萃取两次。接着是用氯仿萃取。最后萃取后, 通过添加 1/10 体积的 5M LiCl 在 -20℃ 下沉淀获得的总 RNA。

通过寡-dT 纤维素 (mRNA PräpKit, Qiagen) 1mg 分离的 RNA 用于回收 m-RNA.

随后沉淀后, 5 μ g mRNA 用于 cRNA 的合成 (pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit, Stratagene). 根据生产商的指导建造的文库转化成 XL-10 Gold E.coli 并检查 (S)-ADH 活性.

确定两个克隆 (2/1 和 2/2) 并在灭绝下降的基础上用作为辅因子的 NADH 和作为底物的乙基-4-氯乙酰乙酸酯分离. 通过包含在克隆中的质粒的多个克隆位点用 Primer T7 (SEQ ID NO: 3) 和 Primer T3 (SEQ ID NO: 4) 测序导致了具有 1175bp (SEQ ID NO: 1) 大小的片段. 所说的片段为包含 366 个氨基酸 (SEQ ID NO: 2) 的融合蛋白编码并该片段由 β -半乳糖苷酶的 α -片段和根据本发明的氧化还原酶的序列构成.

4.2 通过 PCR (聚合酶链反应) 由英膜毕赤氏酵母合成为 (S)-ADH 编码的全长转录物

基于 SEQ ID NO: 1, 为了随后的全长转录物的克隆特异性引物被建造成适当的表达体系. 在这样做的过程中, 改性 (SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7) 具有对 Nde I (或 Sph I, 分别) 识别序列的 5' -引物和具有对 Hind III 识别序列的 3' -引物.

寡 1-Nde I: 5'-GGAATTCCATATGTCTGCTCTCTCCAAAAC-3'

寡 2-Sph I: 5'-CACTGCATGCTGATGTCTGCTCTCTCCAAAAC-3'

寡 3-Hind III: 5'-CCCAAGCTTTCATGGAAGCATAACCAATCTT-3'

从英膜毕赤氏酵母的表达文库的克隆 2/1 分离的质粒 DNA 作为聚合酶链反应的模板. 用 50ng 模板和以下的温度循环在 PCR 缓冲液 [10 mM 三-HCl, (pH 8.0); 50m KCl; 10mM MgSO₄; 1mM dNTP 混合物 (由此 N 代表碱基 A, T, C 或 G) 中进行扩增; 每 30 pMol 引物和 2.5 U platinum Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)]:

循环 1: 94°C, 2min

循环 2 x 30: 94℃, 15sec
 58℃, 30sec
 68℃, 75sec
循环 3: 68℃, 7min
 4℃, ∞

纯化后, 产生的 PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶在内切核酸酶 Nde I 和 Hind III 或内切核酸酶 Sph I 和 Hind III 的帮助下消化并连接到 pET21a 载体 (Novagen) 或 pQE30 载体 (Qiagen) 的骨架, 该骨架已经用相同的内切核酸酶处理. 2 il 连接批料转化成 E.coli Top 10F 的细胞 (Invitrogen) 后, 抗氯霉素青霉素的克隆的质粒 DNA 通过使用内切酶限制性酶切分析测试具有 1 100bp 的大小的插入片段的存在, 该限制性内切酶酶切分析使用内切核酸酶 Nde I 和 Hind III 或内切核酸酶 Sph I 和 Hind III. 测序该表达构造物 pET21-PC#10. 来自为根据本发明的氧化还原酶编码的荚膜毕赤氏酵母的转录物具有总共 1026bp 的可读框, 该可读框对应 341 个氨基酸 (SEQ ID NO: 9).

4.3 根据本发明来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶在 Star BL 21 (De3) 大肠杆菌细胞中的表达

感受态大肠杆菌 Star BL 21 (De3) 细胞 (Invitrogen) 用为根据本发明的氧化还原酶编码的表达构造物 pET21-PC#10 转化.

转化的菌株在具有氯霉素青霉素 (50ig/ml) 的 LB 培养基 (1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl) 中培养直到达到 0.5 的光密度, 在 500nm 下测定. 重组氧化还原酶蛋白质的产生通过以 1mM 的最终浓度添加异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 引发. 诱导批料在 25℃ 和 220rpm 下再培养 15h.

取得的酶活性达到大约 6000 U/g 的湿细胞质量.

4.4 根据本发明来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶在 RB791 大肠杆菌细胞中的表达

感受态大肠杆菌 RB791 细胞 (Invitrogen) 用为根据本发明的氧化还原酶编码的表达构造物 pQE30-PC#12 转化.

