



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112930402 A

(43) 申请公布日 2021.06.08

(21) 申请号 201980071459.1

(22) 申请日 2019.09.26

(30) 优先权数据

62/736,558 2018.09.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/053170 2019.09.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/069139 EN 2020.04.02

(71) 申请人 卡拉马祖控股股份有限公司

地址 美国密歇根

(72) 发明人 K·惠伦 D·R·伯达尔

B·P·巴芬 M·B·琼斯

K·威廉斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 刘晓东

(51) Int.Cl.

C12P 7/50 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

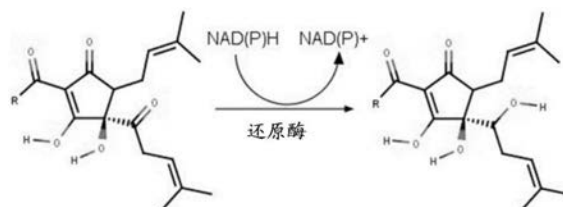
序列表25页 附图4页

(54) 发明名称

改性啤酒花产品的酶法生产

(57) 摘要

本发明涉及用于通过酶催化啤酒花衍生的异α酸生物转化为二氢-(ρ)-异α酸来产生啤酒苦味剂的方法,以及可用于这种方法的新型酶催化剂。



1. 一种用于制备二氢-(ρ)-异 α 酸的方法,所述方法包括用酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物处理异 α 酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法在含水系统中进行。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述方法在温和的温度和pH条件下进行。

4. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括将所述酮还原酶和NADPH或NADP加入到异 α 酸的混合物中,然后进行孵育。

5. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括在用于辅因子循环的异丙醇存在下,将所述酮还原酶和NADPH或NADP加入到异 α 酸的混合物中,然后进行孵育。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中将异 α 酸即底物的浓度最大化以增加生物转化的体积生产率。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中将所述混合物中所述辅因子NADPH或NADP的浓度最小化以提高所述生物转化的经济性。

8. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括在用于辅因子循环的另一种酶存在的情况下,将所述酮还原酶和NADPH或NADP加入到异 α 酸的混合物中,然后进行孵育。

9. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括将全细胞生物催化剂加入到异 α 酸的混合物中,然后进行孵育,其中所述全细胞生物催化剂是表达编码酮还原酶的基因的固定化微生物。

10. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括培养表达编码所述酮还原酶的基因的微生物和向所述培养物中添加异 α 酸。

11. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括将所述酮还原酶加入到异 α 酸的提取物中,其中所述酮还原酶是热稳定的,其中进行加热,并孵育所述混合物。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酮还原酶特异性还原顺-异葎草酮(cis-isohumulone)、顺-异合葎草酮(cis-isocohumulone)和顺-异粘果酮(cis-isoadhumulone)。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酮还原酶特异性还原反-异葎草酮、反-异合葎草酮和反-异粘果酮。

14. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括以有效还原顺-和反-异 α 酸的混合物成为其各自的二氢异 α 酸的量加入2种或更多种酮还原酶的混合物。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中2种或更多种酮还原酶的所述混合物产生独特的二氢异 α 酸混合物,所述混合物不同于通过化学还原剂诸如硼氢化钠产生的混合物。

16. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中所述酮还原酶包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶相比,可以任选地在氨基酸残基处具有一个或多个差异。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述酮还原酶与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ

ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶具有99%、95%、90%、85%、80%、75%或70%的同源性。

19.一种酮还原酶,其包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

20.根据权利要求19所述的酮还原酶,其中所述酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶相比,可以任选地在氨基酸残基上具有一个或多个差异。

21.根据权利要求20所述的酮还原酶,其中所述酮还原酶与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶具有99%、95%、90%、85%、80%、75%或70%的同源性。

改性啤酒花产品的酶法生产

[0001] 序列表、表格或计算机程序的引用

[0002] 根据37 C.F.R. §1.821以计算机可读形式(CRF)通过EFS-Web以文件名KALSEC_76_PCT_Sequence_Listing_26_Sept_2019.txt同时提交的序列表通过引用并入本文。序列表的电子副本创建于2019年9月26日。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于通过啤酒花衍生的异 α 酸至二氢-(ρ)-异 α 酸的酶催化生物转化来生产啤酒苦味剂的方法以及可用于这种方法的新型酶催化剂。二氢-(ρ)-异 α 酸具有优良的特性,提高了作为饮料添加剂的效用。消费者可能更喜欢通过该方法生产的二氢-(ρ)-异 α 酸,所述方法不需要使用苛性的化学试剂,并且使用可以是天然存在的酶。

[0004] 发明背景

[0005] 常规啤酒苦味处理方法使用完全新鲜的啤酒花、完全干的啤酒花或在煮沸过程中加入的啤酒花颗粒。通过用超临界二氧化碳提取啤酒花制成的啤酒花提取物,或者是在催化剂存在的情况下加热啤酒花制成的异构化啤酒花颗粒,是最近的变苦创新,也已被啤酒酿造者采用。啤酒花颗粒也可以在酿造过程的后期添加,在加干啤酒花法(dry hopping)的情况下,将啤酒花在过滤之前添加到成品啤酒中。这些方法的缺点是啤酒花中存在的苦味化合物的利用率低,这不利地影响了成本。以这种方式生产的啤酒或其它麦芽饮料对光不稳定,必须包装在深棕色的瓶子或罐子中,或放置在避免光诱导形成3-甲基-2-丁烯-1-硫醇(3-MBT)的地方,后者会产生明显的漏过光的(light struck)或臭鼬的气味。将瓶子放在硬纸板盒中,或者用避光或滤光纸、箔片或塑料覆盖物完全包裹它们,是保护这些饮料免受漏过光的风味和气味(light-struck flavor and aroma)影响的另一种昂贵方法。

[0006] 常规酿造的啤酒中的苦味主要来源于异 α 酸。这些化合物是在酿造过程中通过葎草酮(humulones)的异构化形成的,葎草酮是啤酒花植物的蛇麻腺中天然存在的化合物。其结果是,鉴于异 α 酸对啤酒中的光化学反应的天然不稳定性,饮料易于形成漏过光的或臭鼬的风味和气味。

[0007] 使用所谓的高级或改良啤酒花酸可以制备完全光稳定的啤酒或其它麦芽饮料。使用这些苦味剂制成的啤酒可以装在无色的燧石玻璃瓶中,而不用担心会形成臭鼬气味。二氢-(ρ)-异 α 酸是异 α 酸的还原产物,其对光稳定。迄今为止,这些化合物尚未在自然界中发现。常规地,负责光化学的异 α 酸的部分已经通过使用硼氢化钠还原羰基而被改变。

[0008] 硼氢化钠是可用于还原酮的无机化合物。在皮肤接触、眼睛接触、吸入或摄入的情况下是极其危险的,口服LD50为160mg/kg(大鼠)。硼氢化钠也是易燃的、腐蚀性的,并且与氧化剂、酸、碱和水份具有极强的反应性(硼氢化钠;MSDS No.S9125;Sigma-Aldrich Co.: Saint Louis,MO,2015年11月1日)。

[0009] 消费者越来越倾向于使用天然材料,而不是合成或半合成材料。因此,不仅需要提供使用天然材料作为啤酒和其他饮料的苦味剂的组合物,还需要提供更天然地生产所述材

料的方法。

[0010] 生物催化生产是新兴技术,其提供高价值化合物的高选择性、安全、清洁和可扩大规模的生产。生物催化生产依靠于天然存在的酶来代替化学催化剂。

[0011] 酶是能够催化特定化学反应的天然蛋白质。酶存在于自然界中,目前能够在生产改性啤酒花苦味化合物中替代化学催化剂(Robinson,P.K.,Enzymes:principles and biotechnological applications.Essays Biochem 2015,59,1-41.)。

[0012] 葎草酮是天然的次生代谢物,其会暴露在与植物啤酒花(*Humulus lupulus*)共栖的真菌和细菌中。居于土壤和居于植物中的真菌和细菌可能具有能够修饰葎草酮以达到解毒或清除目的的酶。另外,生物体可能已经进化出酶来修饰类葎草酮分子,但由于混杂的活性,这些酶对目标化合物异 α 酸具有活性(Hult,K.;Berglund,P.,Enzyme promiscuity:mechanism and applications.Trends Biotechnol.2007,25(5),231-238;Nobeli,I.;Favia,A.D.;Thornton,J.M.,Protein promiscuity and its implications for biotechnology.Nat.Biotechnol.2009,27(2),157-167.)。

