

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

發明專利說明書

公告本

856101

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97134420

C12P1/02 <2006.04>

※申請日期：97年09月08日

※IPC分類：

C12N15/53 <2006.01>

一、發明名稱：

(中) 對映異構選擇性酶催化還原中間產物之方法

(英) Process for the enantioselective enzymatic reduction of intermediates

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) I E P 有限公司

(英) IEP GMBH

代表人：(中) 1. 古塔 安特杰

(英) 1. GUPTA, ANTJE

地址：(中) 德國維斯巴登雷高街一九〇一一九六號

(英) 190-196 Rheingastrasse, D-65203 Wiesbaden, Germany

國籍：(中英) 德國 GERMANY

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓名：(中) 古塔 安特杰

(英) GUPTA, ANTJE

國籍：(中) 德國

(英) GERMANY

2. 姓名：(中) 包克法 瑪麗亞

(英) BOBKOVA, MARIA

國籍：(中) 俄羅斯

(英) RUSSIA

3. 姓名：(中) 茲赫安爾 安克

(英) TSCHENTSCHER, ANKE

國籍：(中) 德國

(英) GERMANY

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 奧地利 ; 2007/09/27 ; A1530/2007 有主張優先權

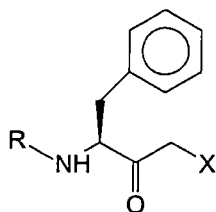
■主張專利法第三十條生物材料：

■所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要

發明之名稱：對映異構選擇性酶催化還原中間產物之方法

一種用於對映異構選擇性酶催化還原通式 I 之酮基化合物之方法



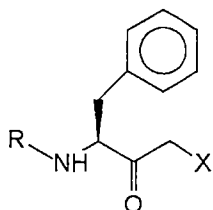
(I)

其中 R 可代表任何用於胺基官能之保護基(第三丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基、9-芴基甲氧羰基)且 X=-Cl、-CN、-OH、Br 或 F。

六、英文發明摘要

發明之名稱：**Process for the enantioselective enzymatic reduction of intermediates**

A process for the enantioselective enzymatic reduction of a keto compound of general formula I



(I)

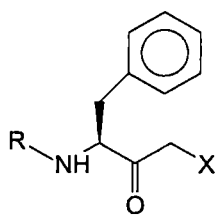
wherein R may represent any protective group for amino functions (tert. butyloxycarbonyl group (BOC), benzyloxycarbonyl group, 9-fluorenylmethoxycarbonyl group) and X = -Cl, -CN, -OH, Br, F.

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明： 無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

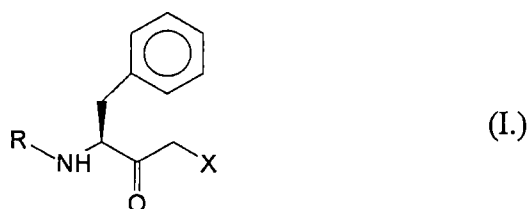


(I)

九、發明說明

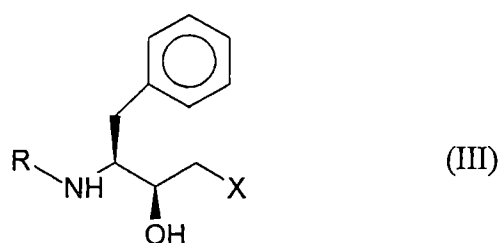
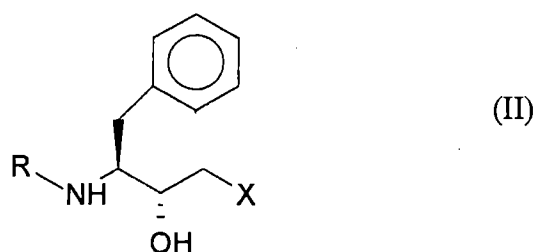
【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種在輔因子之存在下以氧化還原酶將通式 I 之酮基化合物



(其中 R 可代表任何用於胺基官能之保護基(第三丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基、9-芴基甲氧羰基)且 X=-Cl、-CN、-OH、Br 或 F)

經對映異構選擇性酶催化還原成通式 II (R,S-醇)及 III (S,S-醇)之化合物的方法。



較佳之式 I 化合物包含作為胺基保護基之丁氧羰基或苄氧羰基及在 X 之位置中之氯原子。

【 先 前 技 術 】

通式 II 及 III 之手性醇為製造用於 HIV 療法中之蛋白酶抑制劑的重要中間產物。這類蛋白酶抑制劑為，如：諾憶亞 (Ritonavir)、安普那維 (Amprenavir)、氟沙普那維 (Fosamprenavir)、艾塔紗那維 (Atazanavir) 或達洛那維 (Darunavir)。

通式 II (R,S-醇) 及 III (S,S-醇) 之中間產物係分別經由例如：對映異構選擇性還原對應之式 I 的酮基化合物來取得，此係以目前之製造方法經由化學方式進行。執行此方法時，該以化學方式催化之還原反應的不利處為其一方面可能因嚴酷之反應條件產生副產品，另一方面其分別產生不合意之對映異構體及非對映異構體過量，且其在技術上需大量工作才能實行。因此，富含對映異構形之式 II (R,S-醇) 之中間產物較式 III (S,S-醇) 之中間產物更難以化學方式取得。

為此，有相當長一段時間係致力發展可用於對映異構選擇性地還原該中間產物的生物催化法。生物催化法通常係在溫和條件下操作，因此，預料其可使式 I 之酮基化合物還原而不會進一步形成副產物。然而，目前為止仍無法找到任何合適之生物催化劑，藉由該生物催化劑可以分離出之酶來進行酶催化之還原反應。

就吾人所知，僅有少數現存之刊物中描述在全細胞方法中將式 I 之酮與紅球菌或鏈黴菌種反應 (Tetrahedron

Asymmetry 14(2003)3105-3109, Tetrahedron Asymmetry 8(1997)p.2547)。然而，以此方式僅能分別以野生菌種之全細胞及溶胞產物發生反應，因此，反應僅在遠低於 2% 之非常低的濃度下進行且無輔酶再生。目前尚無可應用在工業規模中之酶催化還原法且涉及該反應之酶尚未被分離及鑑定出。

【發明內容】

本發明之目標係提供經濟地製造高產量、具高對映異構純度之分別為對映異構上純化及對映異構增加的通式 II 及 III 之中間產物且無任何副產物的方法。

根據本發明可藉由最先提出之方法類型來達成目標，該方法之特徵在於所使用之用於製造式 II 化合物 (R,S-醇) 的氧化還原酶

a) 包含 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 4 之胺基酸序列，或

b) 包含一胺基酸序列，其中至少 60% 之胺基酸與胺基酸序列 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2 或 SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4 之胺基酸相同，或

c) 包含一胺基酸序列，其中至少 70% 之胺基酸與胺基酸序列 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2 或 SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4 之胺基酸相同，或

d) 係由核酸序列 SEQ ID NO : 16、SEQ ID NO : 17、SEQ ID NO : 18、SEQ ID NO : 19 所編碼，或

e) 係由一核酸序列所編碼，該核酸序列係在嚴格條件下與 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 雜交，或

f) 含有長度為 220 至 260 個胺基酸並包含一或數個選自序列 SEQ ID NO: 31 至 SEQ ID NO: 51 之部分序列

且可將式 I 之化合物優先還原成式 II 之化合物。

nalvtgasrgig (SEQ ID NO: 31) nalvtggsrgig (SEQ ID NO: 32), gysvt (SEQ ID NO: 33),

gynvt (SEQ ID NO: 34), gygitl (SEQ ID NO: 35), gygvt (SEQ ID NO: 51)

vlaklp (SEQ ID NO: 36), vkaklp (SEQ ID NO: 37)

fkgaplpa (SEQ ID NO: 38), frgaplpa (SEQ ID NO: 39), lkgaplpa (SEQ ID NO: 40),

spialtk (SEQ ID NO: 41), spvaltk (SEQ ID NO: 42), sqialtq (SEQ ID NO: 43),

avysask (SEQ ID NO: 44), avysatk (SEQ ID NO: 45), gvysatk (SEQ ID NO: 46),

pikgwi (SEQ ID NO: 47), piegwi (SEQ ID NO: 48), piggwi (SEQ ID NO: 49) and pigwi

(SEQ ID NO: 50),

再者，本發明之目標可藉由最先提出之方法類型達成，該方法之特徵在於所使用之用於製造式 III 化合物 (S,S-醇) 之氧化還原酶

a) 包含 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列，

b) 包含一胺基酸序列，其中至少 60% 之胺基酸與胺基酸序列 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 之胺基酸相同，或

c) 係由核酸序列 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、

第 097134420 號

民國 102 年 11 月 20 日修正

SEQ ID NO : 22、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 26、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 28、SEQ ID NO : 29 或 SEQ ID NO : 30 所編碼，或

d) 係由一核酸序列所編碼，該核酸序列係在嚴格條件下與 SEQ ID NO : 20、SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 22、SEQ ID NO : 23、SEQ ID NO : 24、SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 26、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 28、SEQ ID NO : 29 或 SEQ ID NO : 30 雜交，

e) 含有長度為 220 至 260 個胺基酸且包含一或數個選自序列 SEQ ID NO : 31 至 SEQ ID NO : 66 之部分序列

且可將該式 I 之化合物優先還原成式 III 之化合物。

nalvtgasrgig (SEQ ID NO: 31) nalvtggsrgig (SEQ ID NO: 32), gysvt (SEQ ID NO: 33),

gynvt (SEQ ID NO: 34), gygitl (SEQ ID NO: 35), gygvt (SEQ ID NO: 51)

vlaklp (SEQ ID NO: 36), vkaklp (SEQ ID NO: 37)

fkgaplpa (SEQ ID NO: 38), frgaplpa (SEQ ID NO: 39), lkgaplpa (SEQ ID NO: 40),

fkaaplpa (SEQ ID NO: 52), fkgaplpa (SEQ ID NO: 53)

spialtk (SEQ ID NO: 41), spvaltk (SEQ ID NO: 42), sqialtq (SEQ ID NO: 43),

avysask (SEQ ID NO: 44), avysatk (SEQ ID NO: 45), gvysatk (SEQ ID NO: 46),

pikgwi (SEQ ID NO: 47), piegwi (SEQ ID NO: 48), piggwi (SEQ ID NO: 49) and pigwi (SEQ ID NO: 50),

gigrat (SEQ ID NO: 54), gigrasa (SEQ ID NO: 55), gigret (SEQ ID NO: 56),

nnagig (SEQ ID NO: 57), nnagieg (SEQ ID NO: 58),

irvvaiapg (SEQ ID NO: 59), irvnaiapg (SEQ ID NO: 60), irvnaicpg (SEQ ID NO: 61),

irvvgiapg (SEQ ID NO: 62),

pegiagav (SEQ ID NO: 63), peaianav (SEQ ID NO: 64), peevanav (SEQ ID NO: 65),

peaianav (SEQ ID NO: 66)

據了解，優先將該式 I 之化合物還原成式 II 之化合物的多肽為其中該可在理想反應條件下取得之 R,S-醇量的最高對映異構體過量為至少 50%。因此，據了解，理想之反

應條件為多肽可在該反應條件下產生最高對映異構體過量之 R,S-醇的多肽反應條件。

現已發現該包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 之多肽顯示出氧化還原酶活性且可用於將該式 I 之化合物優先還原成式 II 之化合物(R,S-化合物)。可取得之 R,S-醇量的對映異構體過量為 >50%，宜為 >80%，更宜為 >95%。當使用 SEQ ID NO: 1 時所取得之對映異構體過量可佔據，例如：至多 >99%之 R,S-化合物(式 II)。

類似地，現已發現包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 5 至 SEQ ID NO: 15 之多肽顯示出氧化還原酶活性且可用於將該式 I 之化合物優先還原成式 III 之化合物(S,S-化合物)。可取得之 R,S-醇量的對映異構體過量為 >80%，宜為 >90%，更宜為 >95%。當使用 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 12 時所取得之對映異構體過量可佔據，例如：至多 >99%之 R,S-化合物(式 II)。