转化的菌株在具有氯霉素青霉素 (50ig/ml) 的 LB 培养基 (1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl) 中培养直到达到 0.5 的光密度, 在 500nm 下测定. 重组氧化还原酶蛋白质的产生通过以 0.1mM 的最终浓

度添加 IPTG 引发。诱导批料在 25℃ 和 220rpm 下再培养 15 小时。取得的酶活性达到大约 1000 U/g 湿细胞质量。

实施例 5：来自荚膜毕赤氏酵母的重组氧化还原酶的特征

5.1 最佳 pH

制备在表 3 中指明的缓冲液。各个缓冲液组分的浓度在每一种情况下达到 50mM。

表 3

pH 值	缓冲液体系	pH 值	缓冲液体系
4	乙酸钠/乙酸	7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
4.5	乙酸钠/乙酸	8	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5	乙酸钠/乙酸	8.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9	甘氨酸/NaOH
6	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9.5	甘氨酸/NaOH
6.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	10	甘氨酸/NaOH
7	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	11	甘氨酸/NaOH

测定批料 (30℃)：

870 μl 每一种在表 3 中提到的缓冲液体系

20 μl NADH 10mM (8.6mg/ml 水)

10 μl 稀释酶

培养持续大约 2-3min，因此

添加 100 μl 底物溶液 (100 mM 乙基-4-氯-3-氧代丁酸)。

为了测定最佳 pH，在表 3 中指明的各个缓冲液中测定酶反应。为了测定氧化反应的最佳 pH，NADH 用作辅因子和 (S)-甲基-3-羟基丁酸用作底物。为了根据本发明的酶，由此可以测定 6.5-7 为还原反应的最佳 pH 和 7.8-8.2 为氧化反应的最佳 pH。

5.2 pH 稳定性

重组氧化还原酶的活性的测定通过贮存在表 3 中提到的缓冲液体系中检查。为此目的，在 4-11 的 pH 范围制备各种缓冲液 (50mM)，

并且用其稀释根据实施例 4 制备的氧化还原酶。30, 60 和 300min 培养后, 从批料中取出 10 μ l 并用于根据实施例 1 活性试验。

因此, 初始值是测定值, 其在磷酸钾缓冲液 50mM pH=7.0 中稀释 (1:20) 酶后立刻获得。在给定的条件下, 所说的值对应大约 0.70/min 的灭绝变化并设定为 100% 值, 并且所有以下的测定值与所说的值相关设定。

在这样做的过程中, 检测到来自荚膜毕赤氏酵母的重组氧化还原酶在 5.5-8.5 的 pH 下是稳定的并且可以在活性无任何实质损失的情况下培养至少 5h。在 9.0 以上和 5.0 以下的 pH 值下培养导致了酶的立刻失活。

5.3 最佳温度

为了测定最佳试验温度, 在 15 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 的温度范围在标准测定批料中测定酶活性。正如在表 4 中可以看到, 酶在 45 $^{\circ}$ C 下达到了它的最大活性, 之后活性快速下降。

表 4

温度	以 U/ml 未稀释酶	温度	以 U/ml 未稀释酶
($^{\circ}$ C)	表示的酶活性	($^{\circ}$ C)	表示的酶活性
15	73	45	176
20	83	50	122
25	128	55	45
30	135	60	0
35	163	65	0
40	170	70	0

5.4 温度稳定性

温度稳定性以在实施例 5.2 下描述的类似的方式在 15 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 的范围测定。为此目的, 1: 20 稀释的纯化氧化还原酶在每一种情况下在各个温度下培养 60min 和 180min 并随后在 30 $^{\circ}$ C 下用以上提到的试验批料测定。也在这种情况下, 在磷酸钾缓冲液 50mM pH=7.0 中稀释纯化的氧化还原酶后立刻获得的测定值用作初始值。所说的值在本实施例中

也设定为 100%值。

这里，酶在 15℃-40℃ 的温度范围是完全稳定的并且 3h 的培养后未显示任何活性损失。在 55℃ 下，30 分钟后已经不再能够检测到酶活性。

5.5 底物谱/对映体过量

根据本发明的氧化还原酶的底物谱通过用多种酮，含羧酸和其酯测定酶活性来测定。为此目的，根据实施例 5.1 的标准测定批料和不同的底物一起使用。使用乙基-4-氯乙酰乙酸酯的活性等于 100% 并且所有的其它底物与其相关设定。

为了测定 ee-值，使用下列的反应批料用于所选择的底物。

100 μ l NADH 50mM

60 μ l 底物 (100mM)