[0013] 催化氧化/还原反应(即氢和氧原子或电子从一种物质到另一种物质的转移)的酶被广泛地归类为氧化还原酶。更具体地说,将酮基还原为羟基的酶被称为酮还原酶或羰基还原酶,并且依赖于外源还原等效物(例如辅因子NADH、NADPH)的补充。与本文中表征的酶的现有命名一致,所述酶将被称为“酮还原酶”。

[0014] 昂贵的辅因子(NADH,NADPH)的成本可以通过包括用于辅因子再循环的另外的酶和底物(例如葡萄糖脱氢酶和葡萄糖),或者通过利用也能够氧化低成本和天然原料诸如乙醇的酮还原酶来降低。

[0015] 酶在啤酒酿造中的效用及其对啤酒最终特性的有利影响有着丰富的先例(Pozen,M.,Enzymes in Brewing.Ind.Eng.Chem,1934,26(11),1127-1133.)。已知,在啤酒的自然发酵中酵母酶的存在会产生影响最终饮料的风味和香气的化合物(Praet,T.;Opstaele,F.;Jaskula-Goiris,B.;Aerts,G.;De Cooman,L.,Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation.Cerevisia,2012,36,125-132.)。外源添加的酶为酿造过程提供了多种改进,诸如降低的粘度、增加的可发酵糖、防寒和澄清(Wallerstein,L.(1947)Bentonite and Proteolytic Enzyme Treatment of Beer,US Patent 2,433,411.;Ghionno,L.;Marconi,O.;Sileoni,V.;De Francesco,G.;Perretti,G.,Brewing with prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*:the impact of enzymatic treatment on gluten levels,quality attributes,and sensory profile.Int.J.Food Sci.Technol,2017,52(6),1367-1374.)。另外,啤酒花提取物已用于修饰啤酒花衍生的芳香化合物的酶专门地预处理(Gros,J.;Tran,T.T.H.;Collin,S.,Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop.J.Inst.Brew.2013,119(4),221-227.)。

[0016] 然而,在本发明之前,在自然界中还没有观察到能够催化异 α 酸还原为二氢-(ρ)-异 α 酸的酶,因此文献中也没有描述所述酶。本文公开的方法代表了新型酶促反应。

[0017] 发明目的

[0018] 本发明的目的是提供酶法生产二氢-(ρ)-异 α 酸的方法,所述异 α 酸是源自啤酒花植物的天然苦味剂的改进形式。本方法被设计成替代使用化学试剂硼氢化钠的现有生产方

法。本发明的另一个目的是提供可用于这种方法的新型酶催化剂。

发明内容

[0019] 本发明涉及可放大到工业水平以用于将异- α 酸生物转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的方法,所述二氢-(ρ)-异 α 酸可以在饮料中用作天然来源且光稳定的苦味剂。

[0020] 本发明的一个方面是利用酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物将异 α 酸高产率地生物转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的方法。

[0021] 本发明的另一方面涉及这样的用于生产二氢-(ρ)-异 α 酸的方法,其中所述方法在温和的温度和pH条件下在含水系统中进行,使其成为环境友好的生产方法。

[0022] 在本发明的一个实施方案中,异 α 酸至二氢-(ρ)-异 α 酸的生物转化包括向异 α 酸的混合物中加入纯化的酮还原酶和NADPH或NADP,然后孵育直至获得所需的产率。

[0023] 在本发明的另一个实施方案中,异 α 酸至二氢-(ρ)-异 α 酸的生物转化包括在用于辅因子再循环的异丙醇存在下向异 α 酸的混合物中加入纯化的酮还原酶和NADPH或NADP,随后孵育直至获得所需的产率。

[0024] 在本发明的另外的实施方案中,异 α 酸即底物的浓度被最大化,以增加生物转化的体积生产率。

[0025] 在本发明的另外的实施方案中,混合物中辅因子NADPH或NADP的浓度被最小化,以提高生物转化的经济性。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,异 α 酸至二氢-(ρ)-异 α 酸的生物转化包括在用于辅因子再循环的另一种酶(诸如葡萄糖脱氢酶)存在的情况下,将纯化的酮还原酶和NADPH或NADP添加到异 α 酸的混合物中,随后孵育直至获得所需的产率。

[0027] 在本发明的另一个实施方案中,异 α 酸至二氢-(ρ)-异 α 酸的生物转化包括将全细胞生物催化剂加入到异 α 酸的混合物中,然后孵育直至获得所需的产率,其中所述全细胞生物催化剂是表达编码酮还原酶的基因的固定化微生物。

[0028] 在本发明的另一个实施方案中,异 α 酸到二氢-(ρ)-异 α 酸的生物转化包括将异 α 酸供给表达编码酮还原酶的基因的正在生长的微生物。

[0029] 在本发明的另一个实施方案中,将异 α 酸生物转化为二氢-(ρ)-异 α 酸包括向 α 酸提取物中加入热稳定的酮还原酶,其中进行加热,并将混合物孵育,直至获得所需的二氢-(ρ)-异 α 酸产率。

[0030] 本发明还涉及可用于如上定义的本发明方法的新型酶催化剂。

[0031] 根据本发明的还原酶任选地显示出还原异 α 酸的C(4)处的侧链中的羰基、将光敏偶姻基团(acyloin group)转化为仲醇,并产生光稳定的异 α 酸衍生物的活性(图1)。

[0032] 在本发明的另一个实施方案中,在根据本发明的方法中使用的酮还原酶有利地显示出对催化以下六种主要异 α 酸中的任一种特定成员的还原的最低优先性或无优先性:顺-异葎草酮、反-异葎草酮、顺-异合葎草酮(cis-isocohumulone)、反-异合葎草酮、顺-异粘果酮(cis-isoadhumulone)和反-异粘果酮(trans-isoadhumulone)。

[0033] 在本发明的另一个实施方案中,在根据本发明的方法中使用的酮还原酶特异性地还原顺-异葎草酮、顺-异合葎草酮和顺-异粘果酮(cis-isoadhumulone)。

[0034] 在本发明的另一个实施方案中,在根据本发明的方法中使用的酮还原酶特异性地

还原反-异萹草酮、反-异合萹草酮和反-异粘果酮。

[0035] 在本发明的另一个实施方案中,在根据本发明的方法中使用显示上述底物特异性的2种或更多种酮还原酶的混合物,以将顺式和反式异 α 酸的混合物还原成它们各自的二氢异 α 酸。

[0036] 在本发明的另一个实施方案中,可将显示底物特异性的2种或更多种酮还原酶的混合物加入到反应混合物中,以产生独特的二氢异 α 酸混合物,所述二氢异 α 酸混合物不同于通过化学还原剂诸如硼氢化钠产生的混合物。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明涉及如上定义的方法,其中所述还原酶是酮还原酶。

[0038] 本发明的另一个实施方案涉及如上定义的方法,其中所述酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明涉及如上定义的方法,其中所述酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物,与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22的酮还原酶相比,可以任选地在氨基酸残基上具有一个或多个差异。

[0040] 本发明的又一个实施方案涉及酮还原酶或表达编码酮还原酶的基因的微生物,所述酮还原酶包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0041] 本发明的又一实施方案涉及酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物,所述酮还原酶与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的还原酶序列相比在氨基酸残基上具有一个或多个差异。

[0042] 本发明的又一实施方案涉及酮还原酶或表达编码所述酮还原酶的基因的微生物,所述酮还原酶与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22的酮还原酶具有99%、95%、90%、85%、80%、75%或70%的同源性。

[0043] 本发明的另一个方面包括载体,所述载体包含编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的多核苷酸。

[0044] 本发明还包括这样的载体,其还包含至少一个控制序列。

[0045] 本发明还包括宿主细胞,所述宿主细胞包含这样的载体,所述载体包含编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的多核苷酸。