多種提及之氧化還原酶，諸如 SEQ ID NO: 1、3、4、5、6、7 及 15 具有可經由還原二級醇來再生於還原反應期間形成之經氧化的輔因子的額外益處。因此，與先前技藝之方法相較下，該氧化還原酶亦有不需使用額外之酶來再生輔因子的特殊經濟利益。

編碼包含 SEQ ID NO: 5 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 20 係自，例如：有機體 *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 之基因組取得。

第 097134420 號

民國 102 年 11 月 20 日修正

編碼包含 SEQ ID NO: 6 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 21 係自，例如：有機體 *Geobacillus kaustophilus* JCM 12893 (HTA426) 之基因組取得。

編碼包含 SEQ ID NO: 7 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 22 係自，例如：有機體綠絲菌 *Chloroflexus auratiacus* DSMZ 635 (J-10-fl) 之基因組取得。

分別編碼包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 23 或 DNA 序列 SEQ ID NO: 24 係自，例如：有機體木蘭假絲酵母 (*Candida magnoliae*) DSMZ 70638 之基因組取得。

編碼包含 SEQ ID NO: 11 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 26 係自，例如：有機體木蘭假絲酵母 DSMZ 70639 之基因組取得。

編碼包含 SEQ ID NO: 1 之多肽的 DNA 序列 SEQ ID NO: 16 係自，例如：有機體木蘭假絲酵母 CBS 6396 之基因組取得。

再者，SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 及 SEQ ID NO: 15 之氧化還原酶係，例如：從木蘭假絲酵母 JCM 9448、*Candida geochares* MUCL 29832、*Candida magnoliae* CBS 5659、*Candida magnoliae* CBS 2798、*Candida gropengoesseri* MUCL 29836、假絲酵母菌種 MUCL 40660、*Candida vaccinii* CBS 7318 中進行同源篩選來取得。

因此，本發明關於用於將通式 I 之酮基化合物分別還原成式 II 及 III 之化合物的方法，其特徵在於所形成之化合物式 II 或 III 的其中之一為明顯過量，該方法係使用包含胺基酸序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之一的多肽、或包含與胺基酸序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之一者至少 50% 相同的胺基酸序列之多肽（即，可經由取代、插入、刪除或加入至少一胺基酸而衍生自序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之多肽）、或使用由核酸序列 SEQ ID NO：16 至 SEQ ID NO：30 之一所編碼的多肽、或係由在嚴格條件下與序列 SEQ ID NO：16 至 SEQ ID NO：30 之一雜交的核酸序列所編碼的多肽。

據了解，在嚴格條件下與，例如：SEQ ID NO：16 雜交的核酸序列為可經由群落雜交法、斑塊雜交法、南方雜交法或使用 SEQ ID NO：16 作為 DNA 探針之可比較的方法來鑑定的多核苷酸。

為此，將固定在濾器上之多核苷酸與，例如：SEQ ID NO：16 在 0.7-1M NaCl 溶液中，60°C 下雜交。例如：依 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 或類似之刊物中的描述進行雜交。接著，以 65°C，0.1 至 2 倍之 SSC 溶液清洗濾器，據了解，其中之 1 倍 SSC 溶液為由 150mM NaCl 及 15mM 檸檬酸鈉所組成之混合物。

再者，本發明關於具胺基酸序列 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14 及 SEQ ID NO：15 之多肽以及與胺基酸序列 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14 及 SEQ ID NO：15 之一至少 55%、宜為

65%至 75%、更宜為超過 75%相同之多肽(即，可經由取代、插入、刪除或加入至少一胺基酸而衍生自序列 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14 及 SEQ ID NO：15 之多肽)。再者，本發明關於由核酸序列 SEQ ID NO：16、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29 或 SEQ ID NO：30 所編碼之多肽或由在嚴格條件下與序列 SEQ ID NO：16、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29 或 SEQ ID NO：30 之一者雜交的核酸序列所編碼之多肽。

在根據本發明之方法中，包含序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之多肽及可自該多肽衍生之多肽可分別以完全純化之狀態、部分純化之狀態或含有多肽 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之一的細胞形式使用。所使用之細胞可以天然、可被滲透或溶解狀態來提供。較佳地，在合適之宿主有機體(例如，諸如大腸桿菌)中過度表達分別包含序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之多肽及可自其衍生之多肽並且使用重組之多肽來還原通式 I 之羥基酮。

根據本發明之酶催化還原反應係在溫和之條件下進行，如此，可使不穩定之式 I 化合物降解而藉此廣泛避免形成不欲有之副產物。根據本發明之方法，根據所使用之多

肽，式 II 化合物 (R,S-化合物) 之對映異構純度至多為 99%，至少為 50% 之 R,S-化合物。

在式 III 化合物 (S,S-化合物) 方面，根據所使用之多肽，本發明方法之式 III 化合物 (S,S-化合物) 的對映異構純度至多為 99%，至少為 80% 之 R,S-化合物。

本發明之一較佳體系之特徵為該方法所使用之輔因子係藉由輔受質持續還原。較佳地，使用 NAD(P)H 作為輔因子，而在還原反應中形成之 NAD(P) 係藉由輔受質還原回 NAD(P)H。

根據本發明之方法宜將藉由氧化還原酶/脫氫酶形成之經氧化的輔因子 NAD 或 NADP 持續再生。

根據本發明之所有方法的較佳體系，經氧化的輔因子 NAD 或 NADP 宜經由醇之氧化作用再生。

較宜使用二級醇，諸如 2-丙醇、2-丁醇、2-戊醇、3-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-庚醇或 2-辛醇作為輔受質。根據特佳之體系係使用 2-丙醇或 4-甲基-2-戊醇來再生輔酶。根據總體積，用於再生之輔受質的量可為體積之 5 至 95%。

較佳地，使用通式 $R_X R_Y \text{CHOH}$ 之二級醇來再生輔因子，其中 R_X 和 R_Y 係獨立地為氫、支鏈型或非支鏈型 C_1-C_8 烷基且 $C_{\text{總數}} \geq 3$ 。

根據本發明方法之另一較佳體系係加入其他氧化還原酶/脫氫酶以利輔因子之再生。

於另一較佳體系中，可另外加入其他醇脫氫酶以利輔

因子之再生。合適之 NADH 倚賴性醇脫氫酶可自，如：發麵酵母 (baker's yeast)、近平滑假絲酵母 (*Candida parapsilosis*)(CPCR)(US 5,523,223 及 US 5,763,236, Enzyme Microb. Technol., 1993, 15(11): 950-8)、莢膜畢赤酵母 (*Pichia capsulata*)(DE 10327454.4)、紅串紅球菌 (*Rhodococcus erythropolis*)(RECR)(US 5,523,223)、褐色諾卡菌 (*Norcardia fusca*)(Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(10),1999,p.1721-1729 ; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003,62(4) : 380-6 ; Epub 2003, Apr. 26)或赤紅球菌 (*Rhodococcus ruber*)(J. Org. Chem., 2003, 68(2) : 402-6)取得。那些醇脫氫酶之合適的輔受質為，例如：已提出之二級醇，諸如 2-丙醇(異丙醇)、2-丁醇、2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-辛醇或環己醇。

用於再生 NADPH 之合適的二級醇脫氫酶為，例如：上述者及自乳桿菌目之有機體(如：克菲爾乳桿菌 (*Lactobacillus kefir*)(US 5,200,335)、短乳桿菌 (DE 19610984 A1 ; Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2000 Dec ; 56 Pt 12 : 1696-8)、細小乳桿菌 (DE 10119274)、明串珠菌 (*Leuconostoc carnosum*)(A1261/2005 , K1.C12N))中分離出者，或如描述之來自嗜熱厭氧布氏桿菌 (*Thermoanaerobium brockii*)、嗜熱厭氧產乙醇桿菌 (*Thermoanaerobium ethanolicus*)或拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)者。

然而，原則上，亦可使用其他酶催化系統以利輔因子

之再生。例如：輔因子之再生可利用 NAD-或 NADP-倚賴性甲酸脫氫酶生效 (Tishkov et al., *Biotechnol. Bioeng.*[1999]64,187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase)。合適之甲酸脫氫酶的輔受質為，例如：甲酸之鹽類，諸如甲酸銨、甲酸鈉或甲酸鈣。

在根據本發明之方法中，反應批中所使用之通式 I 之化合物的量以總體積計時宜為 10 克/升至 500 克/升，宜為 25 克/升至 300 克/升，更宜為 50 克/升至 200 克/升。

其中進行酶催化還原反應之反應混合物的水溶性部分宜含有 pH 值在 5 至 10(宜為 pH6 至 9)的緩衝劑，如：磷酸鉀、tris/HCl 或三乙醇胺緩衝劑。另外，該緩衝劑可含有用於穩定或活化酶之離子，諸如鋅離子或鎂離子。

當進行根據本發明之方法時，溫度範圍係適合在約 10°C 至 70°C，宜為 20°C 至 45°C。

根據本發明之方法的另一較佳體系，該酶催化反應係在有機溶劑(其不能與水溶混或僅可以有限程度與水溶混)之存在下進行。該溶劑係，例如：對稱性或非對稱性二(C₁-C₆)烷基醚、直鏈型或支鏈型烷或環烷或不溶於水之二級醇(其同時代表該輔受質)。較佳之有機溶劑為二乙醚、第三丁基甲醚、二異丙醚、二丁醚、醋酸丁酯、庚烷、己烷、2-辛醇、2-庚醇、4-甲基-2-戊醇及環己醇。在此情況中，該溶劑亦可同時作為用於再生輔因子之輔受質。

若分別使用不溶於水之溶劑及輔受質則該反應批包含

水相及有機相。根據其溶解度，該化合物係分佈在有機相及水相之間。一般而言，根據總反應體積，該有機相之比例為 5 至 95%，宜為 10 至 90%。該二種液相宜以機器混合，如此可在二種相之間產生大表面積。再者，本較佳體系中，如：該在酶催化還原反應期間形成之 NAD(P)可藉輔受質(諸如上述者)還原回 NAD(P)H。

輔因子(尤其是 NADH 或 NADPH)在水相中之濃度範圍通常分別為 0.001mM 至 10mM，尤其是 0.01mM 至 1mM。

在根據本發明之方法中所取得之 TTN(總週轉數=被還原之式 I 化合物的莫耳數/所使用之輔因子的莫耳數)通常為 10^2 至 10^5 ，然而，宜為 $\geq 10^3$ 。

根據本發明之方法中亦可使用氧化還原酶/脫氫酶之安定劑。合適之安定劑為，例如：甘油、山梨糖醇、1,4-DL-二硫代蘇糖醇(DTT)或二甲亞砜(DMSO)。

根據本發明之方法係在，例如：由玻璃或金屬製成之密閉反應容器中進行。為此，將該成分個別轉移入反應容器中並在，如：氮氣或空氣大氣下攪拌之。

根據本發明之另一可能的較佳體系，可持續移出該經氧化之輔受質(如：丙酮)及/或可連續新加入輔受質(如：2-丙醇)以使反應平衡朝向反應產物移動。

於另一較佳體系中，亦可在本發明方法之過程中一點一點地加入根據 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 之氧化還原酶及/或輔受質。

在還原完全後處理該反應混合物。為此，如：隨意地

將水相自有機相分開並將該含有產物之有機相過濾。亦可選擇性地如有機相般進一步萃取和處理水相。於是，將溶劑自有機相蒸發，所取得之通式 II 或 III 之產物為粗產物。然後，可將粗產物進一步純化或用於直接合成終產物。

下文中，本發明藉由實例進一步說明。

【實施方式】

實例 1

自 *Rubrobacter xylinophilus* DSM 9941 選殖及提供氧化還原酶 (SEQ ID NO:5)