+1-2U 的根据本发明的氧化还原酶

24 小时后测定 ee 的批料用氯仿萃取并通过 GC 测定产生的醇的对映体过量。

表 5

底物	相对活性 %	立体 选择性	底物	相对活性 %	立体 选择性
酮			3-含氧酸酯		
1-苯基-2-丙酮	24	97 % S	乙基-4- 氯乙酰乙酸酯	100	99 % R
2-氯-1-(3-氯- 苯基)乙烷-1-酮	21	100 % R	乙酰乙酸甲酯	150	97 % S
乙酰苯	4	n.b.	乙基-8-氯-6- 氧代辛酸	20	100 % R
辛酰苯	0	n.b.	二甲基-3-氧- 1,8-辛二酸	3.5	n.b.
2-辛酮	88	100 % S	乙基-3- 氧代戊酸酯	67	n.b.
3-辛酮	30	n.b.	乙酰乙酸乙酯	100	99 % S
2-丁酮	99	50 % S			
4-羟基-2-丁酮	99	90 % S			
乙基-2-氧代戊酸酯	41	97 % S	2-氧代戊酸	0	n.b.
乙基-2-氧-4- 苯基丁酸	76	95 % S	2-氧-3-苯基丙酸	0	n.b.
丙酮酸乙酯	10	100 % S	2-氧代丁酸	0	n.b.
乙醛酸乙基苯基酯	5.2	100 % R			

n. b. 指未测定

正如在表 5 中可以看到，广谱的 2-和 3-含氧酸酯和芳族和脂族酮由根据本发明的氧化还原酶对映体选择性地还原。

5.5 溶剂稳定性

在有机溶剂存在的条件下测定来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶的稳定性。为此目的，在每一种情况下氧化还原酶用指明的溶剂混

合物（在可水混溶的有机溶剂情况下）稀释 1: 20 并且在室温（20℃-24℃；RT）下培养。随后，10 μl 酶溶液用于标准试验批料。也在这种情况下，在缓冲液（磷酸钾缓冲液（KPP）100mM，pH=7.0）中稀释后初始值等于 100%，并且所有的其它值也与所说的初始值相关设定。

在可水混溶的有机溶剂情况下，稀释同样发生在磷酸钾缓冲液中，向批料中添加相同体积的有机溶剂并且该批料在 RT 下在 170rpm 的热混合器（thermomixer）中培养。活性由含水相测定。表 6 显示了结果。

表 6

活性	8 h	24 h	活性	8 h	24 h
缓冲液	100 %	100 %	乙酸乙酯	2	0
KPP 100 mM pH =7					
1 mM MgCl ₂					
5 % 异丙醇	77 %	77 %	乙酸丁酯	53 %	28 %
10% 异丙醇	72 %	72 %	乙醚	100 %	100 %
20 % 异丙醇	46 %	46 %	甲基叔丁基醚	100 %	100 %
30 % 异丙醇	18 %	18 %	二异丙基醚	100 %	100 %
5 % EtOH	77 %	77 %	氯仿	51 %	0 %
10% EtOH	77 %	77 %	己烷	60 %	20 %
20 % EtOH	100 %	100 %	庚烷	74 %	43 %
30 % EtOH	64 %	64 %	环己烷	85 %	70 %
10 % DMSO	42 %	45 %			
20 % DMSO	30 %	30 %			

EtOH 代表乙醇；DMSO 代表二甲基亚砷

正如在表 6 中可以看到，来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶对于有机溶剂显示了惊人的稳定性。和确立的学说形成对比，与在纯的缓冲液中的培养相比较，根据本发明的氧化还原酶甚至在有机可水混

溶的和不可水混溶的溶剂中是稳定的。因此，正如在 DE 101 19274 A1 中描述根据本发明的氧化还原酶可以用于两相体系。

5.7 制备转化

5.7.1 乙基-4-氯乙酰乙酸酯到乙基-(R)-4-氯-3-羟基丁酸的还原

为了制备批料，34 l 缓冲液 (100 mM TEA, pH=7, 1 mM ZnCl₂, 10% 甘油)，4 l 异丙醇，4 l 4-氯乙酰乙酸酯，4 g NAD 和 3.6 百万 U 来自荚膜毕赤氏酵母的重组氧化还原酶在室温下在恒定混合下培养 24 h。24 h 后，使用的 99% 的 4-氯乙酰乙酸酯被还原。随后，用乙酸乙酯萃取反应混合物，通过旋转蒸发器除去溶剂并蒸馏粗产物。以这种方式，回收 2.8 l (3.4 kg) 具有 99% 的对映体过量的乙基-(R)-4-氯-3-羟基丁酸。这对应 70% 的产率，基于使用的原料的量。