[0046] 本发明还包括用于产生SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶的方法,其包括在所述宿主细胞产生所述酮还原酶的条件下培养所述宿主细胞。

[0047] 本发明还包括用于产生SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22的酮还原酶的方法,其还包括回收所述宿主细胞产生的酮还原酶的步骤。

附图说明

[0048] 图1显示了异 α 酸的代表性差向异构体的酶催化还原。

[0049] 图2显示了纯化的还原酶的SDS-PAGE分析。

[0050] 图3显示了在30°C下与还原酶R20一起孵育24小时(顶部两个图)和与还原酶R20一起孵育(底部两个图)的异 α 酸的UPLC色谱图。显示了对应于产物二氢-(ρ)-异 α 酸的峰。

[0051] 图4显示了还原酶R17(深灰色,表面呈现)的结构模型,其中代表性底物(反-异萹草酮,黑色)和辅因子(NADPH,浅灰色)结合到活性位点空腔。

[0052] 图5显示了(A)仅产生二氢-(ρ)-异 α 酸的一种非对映体的酮还原酶和(B)产生二氢-(ρ)-异 α 酸的两种非对映体的酮还原酶的UPLC色谱图。显示了对应于产物二氢-(ρ)-异 α 酸的峰。

[0053] 图6显示了由活性酮还原酶同源物:R4、R17、R20、R21和R23的Clustal ω (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)产生的氨基酸序列比对。

具体实施方式

[0054] 在本发明中,酮还原酶替代了硼氢化钠的功能,并允许饮料添加剂二氢-(ρ)-异 α 酸的更天然的生产方法。所述酶可以是特异性地将异 α 酸的任何或所有异构体的(*co*-、*n*-*ad*-以及顺/反-)的酮基还原成羟基的任何酮还原酶。所述酶可源自但不限于细菌、真菌或植物。所述酶可以是依赖于辅因子的(NADH或NADPH)或不依赖于辅因子的。

[0055] 在本文中,“异 α 酸”、“啤酒花异 α 酸”(hop isoalpha acids)和“啤酒花衍生的异 α 酸”(hop-derived isoalpha acids)可以互换使用。

[0056] 根据本发明,使用一种或多种纯化的酶或含有所述一种或多种酶和任选地用于辅因子再循环的另外的酶的混合物对异 α 酸溶液进行酶促处理。酶的量取决于孵育参数,包括持续时间、温度、底物的量和浓度。

[0057] 或者,使用含有表达所述一种或多种酶的微生物的混合物对异 α 酸溶液进行酶促处理。本发明还提供了根据本发明的还原异 α 酸的方法,所述方法包括培养产生酮还原酶的微生物,如果合适的话,诱导酮还原酶的表达。可以收获完整的细胞并将其直接加入到反应中,代替分离的酶,用于如上所述的异 α 酸的还原。此外,可将收获的细胞在加入还原反应之前固定。可通过已知的方法培养微生物并使其发酵。所述微生物可以是细菌或真菌。

[0058] 顺-和反-异 α 酸的混合物可以与单一的显示出还原两种异构体的能力的酮还原酶一起孵育。或者,顺-和反-异 α 酸的混合物可以与2种或更多种显示出不同特异性的酮还原酶一起孵育,其中所得产物是顺-和反-二氢异 α 酸的混合物。

[0059] 或者,只含有顺-异 α 酸的溶液可以与对顺式异构体特异的酮还原酶一起孵育,所得产物是顺-二氢异 α 酸的溶液。仅有顺-二氢异 α 酸的溶液可以显示出有利的苦味和/或热稳定性特性。

[0060] 或者,只含有反-异 α 酸的溶液可以与对反式异构体特异的酮还原酶一起孵育,所

得产物是反-二氢异 α 酸的溶液。仅有反-二氢异 α 酸的溶液可以显示出有利的苦味特性。

[0061] 定制的反-和顺-异 α 酸的掺混物可以与一种或多种显示可变底物特异性的酮还原酶一起孵育,以产生原本无法获得的二氢异 α 酸的独特掺混物。

[0062] 除了用于催化额外所需修饰的酶,诸如但不限于脱氢酶、异构酶、水合酶和裂解酶之外,还可使用一种或多种酮还原酶对异 α 酸混合物进行酶促反应。可将不同活性的酶在一锅反应中组合或依次加入。

[0063] 用于酶孵育的合适溶剂包括水和水与另一种与所述酶相容的溶剂诸如乙醇或异丙醇的混合物。酶促活性得益于水溶液的缓冲。缓冲剂包括但不限于:三(羟基甲基)氨基甲烷(又名Tris)、4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸(又名HEPES)、磷酸钠和磷酸钾。

[0064] 将所述一种或多种酶和异 α 酸在合适的pH范围(例如6-10)和温度范围(例如10-90 $^{\circ}$ C)内孵育,并在此温度下保持足够的时间,以将异 α 酸转化为所需的二氢-(ρ)-异 α 酸产量。连续搅拌将确保恒温 and 底物与酶的接触。反应持续时间(通常为24-48小时)将取决于酶和底物的量及浓度、存在的溶剂和选择的温度。

[0065] 所述一种或多种酶可以是溶液中游离的,固定在珠粒或类似的可混合的支架上,或者固定在其上方通过异 α 酸的溶液的薄膜或树脂上。取决于纯化方法,酶的纯度水平可在30%与90+%之间变化。

[0066] 所述一种或多种酶可以通过物理过滤或离心而从终产品中去除。所述一种或多种酶也可能因极端温度或pH而失去活性,并保留在最终产品中。

[0067] 本发明涵盖的还原酶包括酮还原酶。

[0068] 表1列出了23种成功纯化的酶的详细信息,包括:速记标记、序列ID编号和氨基酸序列。

[0069] 表1.纯化的还原酶。

[0070]

标记	SEQ ID NO.	氨基酸序列
R1	1	<p>MSSGIHVALVTGGNKGIGLAIVRDLCLRFSGDVVLTARD VTRGQAAVQQLQAEGLSPRFH QLDIDDLQSIRALRDFLRKEYGGLDVLVNNAGIAFKVAD PTPFHIQAEVTMKTNFFGTRD VCTELLPLIKPQGRVNVSSIMSVRALKSCSPELQQKFRS ETITEEELVGLMNKFVEDTK KGVHQKEGWPSAYGVTKIGVTVLSRIHARKLSEQRKG DKILLNACCPGWVRTDMAGPKATKSPEEGAETPVYLAL LPPDAEGPHGQFVSEKRVEQW</p>
R2/3	2	<p>MRLEGKVCLITGAASGIGKATLLFAQEGATVIAGDISK ENLDSLVKEAEGLPKVDPYVLNVTDQRDQIKEVVEKVV QKYGRIDVLVNNAGITRDALLVRMKEEDWDAVINVLK GVFNVTQMVPYMIKQRNGSIVNVSSVVGIYGNPGQTN YAASKAGVIGMTKTWAKELAGRNIRVNAVAPGFIEPTM TEKLPEKARETALSRIPLGRFGKPEEVAQVILFLASDESS</p>

[0071]