A) 培養 *Rubrobacter xylinophilus* DSM 9941

將 *Rubrobacter xylinophilus* DSM 9941 之細胞培養在 50°C (pH7.2) 之下列介質中並將其置於 140rpm 之細菌-搖動器中：0.1% 酵母萃取物，0.1 蛋白胨，0.004% $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.02% $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.01% 氨基三醋酸，100 毫升磷酸鹽緩衝劑 [5.44 毫/升 KH_2PO_4 ，43 毫/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$]，500 微升/升 0.01M 檸檬酸鐵，500 微升/升微量元素 [500 微升/升 H_2SO_4 ，2.28 克/升 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ，500 毫克/升 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ，500 毫克 H_3BO_3 ，25 毫克/升 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ，25 毫克/升 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ，45 毫克/升 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$]。在培養之第 6 天藉由離心將細胞與培養介質分開並貯存在 -80°C。

B) 擴增編碼選擇性氧化還原酶之基因

根據 Manniatis & Sambrook 之 “Molecular Cloning” 中所描述之方法萃取基因組 DNA。以所產生之核酸作為涉及聚合酶鏈反應 (PCR) 之特殊引物 (其係衍生自 NCBI 資料庫中編號 46106817 之基因序列) 的模板。執行此程序時，提供用於具有分別適用於核酸內切酶 *Nde I* 及 *Hind III* 或 *Sph I* (SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69) 之限制位的 5'-端之引物以供接下去將核酸選殖入表達載體中。

在 PCR 緩衝劑 [10mM Tris-HCl (pH8.0); 50mM KCl; 10mM MgSO₄; 1mM dNTP 混合物; 在各情況中使用 20 皮摩爾 (pMol) 之引物及 2.5U 之 Platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen)] 中，以 500 奈克之基因組 DNA 及下列溫度循環進行擴增：

循環 1：	94°C，2 分鐘
循環 2x30：	94°C，15 秒
	54°C，30 秒
	68°C，60 秒
循環 3：	68°C，7 分鐘
	4°C，∞

在 1% 瓊脂糖凝膠上純化後，分別藉由核酸內切酶 *Nde I* 及 *Hind III* 或 *Sph I* 及 *Hind III* 之協助切出大小約 750bp 之所產生的 PCR 產物，並將其分別連接入 pET21a 載體 (Novagen) 或 pQE70 載體 (Qiagen) 之骨架中 (該骨架已藉相

同之核酸內切酶處理過)。將 2 微升之連接批轉形入大腸桿菌 Top 10F 細胞中(Invitrogen)後，分別以核酸內切酶 *Nde I* 及 *Hind III* 或 *Sph I* 及 *Hind III* 藉由進行限制分析來測試具安苜青黴素抗性之菌落的質體 DNA 中是否存有大小 750bp 之插入物。將來自存有該片段之菌落的質體製品進行序列分析並接著分別轉形入大腸桿菌 BL21 Star(Invitrogen)及大腸桿菌 RB791(遺傳貯積品，Yale)中。

C) 在大腸桿菌細胞中有效表達多肽 SEQ ID NO : 5

爲了在大腸桿菌細胞有效表達多肽 SEQ ID NO : 5，使用編碼 DNA SEQ ID NO : 70 作爲 PCR 反應中之模板以供選殖入表達載體中。在第一區中，此 DNA 序列與先前已知之 DNA 序列 (SEQ ID NO : 20) 有 153 個鹼基不同。此修改爲保守性且不會造成胺基酸序列中之變化。

在 PCR 緩衝劑 [10mM Tris-HCl(pH8.0); 50mM KCl; 10mM MgSO₄; 1mM dNTP 混合物; 在各情況中使用 20 皮摩爾之引物 (SEQ ID NO : 71、SEQ ID NO : 68) 及 2.5U 之 Platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen)] 中，以 50 奈克之 DNA SEQ ID NO : 70 作爲模板並使用下列溫度循環進行擴增：

循環 1 : 94°C , 2 分鐘

循環 2x30 : 94°C , 40 秒

56°C , 30 秒

68°C , 60 秒

循環 3 : 68°C , 7 分鐘

4°C , ∞

在 1%瓊脂糖凝膠上純化後，藉由核酸內切酶 *Nhe I* 及 *Hind III* 之協助，將大小約 750bp 之所產生的 PCR 產物切出並連接入 pET21a 載體 (Novagen) 之骨架中 (該骨架已藉相同之核酸內切酶處理過)。將 2 微升之連接批轉形入大腸桿菌 Top 10F 細胞中 (Invitrogen) 後，以核酸內切酶 *Nhe I* 及 *Hind III* 藉由進行限制分析來測試具安苳青黴素抗性之菌落的質體 DNA 中是否存有大小為 750bp 之插入物。將來自存有該片段之菌落的質體製品進行序列分析並接著轉形入大腸桿菌 BL21 Star (Invitrogen) 中。

D) 自 *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 製備氧化還原酶

將大腸桿菌種 BL21 Star (Invitrogen, 德國 Karlsruhe) 及 RB791 (大腸桿菌遺傳貯積品, 美國 Yale) (其已藉表達構造物轉形) 分別培養在具有安苳青黴素 (50 微克/毫升) 之介質 (1% 蛋白胨、0.5% 酵母萃取物, 1% NaCl) 中，直到在 550nm 處測量其光學密度達到 0.5。經由加入濃度為 0.1mM 之異丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 來誘導重組蛋白質表達。在 25°C 及 220rpm 下誘導 16 小時後，收成細胞並將其於 -20°C 冷凍。

爲了回收酶，將 30 克細胞懸浮在 150 毫升三乙醇胺

緩衝劑 (100mM pH=7, 2mM MgCl₂, 10% 甘油) 中並利用高壓均質器破碎之。接著，將酶溶液與 150 毫升甘油混合再貯存在 -20°C。

使用由此取得之酶溶液並用於還原化合物 I (實例 3)。

以類似於實例 2 中所提出之程序亦可提供氧化還原酶
SEQ ID NO: 6 及 SEQ ID NO: 7。

實例 2

藉分子篩選自木蘭假絲酵母選殖及提供氧化還原酶
(SEQ ID NO:1)

A) 分子篩選氧化還原酶

使用自木蘭假絲酵母 CBS 6396 之細胞分離出的基因組 DNA 作為用於經由 PCR 進行分子篩選時之模板。執行此程序時，在 PCR 緩衝劑 [16mM (NH₄)₂SO₄; 67mM Tris-HCl pH8.3 (在 25°C); 1.5mM MgCl₂; 0.01% 吐溫 20; 0.2mM dNTP 混合物; 在各情況中使用 30 皮摩爾之引物 (SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73) 及 1.25U 之 Bio Therm Star 聚合酶 (Genecraft)] 中，以 50 奈克之自木蘭假絲酵母 CBS 6396 之細胞分離出的基因組 DNA 作為模板，並使用下列循環進行擴增：

循環 1: 95°C, 7 分鐘

循環 2x28: 94°C, 40 秒

溫度下降開始 63°C -0.5°C/步驟, 30 秒

68°C , 60 秒
 x20 : 94°C , 40 秒
 53°C , 40 秒
 70°C , 60 秒
 循環 3 : 70°C , 7 分鐘
 4°C , ∞

將全部 PCR 批在 1%瓊脂凝膠上分離後，鑑定出約 400bp 大小之帶並經由突出之腺嘌呤核苷部分選殖入 Topo-TA 載體 (Invitrogen) 中以決定 DNA 序列。

自篩選反應產生之 DNA 帶顯示出一相當於具有 137 個胺基酸殘基之氧化還原酶片段的開放閱讀框構。

B) 分離 (總 RNA 及 mRNA)

將 600 毫克之新鮮細胞再懸浮於 2.5 毫升冰冷之 LETS 緩衝劑中。在該細胞懸浮液中加入 5 毫升 (約 20 克) 在硝酸中清洗並以 3 毫升苯酚 (pH7.0) 平衡之玻璃珠。然後，將整批輪流進行渦流震盪混合處理 30 秒，在冰上冷卻 30 秒，共 10 分鐘。接著，加入 5 毫升之冰冷的 LETS 緩衝劑並將其再次進行劇烈之渦流震盪混合。將該細胞懸浮液在 4°C，11000g 離心 5 分鐘。回收水相並以等體積之苯酚：氯仿：異戊醇 (24：24：1) 萃取二次。接著，以氯仿萃取之。最後一次萃取後，加入 1/10 體積之 5M LiCl₂ 將總 RNA 在 -20°C 下沈澱 4 小時。

藉由 Oligo-dT 纖維素 (NEB Biolabs)，使用由此取得

之 1 毫克總 RNA 來增加 mRNA 分子。

根據 Manniatis & Sambrook 之 “Molecular Cloning” 中所描述之方法，藉由 RACE(快速擴增 cDNA 端)測定編碼氧化還原酶之全部序列。

編碼氧化還原酶之基因序列包含 720 鹼基對，其長度等於 239 個胺基酸殘基。

C) 藉由 PCR 合成來自木蘭假絲酵母 CBS 6396 之編碼短鏈 ADH 的全長轉錄子

建構特殊引物以用於接下去將全長轉錄子轉殖入合適之表達系統中。執行此程序時，修改具有用於 *Nde I* 之識別序列的 5'-引物及具有用於 *Hind III* 之識別序列的 3'-引物 (SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75)。以自木蘭假絲酵母 CBS 6396 之細胞分離出的基因組 DNA 作為聚合酶鏈反應中之模板。在 PCR 緩衝劑 [10mM Tris-HCl(pH8.0); 50mM KCl; 10mM MgSO₄; 1mM dNTP 混合物; 在各情況中使用 20 皮摩爾之引物及 2.5U 之 Platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen)] 中，以 50 奈克之模板及下列溫度循環進行擴增：

循環 1： 94°C，2 分鐘

循環 2x30： 94°C，15 秒

58°C，30 秒

68°C，75 秒

循環 3： 68°C，7 分鐘

4°C , ∞

在 1%瓊脂糖凝膠上純化後，藉由核酸內切酶 *Nde I* 及 *Hind III* 之協助，切出產生之 PCR 產物並將其連接入 pET21a 載體 (Novagen) 之骨架中 (該骨架已藉相同之核酸內切酶處理過)。將 2 微升之連接批轉形入大腸桿菌 Top 10F 細胞中 (Invitrogen) 後，以核酸內切酶 *Nde I* 及 *Hind* 藉由限制分析來測試具安苳青黴素 (或卡那黴素) 抗性之菌落的質體 DNA 中是否存有大小為 750bp 之插入物。將 pET21-MIX 之表達構造物定序。來自木蘭假絲酵母之編碼短鏈氧化還原酶的基因具有一為 720bp 之開放閱讀框構 (SEQ ID NO: 16)，其相當於具有 239 個胺基酸之蛋白質 (SEQ ID NO: 1)。

D) 在大腸桿菌細胞中表達重組之氧化還原酶

以編碼氧化還原酶之表達構造物 pET21-MIX 將合格之大腸桿菌 Star BL21(De3) 細胞 (Invitrogen) 及 RB791 細胞 (大腸桿菌遺傳貯積品，美國，Yale) 分別轉形。將以表達構造物轉形之大腸桿菌菌落分別培養在 200 毫升具有 50 微克/毫升之安苳青黴素或 40 微克/毫升之卡那黴素的 LB 介質 (1% 蛋白腴、0.5% 酵母萃取物、1% NaCl) 中，直到在 550nm 處測量出光學密度達到 0.5。經由加入濃度為 0.1mM 之異丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 來誘導重組蛋白質表達。在 25°C 及 220rpm 下誘導 16 小時後，收成細胞並將其於 -20°C 冷凍。在活性試驗方面，將 10 毫克細胞與 500

微升之 100mM TEA 緩衝劑，pH7.0、1mM MgCl₂ 及 500 微升玻璃珠混合並利用球磨機分解 10 分鐘。將所取得之細胞化物以稀釋狀態用於各別測量中。