5.7.2 2-氯-1-(3-氯苯基)乙烷-1-酮到 (R)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙烷-1-醇的还原

为了制备批料，164 ml 缓冲液 (100 mM TEA, pH=7, 1 mM ZnCl₂, 20% 甘油)，16 ml 异丙醇，20 g 溶解于 20 ml 甲基叔-丁基醚 (MTBE) 中的 2-氯-1-(3-氯苯基)乙烷-1-酮，10 mg NAD 和 20 000 U 来自荚膜毕赤氏酵母的重组氧化还原酶在室温下在恒定混合下培养 24 h。24 h 后，使用的 96% 的 2-氯-1-(3-氯苯基)乙烷-1-酮被还原。随后，用乙酸乙酯萃取反应混合物，并使用旋转蒸发器除去溶剂。以这种方式，回收 15 g 具有 100% 的对映体过量的 (R)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙烷-1-醇。这对应 77% 的产率，基于使用的原料的量。

序列表

<110> Juelich Enzyme Products GmbH
 <120> 来自荚膜毕赤氏酵母的氧化还原酶
 <130> (TH)4090
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1175
 <212> DNA
 <213> 荚膜毕赤氏酵母
 <400> 1

```

cgcggtggcg gccgctctag aactagtgga tccccgggc tgcaggaatt cggcacgagg      60

atctttctca actacaatgt ctgctctctc caaaaccag gccggttaca tcttcaagaa      120

gggtgccggt cacatcgta aggcagaggt tccaatcccc aagccaactg gtgcccaatc      180

tcttcttagg gtcaaggctg caggaatgtg ccactctgac ttgcacgtca ttggagaaac      240

attggaggtc cctaccgatg ggtacgtgct cggtcacgaa attgctgggt aattgggtgga      300

gatcggagac tcggtcaacc ctgaagtttt taagggtgga ggccgttatg ctgttcattg      360

actgaattcg tgtggatcct gtgagatgtg tcgtaccggt catgacaatg actgtactgg      420

aatgaatcg aatgggtacg gtctgggaat tagtgggtgt taccagcagt acctgctggt      480

gccaaattcg caccatctat tgccatttcc agataacgtg tcctaagaag ttgctgctgc      540

cacctctgat gctgtcttga ctccatacca tgctatcaag aattccggag tgactccatc      600

ttctaagggtg ttgatgtttg gtctgggtgg tttgggatcg aacgcacttc agatcctcaa      660

ggcatttgga gcctatgtgg ttgccgttga tgtcaagccc gcatccaaag caattgccga      720

cgaattcaaa gcggatgaat tctataccga tatcagccaa tcttcttgga aaccagctc      780

gtttgattac tgttttgact tcgtttcget gcaggtcacc ttcgacatct gccagaagta      840

tatcaagtc caccgtacca tcttcccagt gggctctgggc tcgagcaagc tgacttttga      900

cttgggaaac ctggcattgc gtgaagtaaa aattgttggt aacttctggg gtactttctca      960
  
```

```

ggaacagatc gaagcaatgg agctggttag ctcggttagg gtcaagcctc aagttcacac 1020
caccgaactt gaaaaccttc ctgaatcact tgaaaaactg gaggagggtg agatcaatgg 1080
aagattggtt atgcttccat gatcacaac tatttataac gagatacgag aaaaagtta 1140
atatgatgtc gtttttccaa tcaaaagggg ggccc 1175

```

<210> 2
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <400> 2

```

Ala Val Ala Ala Ala Leu Glu Leu Val Asp Pro Pro Gly Cys Arg Asn
1           5           10           15

```

```

Ser Ala Arg Gly Ser Phe Ser Thr Thr Met Ser Ala Leu Ser Lys Thr
          20           25           30

```

```

Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly Ala Gly His Ile Val Lys Ala
          35           40           45

```

```

Glu Val Pro Ile Pro Lys Pro Thr Gly Ala Gln Ser Leu Leu Arg Val
50           55           60

```

```

Lys Ala Ala Gly Met Cys His Ser Asp Leu His Val Ile Gly Glu Thr
65           70           75           80

```

```

Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Tyr Val Leu Gly His Glu Ile Ala Gly
          85           90           95

```

```

Glu Leu Val Glu Ile Gly Asp Ser Val Asn Pro Glu Val Phe Lys Val
100           105           110

```

Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu
115 120 125

Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys
130 135 140

Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val
145 150 155 160

Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu
165 170 175

Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val Leu Thr Pro Tyr His Ala Ile
180 185 190

Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser Lys Val Leu Met Phe Gly Leu
195 200 205

Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln Ile Leu Lys Ala Phe Gly Ala
210 215 220

Tyr Val Val Ala Val Asp Val Lys Pro Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp
225 230 235 240

Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp
245 250 255

Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe Asp Phe Val Ser Leu Gln Val
260 265 270

Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile Lys Ser His Gly Thr Ile Phe
275 280 285

Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu
290 295 300

Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln
305 310 315 320

Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro
325 330 335

Gln Val His Thr Thr Glu Leu Glu Asn Leu Pro Glu Ser Leu Glu Lys
340 345 350

Leu Glu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Arg Leu Val Met Leu Pro
355 360 365

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工的
<400> 3

gtaatacgac tataggg 17

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的
<400> 4

caattaaccc tcactaaagg g 21

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的
<400> 5

ggaattccat atgtctgtctc tctccaaaac 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <400> 6

cactgcatgc tgatgtctgc tctctccaaa ac 32

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <400> 7

cccaagcttt catggaagca taaccaatct t 31

<210> 8
 <211> 1026
 <212> DNA
 <213> 荚膜毕赤氏酵母
 <400> 8

atgtctgtctc tctccaaaac ccaggccggt tacatcttca agaagggtgc cggtcacatc 60

gtcaaggcgg aggttccaat cccaagcca actggtgccc aatctcttct tagggtcaag 120

gctgcaggaa tgtgccactc tgacttgac gtcattggag aaacattgga ggtccctacc 180

gatgggtacg tgctcggtea cgaaattgct ggtgaattgg tggagatcgg agactcggtc 240

aaccctgaag tttttaaggt gggaggccgt tatgtctgtc atggactgaa ttcgtgtgga 300

tcctgtgaga tgtgtcgtac cggtcatgac aatgactgta ctggaaatga atcgaaatgg 360

tacggtctgg gaattagtgg tggttaccag cagtacctgc tggtgccaaa ttcgcaccat 420

ctattgccta ttccagataa cgtgtcctac gaagttgctg ctgccacctc tgatgtgtgc 480

ttgactccat accatgctat caagaattcc ggagtgactc catcttctaa ggtgttgatg 540

tttggctctgg gtggtttggg atcgaacgca cttcagatcc tcaaggcatt tggagcctat 600
gtggttgccg ttgatgtcaa gcccgcaccc aaagcaattg ccgacgaatt caaagcggat 660
gaattctata ccgatatcag ccaatcttct tggaaccag cctcgtttga ttactgtttt 720
gacttcgttt cgtgcaggt caccttcgac atctgccaga agtatatcaa gtcccacggt 780
accatcttcc cagtgggtct gggctcgagc aagctgactt tcgacttggg aaacctggca 840
ttgcgtgaag taaaaattgt tggttaacttc tggggtactt ctcaggaaca gatcgaagca 900
atggagctgg ttagctcggg taggtcaag cctcaagttc acaccaccga acttgaaaac 960
cttcctgaat cacttgaaaa actggaggag ggtaagatca atggaagatt ggttatgctt 1020
ccatga 1026

<210> 9
<211> 341
<212> PRT
<213> 荚膜毕赤氏酵母
<400> 9

Met Ser Ala Leu Ser Lys Thr Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly
1 5 10 15

Ala Gly His Ile Val Lys Ala Glu Val Pro Ile Pro Lys Pro Thr Gly
20 25 30

Ala Gln Ser Leu Leu Arg Val Lys Ala Ala Gly Met Cys His Ser Asp
35 40 45

Leu His Val Ile Gly Glu Thr Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Tyr Val
50 55 60

Leu Gly His Glu Ile Ala Gly Glu Leu Val Glu Ile Gly Asp Ser Val
65 70 75 80

Asn Pro Glu Val Phe Lys Val Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu
85 90 95

Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp
100 105 110

Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly
115 120 125

Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile
130 135 140

Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val
145 150 155 160

Leu Thr Pro Tyr His Ala Ile Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser
165 170 175

Lys Val Leu Met Phe Gly Leu Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln
180 185 190

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

Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr
210 215 220

Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe
225 230 235 240

Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile
245 250 255

Lys Ser His Gly Thr Ile Phe Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu
260 265 270

Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly
275 280 285

Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val
290 295 300

Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro Gln Val His Thr Thr Glu Leu Glu Asn
305 310 315 320

Leu Pro Glu Ser Leu Glu Lys Leu Glu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Arg
325 330 335

Leu Val Met Leu Pro
340

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> 荚膜毕赤氏酵母
<400> 10

Lys Thr Gln Ala Gly Tyr Ile Phe Lys Lys Gly Ala
1 5 10