		YVTGQVIGIDGGLVI
R4	3	MSV FVSGANGFIAQHIVD LLLKEDYK VIGSARSQEKAEN LTEAFGNNPKFSMEVVPDISKLDAFDHVFQKHGKDIKIV LHTASPF CFDITD SERDLLIPAVNGVKGILHSIKKYAADS VERVLTSSYAAVFDMAKENDKSLTFNEESWNPATWES CQSDPVNAYCGSKKFAEKA AWEFLEENRDSVKFELTAV NPVYVFGPQMFDKDVKKHLNTSCELVNSLMHLSPEDKI PELFGGYIDVRDVAKAHLVAFQKRETIGQRLIVSEARFT MQDVL DILNEDFPVLKGNIPVGKPGSGATHNTLGATLDN KKS KLLGFKFRNLKETIDDTASQILKFEGRI
R5	4	MNQVVLVTGGSSGIGKSICLYLHEKGYIVYGTSRNPARY AHEVPFKLIALDVLDDTTITPALKTIIDAEGKLDVLV NNA GIGMLGSIEDSTAEVKEVFETNVYGILRTCQAVLPHMR ERKMGLIINVSSIAGYMG LPYRGIYSATKASVHMITEAM RMELKPYGVHACVVDPGDFATNISDN RKVAHAGRSGSV YMEEINRIEAMINAEVAHSSDPLLMGKAIEKIIRSSNP DIN YLVGKPMQKLSILVRRLLVPKKWF EKIIASHYNMPVK
R6	5	MANS GEGKVVCVTGASGYIASWLVKFLLSRGYTVKASV RDPSDPKKTQHLVSLEGAKERLHLFKADLLEQGSFDSA I DGCHGVFHTASPFND AKDPQAE LIDPAVKGTLNVLNSC AKASSVKRVVVTSSMAAVGYNGKPRTPDVTVD ETWFS D PELCEASKMWYVLSKT LAEDA AWKLAKEKGLDIVTINP AMVIGPLLQPTLNTSAAAILNLINGAKTFPNLSFGWVNV KDVANAHIQA FEVPSANGRYCLVERVVHHSEIVNILREL YPNLPLPERCVDENPYVPTYQVSKDKTRSLGIDYIPLKVS IKETVESLKEKGFAQF
R7	6	MTLSSAPILITGASQRVGLH CALRLL EHGHRVIISYRTEH ASVTEL RQAGAVALY GDFSCETGIMAFIDLLKTQTSSLR AVVHNASEWLAETPGEEADNFTRMFSVHMLAPYLINLH

[0072]

		<p>CEPLLTASEVADIVHISDDVTRKGSSKHIAAYCATKAGLES LTLSFAARFAPLVKVNGIAPALLMFQPKDDAAYRANALA KSALGIEPGAIEVIYQSLRYLLDSTYVTGTTLTVNGGRHV K</p>
R8	7	<p>MSLQGKVALVTGASRGIGQAI ALELGRQGATVIGTATS SGAERIAATLKEHGITGTGMELNVTSAESVEAVLAAIGE QFGAPAILVNNAGITRDNLMLRMKDDEWFDVIDTNLNS LYRLSKGVLRGMTKARWGRIISIGSVVGAMGNAGQANY AAAKAGLEGFSRALAREVGSRGITVNSVTPGFIDTDMTR ELPEAQREALQTQIPLGRLGQADEIAKVVSFLASDGAAY VTGATVPVNGGMYM</p>
R9	8	<p>MDLTNKVVVVVTGGSAGLGEQICYEAAKQGAVVVVVCAR RINLIGKVREQCAVLSGREAFSYQLDIADPESVERVVEAI SAEVGPIDVLVNNAGFGLFENFVEIDLAVARQMFDVNVL GMMTFTQKVAIKMIEAGQGHINVASMAGKMATAKSTV YSATKFAVLGFSNALRLELKPLGVAVTTVNPQPIQTEFF DKADPTGTYLAAVDKIVLDPTKLAKEVVGSMGTSRREIN RPFVMEAAARFYTLFPHLGDFIAGNILNKK</p>
R10	9	<p>MRRILITGANGFVVGQILCSMLRQAGHHVIALVGAESALS SHADESVRCDIRDASGLEQALCRAAPTHVVHLAAITHVP TSFNNPVLTWQTNVMGSVNLLQALQRSAPFAFVLFVSSS EVYGETFKQGTALGEDSACKPMNPYAASKLAAEAAFNE YFRQGRKGIVVRPFNHIGARQSPDFATASFARQIALIEAG KQAPQLKVGNLQAARDFLDVHDVCDAYVALLQLADEQ ERYPGCLNICRGEPTSLQTLTQLMALSSSVIEVTIDPDR MRPSDIPSAFGNNSAMRCATGWKPKTKLDDTLEALLNY WRHEVISAV</p>
R11	10	<p>MSLLEPYTLRQLTLRNRIAVSPMCQYSSVDGLANDWH LVHLGSRAVGGAGLVISEAMA VTPDGRITPEDLGLWND</p>

[0073]

		<p>EQIEPLQRITRFINTQGAVAGIQLAHAGRKASTWRPWLG KHGSVPLTEGGWTPVVGPSAIAFDPQHTAPLQLSETQIQE LIKAFVDSARRALTAGFKVVEIHAAHGYLLHQFLSPLSN QRTDQYGGSFENRIRLTLQVTEAVRAVWPQELPLFVRVS ATDWVEDGWNAEETVELARRLKALGTDLIDVSSGGTSA NAEIPVGPQYQTRFAEQVRKEADIATGTVGMITDPAQAE HILRTGQADIILLARELLRDPYWPLRADEDLGGRQATWP AQYQRATHRDQPIHESDLRD</p>
R12	11	<p>MSSSSLRVLAIGNNPILFYTSRFQLAKNIDLYHVNDSSKS CQFEIETEYYGKDRFELENHFTSIEHLTEALSSKSSEAVF DIIIMSAPSLQELSSLASKLTSIIDSNTKIFLESSGFIQLEPF VKLSMESPVNVFSILTDLDIRQIGPNHFKHFPSTAKENT IYLGESKSSTEKYSSGVITLLTTFEKLFAKLFSNIKINLCN FSSIEFLSQQWKLAISSRICFDPLLIMFEQENPSDLDDQIIA KPLISGLVTEIITVAKTMGARLNSSHNDENSLLSLWKNYSY HSTNKPPALVYHFIHQTTPLNIDILLQ TILLADDFGIKTP YLEFLYSVLSQFERLNSG</p>
R13	12	<p>MEYRKVGKVGKISELSLGSWLTFGKQLDLDTATEVV KKAFNSGINFFDTAEAYAGGIAEAMLGKILKNFRREDLV VSTKIFWGGSGPNDLGLSKKHLLEGTWNSLKRQLQMDYV DILYCHRPDPNVPMEEVVFAMDYILREGLALYWGTSSEW SAKEIEEAHRVCKELGVMPPIVEQPQYNMFVRERVEKE YAPLYEKYGMGLTTYSPLASGLLSGKYNNNGIPEGSRLAT FPQVRKWLEEGLLNEKTFKLRKLQNIADQLGASLPQ LAIWILKNKNVSSVILGVS RPEQLEENLKAVEIKEKLTE DVMEEIEKILNE</p>
R14	13	<p>MTLANLPPLVTVFGGSGFVGRHVVRMLAKRGYRIRVAV RRPDLAGFLQPLGNVGQISFAQANLRYRDSIIKAVEDAD HVVNCV GILAESGRNTF DAVQEFGAKAIAEAARDTGATL</p>

[0074]

		<p>THISAIGADANSQTGYGRTKGRAEAAIHSVLPGAVILRPS IIFGPEDDFNKFAMARNLPFLPLIGGGKTKFQPVYVE DVAEAVARSVDGKLPKPGAIYELGGPDVMTFRDCLEAVL AATYRERSFVNLPFGVASMIGKLASLVPLITPPLTPDQVT MLKKDNVVSAAEAEKKGLTLEGIGITPVRVASVLPSYMV QYRQHGQFSNAGKAA</p>
R15	14	<p>MTAEVFDPRALRDAFGAFATGVTVVVTASDAAGKPIGFTA NSFTSVSLDPPLLLVCLAKSSRNYESMTSAGRFAINVLS TQKDVSNFARFVEDRFAAVDWRLGRDGCPIFSDVAAW FECSMQDIIIEAGDHVIIIGRVTAFENGLNGLGYARGGYF TPRLAGKAVSAAVEGEIRLGAVLEQQGAVFLAGNETLSL PNCTVEGGDPARTLAAYLEQLTGLNVTIGFLYSVYEDKS DGRQNIVYHALASDGAPRQGRFLRPAELAAAKFSSATA DIINRFVLESSIGNFGIYFGDETGGTVHPIANKDAHS</p>
R16	15	<p>MDEVILVTGAAKGIGLATVKRLSSQGARVILNVHHEIEA TDWQALTAEYPRLTQLVGDVSDDQSAANLIDTVMTNFG RLDGLVNNAGVTHDQLLTRLHAEDFMSVIQTNLLGTFN MTKYALKVMQRQRQGAI NVNASVVGLHGNVQANYAA SKAGIIGLTKTTAKEAARRQVRCNAVAPGMITTAMTAQ LNDRVTAAALS DIPLKRFGTPDEIAQAIDFLLHQPYLTGQ VLTVDGGMTI</p>
R17	16	<p>MRVLLTGGSGFIAAHILDILLSRGHTVITTVRSQQKIDAI KAAHPDVPASKLDF FIVEDIAKENAFDECLKKGEGLEA VLHTASPFHFNVTDTKKDLLDPAIIGTTAILHAIKKFAPS VTRVVVTSSFASIIDASKGNWPDHTYTEEDWNPITLSEAV ENPSNGYRASKTFAEKA AAWFVEKENPNFTLSTMNPLV LGPIVHYLNSLDALNTSNQRVRDVLQGWKEEIPGTGTF IWIDVRDLALAHVKAIEIAEAAGKRFFITEGYFSNKEICEI IRKNFPEDGGELPGKEVKGGGYPEGGIYKFDNARTRSVL</p>