活性試驗係依下述進行：960 微升之 100mM TEA 緩衝劑，pH7.0、1mM MgCl₂、160 微克 NADPH、10 微升之稀釋的細胞溶胞化物。將 10 微升之 100mM 受質溶液加入反應混合物中，以開始反應。

爲了大量回收酶，將 30 克細胞再懸浮於 150 毫升之三乙醇胺緩衝劑(100mM，pH7、2mM MgCl₂、10%甘油)並利用高壓均質器分解。接著，將酶溶液與 150 毫升甘油混合並貯存在 -20°C。

以類似於實例 2 中所提出之程序亦可提供 SEQ ID NO：2、3、4、8、9、10、11、12、13、14、15。

實例 3：

關於氧化還原酶 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 在還原式 I 化合物之性質方面的特性描述

依下述檢查用於轉化式 I 化合物之序列 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 的氧化還原酶。

反應 A 批(無輔酶之再生)

160 微升 緩衝劑(三乙醇胺 100mM，pH=7、1mM MgCl₂、10%甘油)

150 微升 NAD(P)H(40 毫克/毫升)=6 毫克

20 微升	2-丙醇
2 毫克	式 I 化合物
50 微升	根據實例 1D 之酶溶液

反應 B 批 (具輔酶之再生)

400 微升 緩衝劑 (三乙醇胺 100mM, pH=7, 1mM
MgCl₂, 10% 甘油)

0.05 毫克	NAD(P)H
50 微升	2-丙醇
10 毫克	式 I 化合物
50 微升	根據實例 1D 之酶溶液

將樣本 A 和 B 培養 24 小時後，在各完全反應批中加入 1 毫升乙腈，將反應批離心並轉移入 HPLC 分析容器 (1 毫克/毫升) 中。

經由 HPLC (Nucleodur 100 5 C18 ec, 125 毫米, 直徑 4 毫米, Macherey-Nagel) 分析反應批。使用 1 毫升/分鐘之流速及乙腈 (B) 及水 (A) 之溶劑系統。以 40% 至 80% 乙腈之逐漸增加的線性梯度可在 10 分鐘內將式 I、II 和 III 之化合物分開。

持留時間為 (式 I 之酮) 10.0 分鐘; (式 II 之 R,S-化合物) 9.3 分鐘及 (式 III 之 S,S-化合物) 8.5 分鐘。

結果

	A批		B批	
	轉化率 (被還原酮%)	對映異構選擇性 (對映異構體[ee])	轉化率 (被還原酮%)	對映異構選擇性 (對映異構體[ee])
SEQ ID No 1	38%	R,S (99%)	38%	R,S (99%)
SEQ ID No 2	39%	R,S (80%)	55%	R,S (82%)
SEQ ID No 3	100%	R,S (50%)	100%	R,S (50%)
SEQ ID No 4	50%	R,S (60%)	50%	R,S (60%)
SEQ ID No 5	75%	S,S (>99%)	20%	S,S (>99%)
SEQ ID No 6	85%	S,S (>98%)	40%	S,S (>98%)
SEQ ID No 7	90%	S,S (>90%)	80%	S,S (>90%)
SEQ ID No 8	80%	S,S (80%)	50%	S,S (80%)
SEQ ID No 9	100%	S,S (>99%)	90%	S,S (>99%)
SEQ ID No 10	90%	S,S (>80%)	90%	S,S (>80%)
SEQ ID No 11	95%	S,S (96%)	95%	S,S (96%)
SEQ ID No 12	60%	S,S (>98%)	30%	S,S (>98%)
SEQ ID No 13	50%	S,S (90%)	80%	S,S (90%)
SEQ ID No 14	100%	S,S (80%)	100%	S,S (70%)
SEQ ID No 15	34%	S,S (70%)	40%	S,S (70%)

實例 4：

經由氧化還原酶 SEQ ID NO：1 將式 I 化合物轉化成式 II 化合物 (R,S-化合物)

爲了將式 I 化合物轉化成式 II 化合物 (R,S-化合物)，將 2.25 毫升之 SEQ ID NO：1 的酶懸浮液 (見實例 1D) 及 75 單位 (=2 毫升) 來自嗜熱厭氧布氏桿菌之過度表達的醇脫氫酶各加入 3 毫升緩衝劑 (100mM TEA, pH=8、10% 甘油)、1.5 克式 I 化合物、0.3 毫克 NADP 及 7 毫升 4-甲基-

2-戊醇的混合物中。將反應混合物在固定及充分混合下在室溫下溫育。48 小時後，超過 95%之所使用的式 I 化合物已還原成式 II 化合物。該對映異構過量係 >98%。

實例 5

經由氧化還原酶 SEQ ID NO: 5 將式 I 化合物轉化成式 III 化合物 (S,S-化合物)

爲了進一步將式 I 化合物轉化成式 III 化合物 (S,S-化合物)，將 600 微升之緩衝劑 (100mM TEA, pH=9)、200 微升之 2-丙醇、50 毫克之式 I 化合物、0.1 毫克之 NAD 及 200 微升之 SEQ ID NO: 5 的酶懸浮液 (見實例 1D) 的混合物在 Eppendorf 反應容器中溫育。將反應混合物在固定及充分混合下在室溫溫育。48 小時後，超過 90%之所使用的式 I 化合物已還原成式 III 化合物 (S,S-化合物)。該對映異構過量係 >98%。

序列表

<110> IEP有限公司(IEP GmbH)

<120> 對映異構選擇性酶催化還原中間產物之方法

<130> A1530/2007

<140> 097134420

<141> 2008-09-08

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 1

Met Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Ile
1 5 10 15Ala Thr Lys Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Val Thr Ile Ala Ser Arg
20 25 30Gly Ile Asp Gln Leu Asn Lys Val Lys Ala Lys Leu Pro Val Val Arg
35 40 45Glu Gly Gln Thr His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu
50 55 60Ala Ala Ser Ser Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Asp
65 70 75 80Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Val Thr Asp Pro Ser Pro Ile Ala Lys
85 90 95Gln Ser Asp Ser Glu Ile His Lys Leu Phe Ser Val Asn Leu Leu Ser
100 105 110Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Tyr Val Gln Ala Val Thr Gly Lys Pro
115 120 125Arg Glu Thr Pro Ala His Ile Ile Phe Ile Ser Ser Gly Val Ala Ile
130 135 140Arg Gly Tyr Pro Asn Val Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys Ser Gly Leu
145 150 155 160Asp Gly Phe Met Arg Ser Leu Ala Arg Glu Leu Gly Pro Glu Gly Val
165 170 175His Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Leu Thr Lys Thr Glu Met Ala Ser
180 185 190Gly Val Ser Leu Asp Asp Phe Pro Pro Ser Pro Ile Gly Gly Trp Ile
195 200 205Gln Pro Glu Ala Ile Ala Asp Ala Val Arg Tyr Leu Val Lys Ser Lys
210 215 220

Asn Ile Thr Gly Thr Ile Leu Ser Val Asp Asn Gly Ile Thr Val
 225 230 235

<210> 2
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 2

Met Pro Ser Thr Leu Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

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

Leu Ala Ala Arg Asp Ile Lys Lys Leu Asn Asp Val Lys Ala Lys Leu
 35 40 45

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

Ala Asp Val Gln Ala Ala Leu Glu Leu Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
 65 70 75 80

Ser Lys Tyr Asp Leu Leu Val Ala Asn Ala Gly Val Ser Ala His Val
 85 90 95

Pro Thr Ala Glu His Asp Asp Ala His Trp Gln Asn Val Ile Thr Ile
 100 105 110

Asn Leu Ser Ser Gln Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Val Arg Ala Ile
 115 120 125

Gly Glu Arg Ser Asp Glu Ala Pro Phe His Ile Val Tyr Val Ser Ser
 130 135 140

Ile Ala Ala Leu Arg Gly Asn Pro Met Ser Ala Val Tyr Ser Ala Ser
 145 150 155 160

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

Pro Lys Gly Ile His Val Asn Thr Val His Pro Gly Leu Thr Lys Thr
 180 185 190

Asp Met Thr Val Arg Met Arg Pro Ala Glu Asp Gln Pro Ile Lys Gly
 195 200 205

Trp Val Leu Pro Asp Ala Ile Ala Asp Ala Val Val Phe Leu Ala Lys
 210 215 220

Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Arg Val
 225 230 235 240

Val

<210> 3
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> 草原地假絲酵母(*Candida geochares*)

<400> 3

Met Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Pro Thr Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Ile
 20 25 30

Gln Leu Ala Ser Gln Gly Tyr Ser Val Thr Leu Ala Ser Arg Gly Leu
 35 40 45

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

Gln Thr His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ala Asp Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Asp Val Leu
 85 90 95

Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Leu Phe Ser Pro Ile Gly Asp Gln Ala
 100 105 110

Asp Glu Asp Trp Gln Arg Met Leu Ala Val Asn Leu Thr Ser Pro Ile
 115 120 125

Ala Leu Thr Lys Ala Leu Val Lys Ala Ile Ala Asp Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Asn Pro Ala His Ile Ile Phe Val Ser Ser Ala Val Ser Leu Arg Gly
 145 150 155 160

Tyr Pro Leu Val Gly Val Tyr Ser Ala Thr Lys Ala Gly Leu Asp Gly
 165 170 175

Phe Thr Arg Ser Leu Ala His Glu Leu Gly Pro Lys Arg Ile His Val
 180 185 190

Asn Thr Val Asn Pro Gly Leu Thr Lys Thr Glu Met Ala Lys Asp Val
 195 200 205

Glu Leu Asp Ser Phe Gly Gly Asn Val Pro Ile Ser Gly Trp Ile Gln
 210 215 220

Val Asp Ala Ile Ala Asp Ala Val Ser Phe Leu Val Asn Ser Lys Asn
 225 230 235 240

Ile Thr Gly Thr Ser Leu Val Val Asp Asn Gly Ile Ser Val
 245 250

<210> 4
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 4

Met Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr
 1 5 10 15

Ala Ile Gln Leu Ala Gln Glu Gly Tyr Gly Val Thr Leu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Ala Arg Gln Leu Asn Glu Val Leu Ala Lys Leu Pro Val Val Arg
 35 40 45

Asp Gly Gln Thr His His Ile Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Pro Glu
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Phe Arg Gly Ala Pro Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Asp
 65 70 75 80

Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Val Ser Ser Leu Ser Pro Phe Val Ala
 85 90 95

Gln Ser Asp Glu Val Gln Lys Thr Ile Leu Ala Val Asn Leu Leu Ser
 100 105 110

Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Phe Val Lys Ala Ala Val Gly Lys Pro
 115 120 125

Arg Glu Arg Pro Ala His Ile Ile Phe Ile Ser Ser Gly Ala Ala Leu
 130 135 140

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

Asp Ser Phe Met Arg Ser Leu Ala Arg Glu Leu Gly Pro Gln Gly Ile
 165 170 175

His Val Asn Ser Val Asn Pro Gly Phe Thr Glu Thr Glu Met Thr Ala
 180 185 190

Thr Thr Asp Leu Asn Asp Tyr Pro Pro Thr Pro Ile Glu Gly Trp Ile
 195 200 205

Gln Pro Arg Ala Ile Ala Asp Ala Ile Leu Phe Leu Leu Lys Ser Arg
 210 215 220

Asn Ile Thr Gly Thr Asn Val Thr Val Asp Asn Gly Ile Thr Val
 225 230 235

<210> 5

<211> 249

<212> PRT

<213> 嗜木聚糖紅色桿菌(Rubrobacter xylanophilus)

<400> 5

Met Leu Glu Gly Lys Val Ala Val Ile Thr Gly Ala Gly Ser Gly Ile
 1 5 10 15

Gly Arg Ala Thr Ala Leu Arg Phe Ala Arg Glu Gly Ala Arg Val Val
 20 25 30

Val Ala Glu Leu Asp Glu Arg Arg Gly Glu Glu Val Val Arg Glu Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser Gly Gly Glu Ala Val Phe Val Arg Thr Asp Val Ser Glu
 50 55 60

Phe Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Glu Arg Ala Val Glu Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

Thr Leu Asp Val Met Phe Asn Asn Ala Gly Ile Gly His Tyr Ala Pro
 85 90 95

Leu Leu Glu His Asp Pro Glu His Tyr Asp Arg Val Val Arg Val Asn
 100 105 110

Gln Tyr Gly Val Tyr Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Gly Arg Lys Met Ala
 115 120 125

Glu Leu Glu Asn Pro Gly Val Ile Ile Asn Thr Ala Ser Val Tyr Ala
 130 135 140

Phe Leu Ala Ser Pro Gly Val Ile Gly Tyr His Ala Ser Lys Gly Ala
 145 150 155 160

Val Lys Met Met Thr Gln Ala Ala Ala Leu Glu Leu Ala Pro His Gly
 165 170 175

Ile Arg Val Val Ala Ile Ala Pro Gly Gly Val Asp Thr Pro Ile Ile
 180 185 190

Gln Gly Tyr Lys Asp Met Gly Leu Gly Glu Arg Leu Ala Arg Gly Gln
 195 200 205

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

Leu Leu Ala Thr Glu Glu Ala Asp Ala Ile Asn Gly Ser Val Val Met
 225 230 235 240

Thr Asp Asp Gly Tyr Ala Glu Phe Lys
 245

<210> 6
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 嗜極熱地芽孢桿菌(Geobacillus kaustophilus)

<400> 6

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

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

Ala Val Ser Asp Ile Asn Glu Glu Gly Gly Glu Glu Thr Val Arg Leu
 35 40 45

Ile Arg Glu Lys Gly Gly Glu Ala Ile Phe Val Gln Thr Asp Val Ala
50 55 60

Asp Ser Lys Gln Val Ser Arg Leu Val Gln Thr Ala Val Asp Ala Phe
65 70 75 80

Gly Gly Leu His Ile Leu Phe Asn Asn Ala Gly Ile Gly His Ser Glu
85 90 95

Val Arg Ser Thr Asp Leu Ser Glu Glu Glu Trp Asp Arg Val Ile Asn
100 105 110

Val Asn Leu Lys Gly Val Phe Leu Gly Ile Lys Tyr Ala Val Pro Val
115 120 125

Met Lys Gln Cys Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Thr Ser Ser Leu Leu
130 135 140

Gly Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Glu Ser Ala Tyr Asn Ala Ser Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Asn Ala Ala Leu Glu Tyr Gly Lys Phe
165 170 175

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

Ile Thr Pro Trp Lys Gln Asp Glu Arg Lys Trp Pro Ile Ile Ser Lys
195 200 205

Ala Asn Ala Leu Gly Arg Ile Gly Thr Pro Glu Glu Val Ala Asn Ala
210 215 220

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

Leu Ser Val Asp Gly Gly Gly Leu Thr Phe
245 250

<210> 7

<211> 252

<212> PRT

<213> 橘色綠絲菌(Chloroflexus aurantiacus)

<400> 7

Met Glu Pro Pro Phe Ile Gly Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ala Gly Ile Gly Arg Ala Ser Ala Leu Ala Phe Ala Arg Glu Gly Ala
20 25 30

Lys Val Val Val Ala Asp Val Asn Val Glu Gly Gly Glu Glu Thr Ile
35 40 45

Ala Leu Cys Arg Ala Leu Asn Thr Asp Ala Met Phe Val Arg Cys Asp
50 55 60

Val Ser Gln Arg Asp Glu Val Glu Arg Leu Ile Ala Leu Ala Val Asp
65 70 75 80

Thr Phe Gly Arg Ile Asp Phe Ala His Asn Asn Ala Gly Ile Glu Gly
85 90 95

Val Gln Ala Met Leu Ala Asp Tyr Pro Glu Glu Val Trp Asp Arg Val
100 105 110

Ile Glu Ile Asn Leu Lys Gly Val Trp Leu Cys Met Lys Tyr Glu Ile
115 120 125

Arg His Met Leu Lys Gln Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Thr Ser Ser
130 135 140

Val Ala Gly Leu Ala Gly Ser Arg Gly Val Ser Ala Tyr Val Ala Ser
145 150 155 160

Lys His Gly Ile Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Ala
165 170 175

Arg Asn Gly Ile Arg Val Asn Ala Ile Cys Pro Gly Thr Ile His Thr
180 185 190

Ala Met Ile Asp Arg Phe Thr Gln Gly Asp Pro Gln Leu Leu Ala Gln
195 200 205

Phe Ala Glu Gly Glu Pro Ile Gly Arg Leu Gly Ser Pro Glu Glu Val
210 215 220

Ala Asn Ala Val Ile Trp Leu Cys Ser Asp Lys Ala Ser Phe Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Thr Leu Ala Val Asp Gly Gly Arg Leu Ala
245 250

<210> 8

<211> 241

<212> PRT

<213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 8

Met Thr Ser Thr Pro Asn Ala Leu Ile Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15

Gly Ala Ser Ala Ala Ile Lys Leu Ala Gln Glu Gly Tyr Ser Val Thr
20 25 30

Leu Ala Ser Arg Asp Leu Glu Lys Leu Thr Glu Val Lys Asp Lys Leu
35 40 45

Pro Ile Val Arg Gly Gly Gln Lys His Tyr Val Trp Gln Leu Asp Leu
50 55 60

Ala Asp Val Glu Ala Ala Ser Ser Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Asp Leu Phe Val Ser Asn Ala Gly Ile Ala Gln Phe Ser

Asn Leu Ser Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys Ala Leu Leu Lys Asp Val
 115 120 125

Ser Glu Arg Pro Val Asp Lys Pro Leu Gln Ile Ile Tyr Ile Ser Ser
 130 135 140

Val Ala Gly Leu His Gly Ala Ala Gln Val Ala Val Tyr Ser Ala Ser
 145 150 155 160

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

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

Glu Met Thr Ala Gly Ile Glu Ala Leu Pro Asp Leu Pro Ile Lys Gly
 195 200 205

Trp Ile Glu Pro Glu Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Leu Ala Lys
 210 215 220

Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Leu Ile
 225 230 235 240

Ala

<210> 10

<211> 252

<212> PRT

<213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 10

Met Ser Tyr Gln Met Ser Ser Ser Ala Pro Ser Ser Thr Ser Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Ile
 20 25 30

Lys Leu Ala Glu Glu Gly Tyr Ser Val Thr Ile Ala Ser Arg Gly Leu
 35 40 45

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

Gln Val His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Val Asp Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Phe Lys Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ser Arg Tyr Asp Val Leu
 85 90 95

Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Gln Phe Ser Pro Phe Ile Glu His Ala
 100 105 110

Lys Gln Asp Trp Ser Gln Met Leu Ala Ile Asn Leu Ala Ala Pro Ile
 115 120 125

Ala Leu Ala Gln Thr Phe Ala Lys Ala Ile Gly Asp Lys Pro Arg Asn
130 135 140

Thr Pro Ala His Ile Val Phe Val Ser Ser Asn Val Ser Leu Arg Gly
145 150 155 160

Phe Pro Asn Ile Gly Val Tyr Thr Ala Thr Lys Ala Gly Ile Asp Gly
165 170 175

Phe Met Arg Ser Val Ala Arg Glu Leu Gly Pro Ser Gly Ile Asn Val
180 185 190

Asn Ser Val Asn Pro Gly Pro Thr Arg Thr Glu Met Thr Lys Gly Ile
195 200 205

Asp Val Gly Thr Ile Asp Met Pro Ile Lys Gly Trp Ile Glu Pro Glu
210 215 220

Ala Ile Ala Asp Ala Val Leu Phe Val Val Lys Ser Lys Asn Ile Thr
225 230 235 240

Gly Thr Thr Val Val Val Asp Asn Gly Ser Ser Ala
245 250

<210> 11
<211> 252
<212> PRT
<213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 11

Met Thr Thr Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Arg Ser Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Ile
20 25 30

Lys Leu Ala Ser Glu Gly Tyr Ser Val Thr Leu Ala Ser Arg Ser Leu
35 40 45

Glu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Glu Lys Leu Pro Val Val Lys Gln Gly
50 55 60

Gln Thr His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Val Asp Ala Ala
65 70 75 80

Ala Thr Phe Lys Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Asp Ala Val
85 90 95

Ile Ser Asn Ala Gly Val Ala Gln Phe Ser Pro Leu Ser Glu His Ala
100 105 110

Arg Glu Asp Trp Ser Gln Met Leu Thr Ile Asn Leu Ala Ala Pro Ile
115 120 125

Ala Leu Ala Gln Ala Phe Val Lys Ala Ile Gly Asp Lys Lys Arg Asp
130 135 140

Ile Pro Ala Gln Ile Val Phe Val Ser Ser Asn Val Val Met Arg Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Tyr Leu Gly Ile Tyr Thr Ala Ser Lys Ala Gly Ile Asp Gly
 165 170 175

Phe Met Arg Ser Ala Ala Arg Glu Leu Gly Pro Lys Gly Ile Asn Val
 180 185 190

Asn Ser Val Asn Pro Gly Ala Thr Gln Thr Glu Met Thr Lys Gly Val
 195 200 205

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

Ala Val Ala Asp Ala Val Leu Phe Val Val Gln Ser Lys Asn Ile Thr
 225 230 235 240

Gly Thr Thr Ile Val Val Asp Asn Gly Ser Val Ala
 245 250

<210> 12

<211> 240

<212> PRT

<213> 木蘭假絲酵母(Candida magnoliae)

<400> 12

Met Asn Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Val Lys Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Val Thr Leu Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ser Leu Lys Lys Gly Leu Pro Val Val Lys
 35 40 45

Asp Gly Gln Ala His His Val Trp Glu Leu Asp Leu Gly Asp Val Asp
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala Glu Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Val Phe Val Ser Asn Ala Gly Met Ala Lys Ser Thr Leu Met Val Asp
 85 90 95

His Pro Ile Asp Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Val Asn Leu Val Ser
 100 105 110

Pro Ile Ala Leu Thr Gln Gly Leu Val Lys Ala Leu Thr Glu Ser Lys
 115 120 125

Arg Asp Lys Pro Ala His Ile Val Phe Met Ser Ser Ile Arg Ser Phe
 130 135 140

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

Asp Gly Phe Met Arg Ser Ile Ala Arg Glu Leu Gly Pro Gln Gly Ile

Ile Lys Gly Trp Val Glu Pro Glu Ala Ile Gly Asp Ala Ile Leu Phe
 210 215 220

Leu Ala Thr Ser Asn His Ile Thr Gly Thr Ile Thr Val Ile Asp Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Ser Ala

<210> 14
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 假絲酵母屬(Candida sp.)