[0075]

		GLEFRGLEESIVDLVKSLEKVG
R18	17	MSRNLALVTGSTQGIGLAVAKELAIKHNYQVLLGVRNT KAGEEIASDLRKEGHEASVVELDLTSADSIDKAVKHIDE KYGYLVDVLINNAGVLLDRQEGLSTWDLFSKTFITNVFG TGCLTQSLPLLRKAKNSPPRIVFVTSVMGSLTKATDET TTYYNIDYKAYDASKAAVNMLMFNFARELDAVGGKVN VCPGLVKTGLTNYHEWGTSPETGAERIVEMATIGEDGP TKTISDRNGELPL
R19	18	MDLQNKRVLVGTGSTQGIGAATALAFAQKGCQVLLNGR RPELPEEIADQLEKIGADYQYFSADVDEGAIKQLFKEIG EIDILVNNAGITKDQIMIGMKLADFDQVIKVNLRSSFMLT QKALKKMLKKRSGAIINMASIVGQHGNAGQANYAASKA GVIALTQTAAKEAAGRGRVNAIAPGMIASQMTAVLPD EVKEQALSQIPLARFGKAEVAQAQAVFLAENDYVTGQT LVVDGGMTI
R20	19	MTKVLVAGGSGFIGAHILEQLLAKGHSVVTTVRSKEKA QKILDAHKAADRLEVAIVPEIAREDAFDEVVKTTPGIEVV IHPASPCHLNFTDPQKELIDPAVLGTTNILRAIKRDAPQV RRVIITSSVAAIFNTKDPVSTLTEQSWNPNDLSNIHDSRAV AYCVSKTLAERAAWDYVDQEKPNFDLVTNPPVLVGPV VGHFNSVDSINASNECLANLVRGKWRDEIPTGPVNIWI DVRDVAAAHVRAMERQEAGGKRLFTVGGFRFSYTKIAEI VREHGPDREFDKMPRAEARSGDANYTGPVLKFDNGETN RILGIEWTPLEKSVLDFVESIKEFDL
R21	20	MTKVLLTGGSGFIAAHILEQLLAKNYTVITTVRTKSKAD LIKEAHADLVKSGRLSVAIVPDIAVLSAFDDLVAKIASGP DGDLEYVVHTASPLFFFTDAQKEIITPALNGTRGILEAV KRSAPKVKRVVITSSFAAILSEDDFTNPNATFSESSWNP TVKDANRSIATGYHVSKVESERLAWDFIKNEKPNFDLVT

		VNPPLVLGPVAHSLASVDAINASNERIADLLRGKWKAIEP ETGAVDLYIDVRDTAKAHIKALELPEASGHRLFVVASRT SNHEIAKIIRDNFPEFAERLPGPEVKGGEHVDENKAYKW NCDETNKLLKIDWIPIEQSMIDTVNSLKDKGI
[0076]	R22 21	MPTVSPGSKVLVTGANGFIAIWVRRLLLEEGYSVRGTVR AASKASHLKDIFKSYGEKLEVVVVPDFTKEGAFDELIKG MDAIQHIASPGPANTDDLYEIVNPAVDGTLNLLNTALKH GSGLKRIVITSGAGAIIDTTTAWKFYNDHKNVIKWDLTV LNPVVFVFGPPIHEIGASPMTLNSSMVHFWVNVISTDTPKT KEGLSFAASWVDVRDVAQGHVLALQKEAAGGERIILSE GSFVWQDWVDVANKFKSKRELPGMPEIERVYKFQMD ASKATRILGITYRSKEDTMKDLEDFERRGW
	R23 22	MKVLLTGGSGFIATHCLDALLKHGHEVVITVRSAEKGQ ALVDLFGKQKVSYTIVKDISVPGAFDQAVISDPPFDVHVH TASPFHYDVQDNKRDLDPAIIGTTGILESIQKGAPSVKK VVVTSSFAAISNPTAPPKVYDETVWNQMTMEEALTTKDP QAVYRGSKTFAEKAWEFVEREKPNFTLTVLNPPVSHFL FSRHKDVAVTFFSDFSQHCWSTARSCTPWHHWTISTPR ASES

[0077] 几乎所有候选物在一步纯化后都足够纯(>80%的蛋白质含量是目标蛋白质)(参见图2)。

[0078] 本发明涵盖的还原酶包括那些包含下列氨基酸序列的酶:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22。

[0079] 本发明涵盖的还原酶还包括那些与下列氨基酸序列相比在氨基酸残基上具有一个或多个差异的酶:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22。

[0080] 本发明涵盖的还原酶还包括那些包含与下列氨基酸序列具有至少40%(包括至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%和至少95%)同一性的氨基酸序列的酶:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22。

[0081] 如本文中所用,“序列同源性百分比”、“同源性百分比”和“同一性百分比”是指多核苷酸序列或多肽序列之间的比较,通过在比较窗内比较两个最佳比对的序列来确定,其中与用于两个序列最佳比对的参考序列相比,比较窗内的多核苷酸或多肽序列的部分可包

含添加或缺失(即,缺口)。所述百分比通过确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数目或者将核酸碱基或氨基酸残基与缺口对齐以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数,然后将结果乘以100,得到序列同一性百分比来计算。使用BLAST和BLAST 2.0算法进行最佳比对和序列同源性百分比的确定(参见,例如,Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410[1990];以及Altschul等人,Nucleic Acids Res.3389-3402[1977])。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心网站公开获得。

[0082] 混杂的酶可以催化相同的化学反应,尽管具有低的共享氨基酸同一性。酮还原酶R4 (SEQ ID NO:3) 因其混杂性而最初被选择用于筛选[Guo等人Biochim.Biophys.Acta 2014,1844]。将含有相同的酶结构域(IPR001509:NAD依赖性差向异构酶/脱水酶)并与R4 (SEQ ID NO:3) 共享氨基酸同一性的另外五种酮还原酶(R17 (SEQ ID NO:16)、R20 (SEQ ID NO:19)、R21 (SEQ ID NO:20)、R22 (SEQ ID NO:21) 和R23 (SEQ ID NO:22)) 作为合成基因获得、纯化和表征。为了确立序列同一性截止值,故意选择序列同一性越来越低的还原酶。

[0083] 尽管与R4 (SEQ ID NO:3) 的同一性百分比相对较低(在酶的整个长度上为34-39%),但酶R17 (SEQ ID NO:16)、R20 (SEQ ID NO:19)、R21 (SEQ ID NO:20) 和R23 (SEQ ID NO:22) 催化异 α 酸向二氢-(ρ)-异 α 酸的转化。与R4 (SEQ ID NO:3) 共享33%同一性的R22 (SEQ ID NO:21) 不催化异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸,但在纯化时另外地是活性酶(通过测量酶催化的异丙醇的氧化活性确定的)。

[0084] 通过多序列比对说明了区分功能性和非功能性还原酶以获得二氢-(ρ)-异 α 酸的一个特征(图6)。本文中的酮还原酶R4 (SEQ ID NO:3) 和表征为能够将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的所有R4 (SEQ ID NO:3) 同源物,具有存在于残基100与200之间的结构域,其由被36-39个低同源性(38-46%)氨基酸分隔的13个同源性良好(>53%同一性)的氨基酸和9个具有高同源性(>55%)的氨基酸组成。该结构域在无功能R22多肽(SEQ ID NO:21)中缺失。因此,所述结构域被认为是获得二氢-(ρ)-异 α 酸的酮还原酶活性的标志。