<400> 14

Met Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Pro Leu Asn Ala Leu Val Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Ile Gly Glu Val Ile Ser Leu Gln Leu Ala Asn Glu
 20 25 30

Gly Tyr Asn Val Thr Leu Ala Ala Arg Ser Leu Asp Asp Leu Asn Ala
 35 40 45

Val Lys Ala Lys Leu Pro Ile Val Arg Asp Ala Gln Lys His Ser Val
 50 55 60

Trp Pro Leu Asp Ile Ser Asp Ile Asp Ala Val Thr Asn Phe Lys Gly
 65 70 75 80

Ser Pro Leu Pro Ala Glu Lys Tyr Asp Leu Phe Val Ser Asn Ala Gly
 85 90 95

Val Val Asp Phe Ala Pro Leu Val His Gln Ser Pro Glu Ser Ile Ser
 100 105 110

Ser Leu Phe Asn Val Asn Leu Ile Ala Pro Val Ala Leu Thr Lys Ala
 115 120 125

Leu Leu Lys Ala Phe Gly Asp Ser Pro Arg Lys Thr Thr Thr His Phe
 130 135 140

Ile Tyr Val Ser Ser Val Val Ala Leu Arg Gly Phe Pro Asn Val Ala
 145 150 155 160

Val Tyr Ser Ser Ser Lys Ser Gly Leu Asp Gly Phe Val Arg Ser Leu
 165 170 175

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

Gly Pro Thr Lys Thr Glu Met Thr Ala Ser Leu Asp Val Glu Ala Phe
 195 200 205

Thr Ala Gly Asn Pro Ile Lys Gly Trp Ile Tyr Pro Asp Ala Ile Ala
 210 215 220

Asp Gly Val Val Tyr Leu Ala Lys Ser Lys Asn Ile Thr Gly Ile Thr
 225 230 235 240

Leu Gln Val Asp Asn Gly Ala Gly Ile
 245

<210> 15
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> 毒假絲酵母(Candida vaccinii)

<400> 15

Met Arg Ser Thr Pro Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Ala Ile Lys Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ser Val Thr
 20 25 30

Leu Ala Ser Arg Gly Leu Asp Lys Leu Asn Glu Val Lys Ala Lys Leu
 35 40 45

Pro Val Val Lys Gln Gly Gln Glu His His Val Trp Gln Leu Asp Leu
 50 55 60

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

Ser Lys Tyr Asp Leu Phe Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Thr Phe Ser
 85 90 95

Pro Thr Ala Glu His Asp Asp Lys Asp Trp Gln Asn Ile Ile Ala Val
 100 105 110

Asn Leu Thr Ser Pro Ile Ala Ile Thr Lys Ala Leu Val Lys Ala Val
 115 120 125

Gly Glu Arg Ser Asn Asp Asn Pro Phe Gln Ile Ala Phe Leu Ser Ser
 130 135 140

Ala Ala Ala Leu Arg Gly Val Pro Gln Thr Ala Val Tyr Ser Ala Thr
 145 150 155 160

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

Pro Lys Gly Ile His Val Asn Ile Val His Pro Gly Trp Thr Gln Thr
 180 185 190

Glu Met Thr Ala Gly Val Asp Glu Pro Arg Asp Thr Pro Ile Pro Gly
 195 200 205

Trp Ile Gln Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Ile Val Tyr Leu Ala Lys
 210 215 220

Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Ile

<210> 16
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 16
 atgaacgctc tagtgaccgg tggtagccgt ggcatlggcg aggcgatcgc gaccaagctg 60
 gccgaagatg gctacacgct gacaatcgcc tcgcgcgga tgcgtcagct caacaaggta 120
 aaggctaacc ttccggttgt gagggagggc cagaccacc acgtgtggca gcttgatttg 180
 agcgacgccg aggcgcgctc gtccttcaag ggcgctcctt tgccagcaag cagctacgat 240
 gtccttgta acaacgccgg agtaacgat ccgagtcca ttgcgaagca gtcggatagc 300
 gagattcaca agctgtttag cgtgaatctg ctgtcaccag ttgctttgac aaagacgtac 360
 gtccaggcgg ttaccggaaa gccctgtgag acgccagctc acattatitit tatctctgta 420
 ggcgttgcca ttgaggcta cccaaacgctc gctgtatact cggctactaa gagcgggctc 480
 gacggtttca tgaggctctt ggcgcgag cttggccccg agggcgtcca tglgaacact 540
 gtcagccccg gtctaccaa aaccgagatg gccagcggcg tcagcctcga cgacttcccc 600
 ccatcggcga ttgggggctg gatccagccc gaggccatcg ctgatgcagt gaggtacctg 660
 tgaagtcca agaacatcac aggcacgatt ctgtcagttg acaacggaat cacggtttaa 720

<210> 17
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 17
 atgccttcta ctctgaacgc tcttgcact ggcggcagtc gcggatttgg cgaggctacc 60
 gcagtgaagc tcgccgagga gggctacggt atcacacttg ctgcgcgca tatcaaaaaa 120
 ctgaatgacg tgaaggcca actaccaca atcaagcagg gtcaagagca ccacgtctgg 180
 cagcttgact tgccgatgt gcaggctgcg cttgagctca agggcgcacc actgcctgcg 240
 agcaagtacg acctgttggc cgcgatgcg ggcgtttccg cacacgttcc tacggccgag 300
 cacgacgatg cgactggca gaacgtcata actatcaact tgagctcgca gattgcgctc 360
 acgcaggccc tagttagggc cattggcgag aggtctgatg aagcgcctit ccacattgtg 420
 tatgtgtcct cgatcgccgc cctgcgagg aacccatga gcgcggtgta cagtgcctcg 480
 aaggccggac ttgatggatt tgctcgttcc atctctcgcg agctcggccc gaagggtatt 540
 catgtgaata cgggtgcacc gggactcacg aagacggaca tgaccgttcg catgcccct 600
 gctgaggacc agccgatcaa gggctgggta ctgcccgatg caattgctga tgccgttg 660
 ttctcgcga agtcaaaaa catcacgggc acaacatcg ttgtcgaaa cggccgggtg 720
 gtctaa 726

<210> 18
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> 草原地假絲酵母(*Candida geochares*)

<400> 18
 atgtctctg tacctgcctc ttctctctt tcttccccta ccttgaacgc acttgtcaca 60

ggcgccagcc gcggtattgg cgaggccact gccattcagc tggcctcgca gggatacagc 120
 gtcacgcttg cttctcgtgg gcttgagcag ctgaaagctg tgaaggcaaa gcttccctta 180
 gttagacagg gtcagacgca ccacgtgtgg cagctggatc tcgcagatgt cgcagccgct 240
 gggctcttca agggcgcacc gctgccggct agcagctacg acgtgctcgt gagtaatgcc 300
 ggggttgccc tattttcgcc catcgggtgac caggccgacg aagattggca acggatgctt 360
 gctgtcaacc taacgagtcc cattgccctc accaaggcgt tggtaaggc catcggccgac 420
 aagcctcgcg agaaccctgc ccatatcatt ttcgtttcgt cggctgtgtc actgctgga 480
 tatccgcttg tcggcgata cagcgcgacg aaggctggcc tcgatggctt cacacgctcc 540
 ctggctcagc agcttgggcc taagcgcacg catgtcaaca ccgtcaatcc cggcctcact 600
 aagaccgaga tggcgaaga tgcgaactc gattcgtttg gtgggaacgt cccgatcagt 660
 ggctggattc aagtcgacgc aatcgccgac gcagtgctgt tcttggtaaa ttcaagaat 720
 atcactggta ccagtcctgt tgttgacaat ggcatctcgg ttttag 765

<210> 19
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 19
 atgaacgcgt tagtgaccgg cggaagccgc gggatcggcg aggccacggc catacagctg 60
 gctcaggagg gctacggtgt gacattggtt gcgcgaggag cccgccagct caatgaagtg 120
 ttggcaaaag taccagttgt gagagacgga cagacgcacc acatttgga gctagatctg 180
 agcgatcctg aggcggccgc tgccttcagg ggtgctcctt tgcccggcag cagctacgac 240
 gtgtgatca ataacgcagg tgttagtagt ctcagcccgt tcgtcgcgca gtctgatgag 300
 gtccagaaaa ctattttagc ggtgaatctt ttgtcgccaa tcgcttgac gaaggcgttc 360
 gtgaaggcag cgggtggcaa gcccgctgag aggccggcgc atatcatttt catctcttcg 420
 ggcgctgccc tgcgcggttt cgcaaatg gcagtgata gtgcaacgaa aggcggcctt 480
 gacagtttca tgcgctcgt agctagagag ctaggcccc agggcatcca cgtcaactca 540
 gtcaatccgg gctttactga aacagaaatg acagccacta cagatttgaa tgactacccc 600
 ccgaccccca ttgaggctg gattcagcct cgcgcaatcg ccgacgctat acttttcta 660
 ctgaagtcca gaaacatcac tggcacaat gtgaccgtcg acaacggcat cactgtttga 720

<210> 20
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> 嗜木聚糖紅色桿菌(*Rubrobacter xylanophilus*)

<400> 20
 atgctcgagg ggaaggtcgc ggtcatcacg ggggccggca gcggcatagg ccgggccacc 60
 gcgctcaggt tcgcccgcga aggggcccgg gtggtcgtgg cggagctcga cgagcggagg 120
 ggggaggagg tcgtccggga gatcctcgag tccggcgggg aggccgtctt cgtgaggacg 180
 gacgtctcgg agttcgagca ggttagggcc gccgtcagc gcgccgtcga ggagtacggg 240
 acgttgagc tcatgttcaa caaccccgc atcgggcaact acgccccct gctggagcac 300
 gaccggagc actacgaccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata 360
 ctcgccgccc gcaggaagat ggccgagctg gagaacccc gcgtgatcat caacaccgcc 420

tcggtctacg ctttctggc ctccccggt gtgatcggct atcacgcttc caagggggcg 480
 gtgaagatga tgaccaggc cgcagccctg gagctcgccc cccacggcat acgggtcgtc 540
 gccatcgccc cgggcggggt ggacaccccg atcatccagg gctacaagga catgggcctc 600
 ggtgagcggc tggcccggg ccagatgcgt cgcaggctcc agaccccga gcagatcgcc 660
 ggcgcccgtc tcctgctcgc caccgaggag gcagacgcca taaacggctc ggtggtgatg 720
 accgacgacg gctacgagg gttcaagtaa 750

<210> 21
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> 嗜極熱地芽孢桿菌(*Geobacillus kaustophilus*)

<400> 21
 atgaggctaa aaggaaaagc ggcgattgac accggcggcg cgagcggcat cggccgggcg 60
 acggcgattc gctttcgga agaaggcgc aaagtggcgg tgagcagat caatgaggaa 120
 ggaggggaag aaacggtccg cctgattcgg gaaaaaggag gggagcggat tttgtccaa 180
 acggacgtag ccgattccaa gcaagtgagc cgccttgtcc aaacggcggg tgatgccttt 240
 ggcggcctac atattctctt taacaatgcc ggcatcggcc attcggaggt gcggagcacc 300
 gacttgtctg aagaagagtg ggaccgggac atcaacgta atttgaagg agtgttcctt 360
 ggcatcaaat acgcggtgcc cgtgatgaag caatgcggtg gcggggccat tgtcaacaca 420
 tcgagcctgc ttggaatcaa agggaaaaag tacgaatcgg cctacaacgc ctgaaaggcc 480
 ggggtgattt tgttgacgaa aatgcagca ttggaatatg ggaagttaa cattcgcgtc 540
 aatgccattg caccgggggt cattgatagc aacatcatca cggcgtggaa acaagatgag 600
 cgcaaatggc cgatcatttc gaaagcgaac gccctcggcc gcatcgggac gccagaggaa 660
 gtggcgaacg cgggtgtgtt tttggcgtcc gatgaagcgt cgtttatcac cggcgcgaca 720
 ttgtcggtcg acggcggcgg gctgacgttt tag 753

<210> 22
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> 橘色綠絲菌(*Chloroflexus aurantiacus*)