[0085] 本文公开的具体实施方案可在权利要求书中使用由……组成或/和基本上由……组成来进一步限制。当在权利要求中使用,无论是提交的还是根据修改添加的,过渡术语“由……组成”排除权利要求中未指定的任何元素、步骤或成分。过渡术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤,以及对一个或多个基本和新颖特征没有实质性影响的材料或步骤。所要求保护的发明的实施方案在本文中被固有地或明确地描述和实现。

[0086] 如本文中所用,术语“包含(comprising)”或“含有(comprises)”旨在表示组合物和方法包括引述的元素,但不排除其它元素。

[0087] 术语“有效量”是指足以将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的还原酶的量。确定给定施用的有效量完全在制药领域的普通技术人员的能力范围内。

[0088] 在用于制备二氢-(ρ)-异 α 酸的方法中,以有效地将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的量使用一种或多种纯化的还原酶或含有一种或多种还原酶和任选的用于辅因子再循环的附加酶的混合物对异 α 酸溶液进行酶促处理。酶的量取决于孵育参数,包括持续时间、温度、底物的量和浓度。

[0089] 或者,使用含有表达所述酶的微生物的混合物对异 α 酸溶液进行酶促处理。

[0090] 顺-和反-异 α 酸的混合物可以与显示还原两种异构体的能力的单一还原酶/酮还原酶一起孵育。或者,顺-和反-异 α 酸的混合物可以与2种或更多种显示出不同特异性的酮还原酶一起孵育,其中所得产物是顺-和反-二氢异 α 酸的混合物。

[0091] 定制的反-和顺-异 α 酸的掺混物可以与一种或多种显示可变底物特异性的还原酶/酮还原酶一起孵育,以产生原本无法获得的二氢异 α 酸的独特混合物。

[0092] 除了用于催化额外所需修饰的酶,诸如但不限于脱氢酶、异构酶、水合酶和裂解酶之外,还可使用酮还原酶对异 α 酸混合物进行酶促反应。可将不同活性的酶在一锅反应中组合或依次加入。

[0093] 用于酶孵育的合适溶剂包括水和水与另一种与所述酶相容的溶剂诸如乙醇或异丙醇的混合物。酶活性得益于水溶液的缓冲。缓冲剂包括但不限于:三(羟基甲基)氨基甲烷(又名Tris)、4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸(又名HEPES)、磷酸钠和磷酸钾。

[0094] 将酶和异 α 酸在合适的pH范围(例如pH 6至10)和温度范围(例如10至90°C)内孵育,并在此温度下保持足够的时间,以将异 α 酸转化为所需的二氢-(ρ)-异 α 酸产量。连续搅拌将确保恒温 and 底物与酶的接触。反应持续时间(通常为24-48小时)将取决于酶和底物的量及浓度、存在的溶剂和选择的温度。

[0095] 还原酶可以是溶液中游离的,固定在珠粒或类似的可混合的支架上,或者固定在其上方通过异 α 酸的溶液的薄膜或树脂上。取决于纯化方法,酶的纯度水平可在30%与90+%之间变化。

[0096] 还原酶可以通过物理过滤或离心从终产品中去除。酶也可能因极端温度或pH而失去活性,并保留在最终产品中。

[0097] 本发明是利用还原酶将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸的新型方法。经密码子优化的还原酶基因在大肠杆菌BL21(DE3)中获得了每L细胞培养物100mg以上的纯化酶产量。以NADPH为辅因子表征了所有酶。研究中表征的还原酶具有以前未描述过的酶促活性。这些酶形成了新型生物催化剂的基础,所述新型生物催化剂可用于新型生物转化,以取代使用硼氢化钠的现有方法。

[0098] 实施例

[0099] 以下实施例说明了本发明,但不限制其范围。

[0100] 实施例1-还原酶的制备和筛选

[0101] 方法

[0102] 候选物鉴定

[0103] 在对关于与所需反应性质相似的表征的酶促反应的文献进行广泛搜索,然后对三个公共蛋白质序列数据库UniProt(www.uniprot.org/)、Pfam(Pfam)和大肠杆菌InterPro(www.ebi.ac.uk/interpro/E.coli)进行生物信息学挖掘后选择还原酶候选物。生物信息学依赖于表征的酶与还原酶候选物之间的BLASTP序列比对([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))。

[0104] 酶的表达和纯化

[0105] 以下列几种方式获得质粒DNA:1)在来自DNASU质粒库(www.dnasu.org)的表达载体中,2)在来自DNASU质粒库的克隆性载体中,随后克隆到内部表达载体中,3)在来自Atum(www.atum.bio)的表达载体中作为合成基因,或4)在来自通用生物系统

(www.generalbiosystems.com)的表达载体中作为合成基因。将合成基因进行了密码子优化,以在大肠杆菌中表达。

[0106] 从含有目标表达载体的大肠杆菌BL21 (DE3)的琼脂平板上接种5mL含有适当抗生素的Luria肉汤,并在30℃下振荡孵育过夜。第二天,将过夜培养物以1:100反稀释到含有抗生素的新鲜0.5L Luria肉汤中,并在37℃下以220rpm振荡孵育2-3小时,直至达到0.5的光密度。用终浓度为0.2mM的异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导培养物,并在25℃下以180rpm振荡培养16小时。通过以4800rpm离心15分钟来收获细胞。将细胞沉淀重新悬浮在12mL结合缓冲液(10mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7.5)中,并通过超声处理15分钟(5秒打开,5秒关闭)裂解细胞。通过以10,000rpm离心20分钟来澄清细胞裂解物。通过钴亲和色谱、麦芽糖亲和色谱或谷胱甘肽亲和色谱从澄清的细胞裂解物中纯化加标签的蛋白质。通过离心过滤将蛋白质溶液交换到蛋白质储存缓冲液(20mM Tris-HCl, 50mM NaCl pH 7.0)中。使用通过适当的氨基酸序列计算的消光系数,通过280nm处的吸光度测量蛋白质浓度。添加甘油至终浓度为20%,并将酶溶液在-20℃或-80℃下冷冻。

[0107] 异α酸还原测定

[0108] 测试纯化的候选酶的还原异α酸的能力。特定的反应需要将异α酸的任何或所有异构体和同源物(co-、n-ad-和顺/反-)的特定酮基还原为羟基。在2mL微量离心管中,将100uL酶溶液(终浓度为0.15-1.8mg/mL酶)加入900uL缓冲水溶液中,其中通过葡萄糖脱氢酶(263mM磷酸钠,1.7mM硫酸镁,1.1mM NADP+,1.1mM NAD+,80mM D-葡萄糖,4.3U/mL葡萄糖脱氢酶,pH 7.0)进行辅因子再循环。加入5uL碱性异α酸溶液(**ISOLONE®**,29%异α酸),终浓度为0.29%异α酸。所述反应在30℃下以180rpm的轨道振荡孵育24小时。过滤所得反应混合物以除去酶。通过UPLC-MS/MS检测异α酸和二氢异α酸。阴性对照样品包含所有上述反应组分,其中用蛋白质储存缓冲液替代酶溶液。

[0109] 结果

[0110] 候选物选择

[0111] 基于公共功能注释和氨基酸序列相似性,60个独特的酶序列被鉴定为还原酶候选序列。

[0112] 酶的表达和纯化

[0113] 基于DNA的可用性和最初的60个候选物的组中代表的氨基酸序列多样性的充足取样,选择30个候选物用于表达和纯化。大多数候选物在大肠杆菌BL21 (DE3)中表现出良好的表达和溶解性水平,其中每升培养物产生5至100mg纯化的蛋白质。由于在宿主生物中溶解性差,几个候选物被放弃。

[0114] 还原酶的特征

[0115] 如果通过UPLC检测到与顺/反-co/ad/n-二氢-(ρ)-异α酸相对应的峰的强度大于缺乏酶的对样品,则确定所述酶还原异α酸。十种独特的酶被确定为异α酸还原酶(参见图3)。这些酶的细节概述于表2中。由于溶解度和酶产量的原因,测定中内部酶的终浓度在0.15mg/mL与1.8mg/mL之间。较低的酶浓度有助于二氢-(ρ)-异α酸的产率。