<400> 22
 atggagccac ctttcattgg gaaggttgcg ctggtcaccg gcgcagcagc cggtattggt 60
 cgtgcttcag cactggcgtt tgcccgtgag ggtgccaagg ttgtcgttgc tgatgtgaat 120
 gtcgagggcg ggaagagac gattcgcgtg tgcgggctt tgaataccga tgcaatgtc 180
 gtgcgttgtg atgtttcgca acgcgatgaa gtggagcgt taattgctct ggcagttgac 240
 acgttcggte ggatcgactt tgcgcacaac aacgccggga ttgaaggcgt gcaggcaatg 300
 ctggccgatt atcccgaaga ggtctgggat cgggtgatcg agatcaacct caaaggggtc 360
 tggttgtgta tgaagtacga aatccggcac atgctcaagc aggggtggcg tgcgattgtg 420
 aatacctcat cggtcgcccg tctggccgga tcacgtggcg tttcggcgta ttagccagc 480
 aagcacggta ttgttggtat taccaaagcg gcagcccttg agtatgcgcg taacggtatt 540
 cgtgtcaacg caatctgtcc aggtacgatt catactgca tgatcgaccg ctttaccag 600
 ggtgatccc aactgcttgc ccagttcgt gagggatgaac cgattggtcg gtcggtcgc 660
 cctgaagagg tcgccaatgc ggtgatctgg ctctgctcag ataaggcttc gtttggacc 720

ggagcgacac tggcggttga tggtagccgc ctggcgtaa 759

<210> 23
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 23
 atgacatcta cacctaatgc cctcatcagc ggaggcagcc gcggcattgg cgcttccgcc 60
 gccatcaaac tggctcaaga aggttacagc gtcacgctgg cgtcccgcga ccttgagaaa 120
 cttactgagg tcaaggacaa gctgccaatc gtgagagggt gacagaaaca ctacgtttgg 180
 cagctcgatc ttgccgatgt ggaggctgca tcgtctttca aggcggctcc tctgccggcc 240
 agcagctacg atttgtttgt ttcgaacgcc ggaattgcc agttctcgcc tacggcagag 300
 catactaata gtgagtggct gaacattatg accattaact tagtgtcccc gattgccctg 360
 acgaaggctc ttttgacaggc cgtttctggg aggtcgagcg agaaccggtt tcagatcgtc 420
 ttcatctcgt cggttgcagc actacgtggc gttgcacaaa cggccgtcta cagtgcgtcg 480
 aaggctggta ctgatggatt cgcacgctca cttgctcgcg aactaggctc tcaaggtgtt 540
 catgtgaacg tggtgaaccc tggctggact aagacagaca tgacggaagg agtcgaaacc 600
 ccaaaggaca tgcccattaa gggctggatc cagcctgagg caattgctga tgctgtagta 660
 ttcttgcga ggtcgaaaaa cattaccggc gcgaatattg tagtgacaaa tggtttctcg 720
 acgtaa 726

<210> 24
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 24
 atgacgacta cttcaaacgc gcttgtcact ggaggcagcc gcggcattgg cgctgcctcc 60
 gccattaagc tggctcagga gggctacaat gttacgctgg cctctcgag tgttgataaa 120
 ctgaatgaag taaaggcgaa actcccaatt gtacaggacg ggcagaagca ctacatttgg 180
 gaactcgatc tggctgatgt ggaagctgct tcgtcgttca aggtgtctcc tttgcctgct 240
 cgcagctacg acgtctttgt ttcgaacgcg ggcgtcgtcg cgttctcgcc cacagccgac 300
 cacgatgata aggagtggca gaacttgctt gccgtgaact tgtcgtcgcc cattgccctc 360
 acgaaggccc tcttgaagga tgtctccgaa aggcctgtgg acaagccact gcagattatc 420
 tacatttctg cggtagccgg cttgcatggc gccgcgagc tcgcccgtga cagtgcattc 480
 aaggccggtc ttgatggttt tatgcgctcc gtcgccctg aggtgggccc gaaggcctc 540
 catgtgaact ccatcaaccc cggatacacg aagactgaaa tgaccgaggc cattgaagcc 600
 cttctgatt tgccatcaaa ggggtggatc gagcccagg caattgctga cgcggttctg 660
 tttctggcaa agtccaagaa taccaccggc acaaacattg tggtagacaa tggcttgatt 720
 gcttaa 726

<210> 25
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 25
 atgtcttate aaatgtcttc ttctgtcca tcctccacct ccctgaatgc gcttgtcacg 60

ggcgagcc gcgccattgg cgaagccact gccattaagc tcgcccagga gggctacagc 120
 gtcacgattg cgtctcgcgg ccttaagcag ctcgaggctg tgaaggccaa actaccatt 180
 gtgaagcagg gacaggttca ccacgtgtgg cagcttgatc tcagtgatgt cgacgctgcg 240
 gccgccttca aagggtcgcc gctacctgcc agccgctacg acgtgctcgt cagcaatgct 300
 ggctggccc agtttagccc gttcatcgag catgcgaagc aggactggtc gcagatgctt 360
 gccatcaatc tggcggcacc cattgcgctg gccagacat ttgctaaggc cattggcgac 420
 aagccgcgca acacaccggc ccacattgtg ttgtctcgt cgaacgtctc gttgcgagc 480
 ttcccgaaca tcggcgtcta cacggccacg aaagccggca ttgacggctt catgcgctcg 540
 gtcgcacgcg aactggggcc cagcggcatt aacgtgaact ccgtgaacct cgggcccacg 600
 cggacggaga tgacgaaggc cattgacgtc ggacgatcg atatgccgat caagggtgg 660
 atcgagcccg aggcgattgc ggatgccgtg ctcttcgtgg tcaagtcgaa gaacattacc 720
 ggacgacccg ttgttgcga caacggctcc tccgcttga 759

<210> 26
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 26
 atgaccacct cctccacctc ctctccacc tcttcccgt ctctaaagc tcttgcacc 60
 ggcgctagcc gcgccattgg cgaggccact gcaatcaagc tagcatctga gggatacagc 120
 gttacgcttg catctcgtag cctcgagcag ctcaaggctt tgaaggagaa gttgccctt 180
 gtgaagcagg gccagacgca ccacgtctgg cagctcgact tgagcgacgt cgacgccgt 240
 gccacgttca agggctcccc ctgtccggcc agcagctacg acgccgtcat cagcaatgcc 300
 ggtgttgcct agttctctcc gttgtcggaa cacgccaggg aggactggtc tcagatgctg 360
 acgatcaacc tcgcccctcc cattgccctc gcgcaggcgt ttgtgaaggc cattggcgac 420
 aagaagcgcg acatcccggc ccaaatgtc ttgtttcgt cgaatgtcgt gatgcgtggc 480
 ctcccttacc tcggcatcta cacggcttcg aaggctgcta tcgatggctt catgcgctcg 540
 gccgcccgcg agctgggacc caagggtatc aacgtgaact cagtaaaccc gggcggccacg 600
 cagaccgaga tgacgaaggc cgttgatgtc aaccccctcg acctgccgat caagggatgg 660
 attcagctcg aggtgtcgc ggacgccgtg ctcttcgtgg tccagtcgaa gaacattacc 720
 ggacgacgca ttgttgcga caacggctcc gtcgcttga 759

<210> 27
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> 木蘭假絲酵母(*Candida magnoliae*)

<400> 27
 atgaatgcct tagttactgg tgcgagccgc gggatcggcg aagcaattgc ggtgaagctg 60
 gccgaggacg ggtacagcgt gacactggcc tcgctctc ttgaaaagct ggagtcgctc 120
 aagaaaggcg tccggctcgt gaaggacggc caagcacatc atgtatggga gcttgcctc 180
 ggtgatgitt atgccgctc atccttcaag gggcgcctc tgcctgccga ggctatgac 240
 gtgtctgca gtaacgctgg aatggccaaa tccaccttga tggtagacca tccattgac 300
 gagctgcagg acatgattaa cgtgaatcct gtgtcgcaa ttgactcac acaggcctt 360

gtcaaggctc tgacagaatc taagcgagac aagcctgcgc atatcgtgtt catgicgtcc 420
 atccgctcgt tcaggggcat tccgaatggc gcggtgtaca gccccacaaa gagtgggtctt 480
 gacggattca tgcgatccat tgcgcgagag ctgggcccic agggcatcca cgtcaactct 540
 gtgtgccccg gattcgtgca aacggaaatg acgcgcaagg ttgatatgga gtcgaagaaa 600
 gaccagctac ccatcgccgg ctggatccag cccgacgcga ttgctgacac cgttctgttt 660
 tttgtgaaat cgaagaacat cacgggccag gcaattgtcg ttgacaatgg catcactgtc 720
 tga 723

<210> 28
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Gropengiesseri氏假絲酵母(*Candida gropengiesseri*)

<400> 28
 atgccctctg gactcaatgc tcttgtcact ggccgcagcc gcggaatcgg cgctgccgct 60
 gtaccaagc tcgccgctgc aggatacaac gtcacggttg cgtcccgcgg ggtcgaggct 120
 ctgaataagg tcaaggcctc cttgcctgtt gtcaaggagg gccagcagca ccatgtctgg 180
 cagctcgacg taagcgatct cgcagcggtg tctggcttca agggatctcc gctgccggct 240
 aagagctiac atgttgttgt tgttaacgcc ggctgcgca acctgagccc gctggctgcc 300
 caggacgacg acgtcattca gaacattgtg accgtgaacc tgctgtcggc gattgcgctg 360
 gtgaagtgcg tgatcaaggc gtacggcgag ggtcctcgcg cgacaccggc ccacattgtg 420
 tttgtgtcgt cgggtggccgc gatccgtggg ttccccaac gcgccgtcta tagctcgacg 480
 aagagtgcg tcgacgggct gacgcggtcg ctggcgaagg agctggggcc ccagaacatc 540
 cgggtcaact ccgtgaacce cggcttcacg aggaccgagc tgccagcggc cgtcgacatt 600
 gacgccgta cgacagctc tccgatcaag ggggtgggtt agccggaggc gattggcgat 660
 gcgattttgt ttctcgcgac gtcgaaccac atcacgggca cgatcaccgt catcgacaac 720
 ggcactagcg cgtag 735

<210> 29
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> 假絲酵母屬(*Candida* sp.)

<400> 29
 atgtcctcct cttcctcctc gactcctctc aacgctctcg tcaccgggtgc cagccgcggc 60
 atcgggtgagg tcattctctc ccagctcgcc aacgagggtt acaatgttac cctcgagcc 120
 cgcagtcttg acgacctcaa tgcggtgaag gctaagctcc ctatcgttaag ggatgccag 180
 aagcactctg tctggccgct cgacattagc gatatcgacg ccgtgacgaa cttcaaggga 240
 tcgccccctg cggccgagaa gtacgatctg ttctcagca acgccggcgt ggtcgacttc 300
 gctccgcttg tccaccagag ccccgagagc atcagcagcc tgttcaatgt gaacctaatc 360
 gcgctgttg ccttgacaaa agctcttctt aaggcgttcg gtgacagccc tcgcaagact 420
 acgactcact ttatctacgt ttctcctgtt gttgccctcc gcggcttccc caatgttgcg 480
 gtttacagct cctccaagag cggcctcgac gggtttgtgc gctcccttgc cgccgaggtt 540
 gctccgctca acatccgct caactccatt aaccagggc ctaccaagac tgagatgacc 600
 gcttccctgg atgttaggc gtttactcgc ggcaacccca tcaagggttg gatttacc 660

gatgctattg ctgatggagt ggtgtacctg gcgaagtcca agaacattac tggatcacc 720
 ctccaagtcg acaacggcgc cggcatctaa 750

<210> 30
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> 莓假絲酵母(Candida vaccinii)

<400> 30
 atgaggtcga cacctaacgc ccttgtgact ggccggcagcc gcggcattgg cgcggccgct 60
 gcaattaaac tcgccgaggc aggctacagc gtgacgctcg cgtcgcgagg tctcgacaag 120
 ctcaacgagg tgaaggccaa gcttctctgc gtgaagcagg gccaggagca ccatgtatgg 180
 cagcttgatc tcagcgacgt gcaggccgcg ctcgagtcca agggcgccacc gctgcccgcg 240
 agtaagtagc attgtttgt ctcgaacgcc ggctgggcta ctttctcgcc aacggctgag 300
 catgacgaca aggactggca gaacattatt gccgtgaact tgacatcgcc cattgccatt 360
 acgaaggcgc tcgtaaggc cgttggcgag cgctcaaacg ataaccggtt tcagatcgcg 420
 ttctgtcat cggcggcccgc cctgcgcggt gtgccgcaga ccgctgttta cagcgtctacg 480
 aaggcccgcc tcgacggctt cagcgcctcg ctcgccaagg agctcggccc aaagggcacg 540
 catgtgaaca tcgtacacc tggatggacg cagaccgaga tgactcgggg tgtagatgag 600
 cctagggata cgcccatccc gggctggatc cagccggaag ccatcgccga ggccattgtg 660
 tatctcgga agtcaaagaa catcacggga acgaacatcg ttgtcgaaa cggcctgact 720
 atttaa 726

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 部分胺基酸序列

<400> 31

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

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 部分胺基酸序列

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 部分胺基酸序列

<400> 33

Gly Tyr Ser Val Thr
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 34

Gly Tyr Asn Val Thr
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 35

Gly Tyr Gly Ile Thr Leu
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 36

Val Leu Ala Lys Leu Pro
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 37

Val Lys Ala Lys Leu Pro
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 38

Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 39

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 39

Phe Arg Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 40

Leu Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 41

Ser Pro Ile Ala Leu Thr Lys
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 42

Ser Pro Val Ala Leu Thr Lys
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 43

Ser Gln Ile Ala Leu Thr Gln
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 44

Ala Val Tyr Ser Ala Ser Lys
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分氨基酸序列

<400> 45

Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分氨基酸序列

<400> 46

Gly Val Tyr Ser Ala Thr Lys
1 5

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分氨基酸序列

<400> 47

Pro Ile Lys Gly Trp Ile
1 5

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分氨基酸序列

<400> 48

Pro Ile Glu Gly Trp Ile
1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分氨基酸序列

<400> 49

Pro Ile Gly Gly Trp Ile
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 50

Pro Ile Ser Gly Trp Ile
1 5

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 51

Gly Tyr Gly Val Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 52

Phe Lys Ala Ala Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 53

Phe Lys Gly Ser Pro Leu Pro Ala
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 54

Gly Ile Gly Arg Ala Thr
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 55

Gly Ile Gly Arg Ala Ser Ala
1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 56

Gly Ile Gly Arg Glu Thr
1 5

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 57

Asn Asn Ala Gly Ile Gly
1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 58

Asn Asn Ala Gly Ile Glu Gly
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 59

Ile Arg Val Val Ala Ile Ala Pro Gly
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 60

Ile Arg Val Asn Ala Ile Ala Pro Gly

1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 61

Ile Arg Val Asn Ala Ile Cys Pro Gly
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 62

Ile Arg Val Val Gly Ile Ala Pro Gly
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 63

Pro Glu Gln Ile Ala Gly Ala Val
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 64

Pro Glu Ala Ile Ala Asn Ala Val
1 5

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 部分氨基酸序列

<400> 65

Pro Glu Glu Val Ala Asn Ala Val
1 5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 部分胺基酸序列

<400> 66

Pro Glu Ala Ile Ala Asn Ala Val
1 5

<210> 67

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 67

gggaattcca tatgatgctc gaggggaagg tcg 33

<210> 68

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 68

cacatgcatg cgaatgctcg aggggaaggt c 31

<210> 69

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 69

cccaagctta ttacttgaac tccgcgtagc cgtc 34

<210> 70

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 來自嗜木聚糖紅色桿菌(Rubrobacter xylanophilus)的半合成基因序列

<400> 70

atgctggaag glaaagtggc agtcatcacc ggtgcaggca gcggcattgg gcgtgccact 60

gcgctgcgtt ttgcgcgtga aggcgctcgc gtcgttgtgg ccgagctgga tgaacgtcgc 120

ggtgaggaag ttgtacctga gattctggaa tctggcgggg aggccgtctt cgtgaggacg 180

gacgtctcgg agttcgagca ggtttaggcc gccgtcgagc gcgccgtcga ggagtacggg 240

acgttgagc tcatgttcaa caacccggc atcgggcact acgccccct gctggagcac 300

gaccggagc actacgaccg ggtggtccgg gtgaaccagt acggcgtcta ctacgggata 360

ctcgcgcccg gcaggaagat ggccgagctg gagaacccc gcgtgatcat caacaccgcc 420

tcggtctacg ctttcttggc ctccccggg gtgatcggct atcacgcttc caagggggcg 480

gtgaagatga tgaccaggc cgcagccctg gagctcgccc cccacggcat acgggtcgtc 540

gccatcgccc cgggcggggg ggacacccc atcatccagg gctacaagga catgggcctc 600

ggtgagcggc tggcccgcgg ccagatgcgt cgcaggctcc agacccccga gcagatcgcc 660
 ggcgccgtcg tccigctcgc caccgaggag gcagacgcca taaacggctc ggtggtgatg 720
 accgacgacg gctacgcgga gttcaagtaa 750

<210> 71
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 71
 cctagctagc atgctggaag gtaaagtggc 30

<210> 72
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 72
 cctttcctg chagcagcta yg 22

<210> 73
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 73
 ggctggatcc agcccttrat sgg 23

<210> 74
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 74
 ggaattccat atgatgaacg ctctagtgac cggtggtag 39

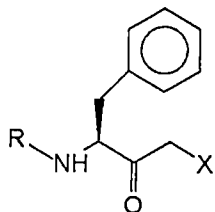
<210> 75
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 75
 cccaagcitta ttaaaccgtg attccgttgt caactgac 38

十、申請專利範圍

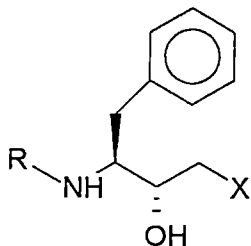
1. 一種用於對映異構選擇性酶催化還原通式 I 之酮基化合物



(I)

(其中 R 代表任何用於胺基官能之保護基(第三丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基、9-苄基甲氧羰基)且 X=-Cl、-CN、-OH、Br 或 F)

成通式 II 之羥基化合物(R,S-化合物)



(II)

(其中 R 和 X 具有如式 I 中之相同意義)之方法，
該方法之特徵在於

該酮基化合物係在輔因子之存在下經氧化還原酶還原

；

該用於還原成通式 II 之羥基化合物之氧化還原酶由下列所組成：

a) 如 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3
或 SEQ ID NO : 4 之胺基酸序列，或

b)係由核酸序列 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所編碼之胺基酸序列，或

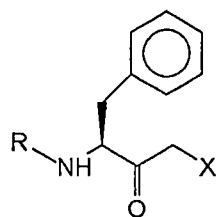
c)係由一核酸序列所編碼之胺基酸序列，該核酸序列係在 0.7-1M NaCl 溶液中於 60°C 下雜交、再接以 0.1 至 2 倍之 SSC 溶液、於 65°C 下的清洗濾膜的嚴格條件下與 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 雜交，其中 1 倍 SSC 溶液係為由 150 mM NaCl 及 15 mM 檸檬酸鈉組成的混合物；

其中存在於反應批中之式 I 化合物的濃度為 >20 克/升；

所形成之經氧化的輔因子 NAD 或 NADP 係經由氧化通式 R_xR_yCHOH 之二級醇而持續再生，其中 R_x 和 R_y 係獨立地代表支鏈型或非支鏈型 C_1-C_8 烷基且 $C_{總數} \geq 3$ ；且

其中該 TTN(總週轉數=被還原之式 I 化合物的莫耳數/所使用之輔因子的莫耳數)係 $>10^3$ 。

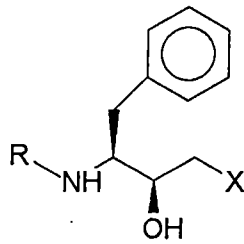
2.一種用於對映異構選擇性酶催化還原通式 I 之酮基化合物



(I)

(其中 R 代表任何用於胺基官能之保護基(第三丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基、9-芴基甲氧羰基)且 $X = -Cl$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-Br$ 或 $-F$)

成通式 III 之羥基化合物 (S,S-化合物)



(III)

(其中 R 和 X 具有如式 I 中之相同意義) 之方法，

該方法之特徵在於

該酮基化合物係在輔因子之存在下經氧化還原酶還原；

該用於還原成通式 III 之羥基化合物之氧化還原酶由下列所組成：

d) 如 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、或 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列，或

e) 係由核酸序列 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:30 所編碼之胺基酸序列，或

f) 係由一核酸序列所編碼之胺基酸序列，該核酸序列係在 0.7-1M NaCl 溶液中於 60°C 下雜交、再接以 0.1 至 2 倍之 SSC 溶液、於 65°C 下的清洗濾膜的嚴格條件下與 SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID

NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:30 雜交，其中 1 倍 SSC 溶液係為由 150 mM NaCl 及 15 mM 檸檬酸鈉組成的混合物；

其中存在於反應批中之式 I 化合物的濃度為 >20 克/升；

所形成之經氧化的輔因子 NAD 或 NADP 係經由氧化通式 R_xR_yCHOH 之二級醇而持續再生，其中 R_x 和 R_y 係獨立地代表支鏈型或非支鏈型 C_1-C_8 烷基且 $C_{總數} \geq 3$ ；且

其中該 TTN(總週轉數 = 被還原之式 I 化合物的莫耳數 / 所使用之輔因子的莫耳數)係 $>10^3$ 。

3.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 2-丙醇、2-丁醇、2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-庚醇或 2-辛醇係分別作為輔受質或二級醇。

4.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中 2-丙醇、2-丁醇、2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-庚醇或 2-辛醇係分別作為輔受質或二級醇。

5.如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中加入其他氧化還原酶/脫氫酶以利輔因子之再生。

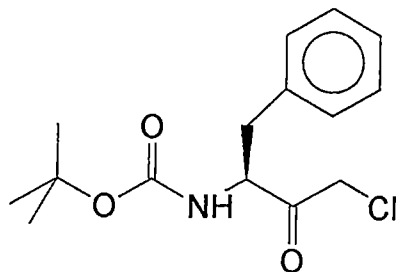
6.如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中存在於反應批中之式 I 化合物的濃度為 >50 克/升。

7.如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中存在於反應批中之式 I 化合物的濃度為 >100 克/升。

8.如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中係在水溶性有機雙相系統中進行。

9. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中係額外使用一種有機溶劑，係選自二乙醚、第三丁基甲醚、二異丙醚、二丁醚、醋酸乙酯、醋酸丁酯、庚烷、己烷或環己烷。

10. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之方法，其中使用特定之式 IV 化合物以作為酮基化合物



(IV)

11. 一種多肽，其係選自由胺基酸序列 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14 及 SEQ ID NO：15 所組成之群組，且其在輔因子之存在下還原通式 I 酮基化合物(於反應批中之濃度為 >20 克/升)成通式 II 或 III 之羥基化合物，而所形成之經氧化的輔因子 NADP 係經由氧化通式 R_xR_yCHOH 之二級醇而持續再生，其中 R_x 和 R_y 係獨立地代表支鏈型或非支鏈型 C₁-C₈ 烷基且 C_{總數} ≥ 3；且其中該輔因子的總週轉數係 >10³。

12. 一種多肽，其係由與選自由胺基酸序列 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3、SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、

SEQ ID NO: 14 及 SEQ ID NO: 15 所組成之群組至少 85% 相同的胺基酸序列組成，且其在輔因子之存在下還原通式 I 酮基化合物(於反應批中之濃度為 >20 克/升)成通式 II 或 III 之羥基化合物，而所形成之經氧化的輔因子 NADP 係經由氧化通式 R_xR_yCHOH 之二級醇而持續再生，其中 R_x 和 R_y 係獨立地代表支鏈型或非支鏈型 C_1-C_8 烷基且 $C_{總數} \geq 3$ ；且其中該輔因子的總週轉數係 $>10^3$ 。

13. 一種多肽，其由胺基酸序列組成，該胺基酸序列係選自由核酸序列 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 及 SEQ ID NO: 30 所組成之群組所編碼；且該多肽在輔因子之存在下還原通式 I 酮基化合物(於反應批中之濃度為 >20 克/升)成通式 II 或 III 之羥基化合物，而所形成之經氧化的輔因子 NADP 係經由氧化通式 R_xR_yCHOH 之二級醇而持續再生，其中 R_x 和 R_y 係獨立地代表支鏈型或非支鏈型 C_1-C_8 烷基且 $C_{總數} \geq 3$ ；且其中該輔因子的總週轉數係 $>10^3$ 。