[0116] 最初在葡萄糖、葡萄糖脱氢酶和NAD存在的情况下测试酶的还原酶活性,以再循环异α酸还原所需的NADP。在确定还原酶活性后,对酶氧化异丙醇的能力进行了表征,异丙醇是更经济的辅因子再循环替代物。高效氧化异丙醇的能力如表2中所示。

[0117] 表2. 表征的新型异 α 酸还原酶。

标签	异 α 酸还原	异丙醇氧化
R2	是	否
R4	是	是
R7	是	否
R9	是	是
R13	是	否
R14	是	是
R17	是	是
R20	是	是
R21	是	未测试
R23	是	未测试

[0119] 底物特异性

[0120] 用于生物转化目的的理想酮还原酶显示对异葎草酮同源物没有底物特异性, 所述异葎草酮同源物根据侧链组成(赋予n-、ad-和co-异葎草酮)而变化。另外, 所述酮还原酶显示对异葎草酮顺式和反式异构体没有特异性, 所述异构体在酶促还原位点附近的C4叔醇基团上存在空间差异。

[0121] 底物特异性由氨基酸序列决定, 因此由酶的底物结合口袋的几何形状决定。与更受限制的结合袋相比, 更大的结合袋容纳更大的基底以及更多种类的底物。(参见图4)。

[0122] 在表征的还原酶中观察到两种还原立体专一性(参见图5)。

[0123] 尽管异 α 酸分子上存在两个额外的酮基, 但对于所有表征的酮还原酶, 仅观察到C4侧链上的所需还原。

[0124] 实施例2-利用通过异丙醇氧化进行的辅因子再循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0125] 在1.5mL微量离心管中, 将10mg还原酶重新悬浮在700uL缓冲水溶液(例如, 磷酸钠 pH 7.5)中。加入290uL异丙醇。加入10uL碱性异 α 酸溶液(29%异 α 酸), 终浓度为0.29%异 α 酸。将所述反应物在30°C下以180rpm轨道摇荡孵育48小时。过滤所得反应混合物以除去酶。通过HPLC定量异 α 酸和二氢-(ρ)-异 α 酸。

[0126] 实施例3-利用通过异丙醇氧化进行的辅因子再循环对酸化啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0127] 以实施例2中所述的方式处理异 α 酸, 其中异 α 酸的来源是高度浓缩的物质(68.9%的异 α 酸), 其pH值小于7。

[0128] 实施例4-利用通过葡萄糖脱氢酶进行的辅因子再循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0129] 除用4.3U/mL葡萄糖脱氢酶、0.7g/L mM NAD和14.4g/L D-葡萄糖代替异丙醇外, 以实施例2中所述的方式处理异 α 酸。

[0130] 实施例5-在辅因子再循环不存在的情况下对啤酒花衍生的异 α 酸的酶处理

[0131] 除用等摩尔量的NADPH代替异丙醇作为底物外, 以实施例2中所述的方式处理异 α 酸。

[0132] 实施例6-利用热稳定的还原酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0133] 天然热稳定的还原酶获自嗜热细菌和古细菌生物体,诸如海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)。在1.5mL微量离心管中,将100 μ L酶溶液(1.5-15.0mg/mL酶)加入到900 μ L缓冲水溶液(263mM磷酸钠pH 7.0,1.7mM硫酸镁,4.3U/mL葡萄糖脱氢酶,1.1mM NADP⁺,1.1mM NAD⁺,80mM D-葡萄糖)中。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在60-80 $^{\circ}$ C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。过滤所得反应混合物以除去酶。

[0134] 实施例7-利用通过乙醇氧化进行的辅因子再循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0135] 除用乙醇代替异丙醇外,以实施例2中所述的方式处理异 α 环酸。

[0136] 实施例8-利用通过SiO₂产生的固定化酮还原酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0137] 将酮还原酶吸附在SiO₂上,并用戊二醛交联,得到固定的酮还原酶材料。以实施例2中所述的方式用固定化酮还原酶处理异 α 酸。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0138] 实施例9-利用通过DEAE-纤维素产生的固定化酮还原酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0139] 将酮还原酶用戊二醛交联并吸附在DEAE纤维素上,得到固定化酮还原酶材料。以实施例2中所述的方式用固定化酮还原酶处理异 α 酸。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0140] 实施例10-利用通过PEI处理的矾土产生的固定化酮还原酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0141] 将酮还原酶用戊二醛交联并吸附到聚乙基亚胺(PEI)处理的矾土上,得到固定化酮还原酶材料。以实施例2中所述的方式用所述固定化酮还原酶处理异 α 酸。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0142] 实施例11-利用共固定化酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0143] 利用上述方法中的任何方法将还原酶和辅因子再循环酶,诸如葡萄糖脱氢酶依次固定或于单一组合中一起固定,以产生共固定的材料。在缓冲水溶液(50-250mM磷酸钠,0.1-1.0mM NADPH,10-40%异丙醇,pH 7-9)中加入浓度为0.1-10mg/mL的共固定材料。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),最终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在30-40 $^{\circ}$ C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0144] 实施例12-利用交联/球形化的细胞对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0145] 将表达还原酶的细胞(细菌、真菌、植物)用聚胺/戊二醛交联,挤出并球形化以产生固定化还原酶材料。在缓冲水溶液(50-250mM磷酸钠,0.1-1.0mM NADPH,10-40%异丙醇,pH 7-9)中加入固定化还原酶至浓度为0.1-10mg/mL。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在30-40 $^{\circ}$ C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0146] 实施例13-利用交联/包埋的细胞对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0147] 将表达所述还原酶的细胞(细菌、真菌、植物)用戊二醛交联,并包埋在明胶或聚合物珠粒中,产生固定化还原酶材料。在缓冲水溶液(50-250mM磷酸钠,0.1-1.0mM NADPH,10-40%异丙醇,pH 7-9)中加入固定化还原酶至浓度为0.1-10mg/mL。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),最终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在30-40°C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。将获得的反应混合物以10,000g离心以除去固定化酶。

[0148] 实施例14-利用活细胞对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0149] 将表达所述还原酶的微生物(细菌、真菌)通过发酵生长至高密度,收获、洗涤并沉淀以形成细胞浆。将细胞浆重新悬浮在含有0.145-16%异 α 酸的新鲜生长培养基中。将细胞培养物在25-37°C下混合孵育24-72小时。将细胞培养物以10,000g离心,以从用过的生长培养基中除去细胞。用乙醇从用过的生长培养基中提取二氢-(ρ)-异 α 酸。

[0150] 实施例15-利用细胞裂解物对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0151] 将表达还原酶的微生物(细菌、真菌)通过发酵生长至高密度,收获、洗涤并裂解以产生粗细胞裂解物。向粗细胞裂解物中加入异 α 酸,终浓度为0.145-16%异 α 酸。将细胞培养物在25-40°C下混合孵育24小时。将反应混合物以10,000g离心或过滤,以从裂解物中除去细胞材料。用乙醇从澄清的裂解物中提取二氢-(ρ)-异 α 酸。

[0152] 实施例16-用嗜冷还原酶对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0153] 在酶处理中,还原酶是来自嗜冷(耐寒)微生物的同源物。在缓冲水溶液(50-250mM磷酸钠,0.1-1.0mM NADPH,10-40%异丙醇,pH7-9)中加入还原酶至浓度为0.1-10mg/mL。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在0-20°C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。过滤所得反应混合物以除去酶。

[0154] 实施例17-利用NADH辅因子再循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0155] 在酶处理中,NADPH辅因子被NADH取代。异 α 酸以实施例2中所述的方式进行处理,但NADP被NAD取代。

[0156] 实施例18-利用通过乙醇氧化进行的辅因子循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0157] 在酶处理中,异丙醇原料被乙醇取代,在缓冲水溶液(50-250mM磷酸钠,0.1-1.0mM

[0158] NADH,10-40%乙醇,pH 7-9)中加入还原酶浓度至浓度为0.1-10mg/mL。加入**ISOLONE**[®]异构化啤酒花提取物溶液(29%异 α 酸),终浓度为0.145-16%异 α 酸。将反应物在30-40°C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。过滤所得反应混合物以除去酶。

[0159] 实施例19-对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理,然后提取

[0160] 酶处理后提取,以增加二氢-(ρ)-异 α 酸的终浓度。以实施例2中所述的方式处理异 α 酸。过滤所得反应混合物以除去酶,并用食品级溶剂提取,以获得所需浓度的二氢-(ρ)-异 α 酸。

[0161] 实施例20-对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理,随后进行热灭活

[0162] 以实施例2中所述的方式处理异 α 酸。将反应物在30-40°C下以180rpm轨道振荡孵育24小时。将所得反应混合物在80-100°C下加热10-30分钟以使酶失活。

[0163] 实施例21-对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理,随后进行化学灭活

[0164] 以实施例2中所述的方式处理异 α 酸。将反应物在30-40°C下以180rpm轨道振荡孵

育24小时。将食品级乙醇添加至终浓度>50%以使酶失活。

[0165] 实施例22-用固定化酮还原酶再循环对啤酒花衍生的异 α 酸进行酶处理

[0166] 将酮还原酶用戊二醛交联,并吸附在DEAE纤维素上,得到固定的酮还原酶材料。然后以实施例2中所述的方式用固定化酮还原酶处理异 α 酸。将获得的反应混合物以10,000g离心,以从反应溶液中分离出固定化酮还原酶。回收固定化酮还原酶,用水或含水缓冲液洗涤,并在新的反应混合物中再次使用。

[0167] 结论

[0168] 23种酮还原酶已被表征为将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸。本研究中表征的酮还原酶具有以前未描述过的酶促活性。本研究中表征的酮还原酶都将酮基还原成醇,因此是酮还原酶。这些结果表明,在新型生物转化过程中,酮还原酶生物催化剂可用于将异 α 酸转化为二氢-(ρ)-异 α 酸。本发明取代了使用硼氢化钠的现有化学方法。

[0169] *****

[0170] 本发明的范围不受本文描述的具体实施方案限制。实际上,根据上述说明,除了本文中描述的变动外的本发明的各种变动对于本领域技术人员来说是很显然的。此类变动旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0171] 本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其它材料据此通过引用并入。

[0172] *****

[0173] 引用的参考文献

[0174] 1.Sodium Borohydride;MSDS No.S9125;Sigma-Aldrich Co.:Saint Louis,MO November 01,2015. (2017年8月6日访问)。

[0175] 2.Robinson,P.K.,Enzymes:principles and biotechnological applications.Essays Biochem 2015,59,1-41.

[0176] 3.Hult,K.;Berglund,P.,Enzyme promiscuity:mechanism and applications.Trends Biotechnol.2007,25(5),231-238.

[0177] 4.Nobeli,I.;Favia,A.D.;Thornton,J.M.,Protein promiscuity and its implications for biotechnology.Nat.Biotechnol.2009,27(2),157-167.

[0178] 5.Pozen,M.,Enzymes in Brewing.Ind.Eng.Chem,1934,26(11),1127-1133.

[0179] 6.Praet,T.;Opstaele,F.;Jaskula-Goiris,B.;Aerts,G.;De Cooman,L.,Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation.Cerevisia,2012,36,125-132.

[0180] 7.Wallerstein,L.(1947) Bentonite and Proteolytic Enzyme Treatment of Beer,US Patent 2,433,411.

[0181] 8.Ghionno,L.;Marconi,O.;Sileoni,V.;De Francesco,G.;Perretti,G.,Brewing with prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*:the impact of enzymatic treatment on gluten levels,quality attributes,and sensory profile.Int.J.Food Sci.Technol,2017,52(6),1367-1374.

[0182] 9.Gros,J.;Tran,T.T.H.;Collin,S.,Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop.J.Inst.Brew.2013,119

(4) ,221-227.

序列表

<110> KALAMAZOO HOLDINGS, INC.

<120> 改性啤酒花产品的酶法生产

<130> KALSEC 76 PCT SEQ

<140>

<141> 2019-09-26

<150> US 62/736,558

<151> 2018-09-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

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

```

	180		185		190
Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His					
	195		200		205
Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn					
	210		215		220
Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala					
225		230		235	240
Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu					
	245		250		255
Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys					
	260		265		270
Arg Val Glu Gln Trp					
	275				
<210>	2				
<211>	246				
<212>	PRT				
<213>	海栖热袍菌 (Thermotoga maritima)				
<400>	2				
Met Arg Leu Glu Gly Lys Val Cys Leu Ile Thr Gly Ala Ala Ser Gly					
1	5		10		15
Ile Gly Lys Ala Thr Thr Leu Leu Phe Ala Gln Glu Gly Ala Thr Val					
	20		25		30
Ile Ala Gly Asp Ile Ser Lys Glu Asn Leu Asp Ser Leu Val Lys Glu					
	35		40		45
Ala Glu Gly Leu Pro Gly Lys Val Asp Pro Tyr Val Leu Asn Val Thr					
	50		55		60
Asp Arg Asp Gln Ile Lys Glu Val Val Glu Lys Val Val Gln Lys Tyr					
65		70		75	80
Gly Arg Ile Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Ala					
	85		90		95
Leu Leu Val Arg Met Lys Glu Glu Asp Trp Asp Ala Val Ile Asn Val					
	100		105		110
Asn Leu Lys Gly Val Phe Asn Val Thr Gln Met Val Val Pro Tyr Met					
	115		120		125
Ile Lys Gln Arg Asn Gly Ser Ile Val Asn Val Ser Ser Val Val Gly					
	130		135		140
Ile Tyr Gly Asn Pro Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Ala Ser Lys Ala Gly					
145		150		155	160
Val Ile Gly Met Thr Lys Thr Trp Ala Lys Glu Leu Ala Gly Arg Asn					

	165	170	175
Ile Arg Val Asn Ala Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Pro Met Thr			
	180	185	190
Glu Lys Leu Pro Glu Lys Ala Arg Glu Thr Ala Leu Ser Arg Ile Pro			
	195	200	205
Leu Gly Arg Phe Gly Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln Val Ile Leu Phe			
	210	215	220
Leu Ala Ser Asp Glu Ser Ser Tyr Val Thr Gly Gln Val Ile Gly Ile			
225	230	235	240
Asp Gly Gly Leu Val Ile			
	245		
<210>	3		
<211>	342		
<212>	PRT		
<213>	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
<400>	3		
Met Ser Val Phe Val Ser Gly Ala Asn Gly Phe Ile Ala Gln His Ile			
1	5	10	15
Val Asp Leu Leu Leu Lys Glu Asp Tyr Lys Val Ile Gly Ser Ala Arg			
	20	25	30
Ser Gln Glu Lys Ala Glu Asn Leu Thr Glu Ala Phe Gly Asn Asn Pro			
	35	40	45
Lys Phe Ser Met Glu Val Val Pro Asp Ile Ser Lys Leu Asp Ala Phe			
	50	55	60
Asp His Val Phe Gln Lys His Gly Lys Asp Ile Lys Ile Val Leu His			
65	70	75	80
Thr Ala Ser Pro Phe Cys Phe Asp Ile Thr Asp Ser Glu Arg Asp Leu			
	85	90	95
Leu Ile Pro Ala Val Asn Gly Val Lys Gly Ile Leu His Ser Ile Lys			
	100	105	110
Lys Tyr Ala Ala Asp Ser Val Glu Arg Val Val Leu Thr Ser Ser Tyr			
	115	120	125
Ala Ala Val Phe Asp Met Ala Lys Glu Asn Asp Lys Ser Leu Thr Phe			
	130	135	140
Asn Glu Glu Ser Trp Asn Pro Ala Thr Trp Glu Ser Cys Gln Ser Asp			
145	150	155	160
Pro Val Asn Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Phe Ala Glu Lys Ala Ala			
	165	170	175
Trp Glu Phe Leu Glu Glu Asn Arg Asp Ser Val Lys Phe Glu Leu Thr			

	180		185		190														
Ala	Val	Asn	Pro	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Pro	Gln	Met	Phe	Asp	Lys	Asp				
	195						200					205							
Val	Lys	Lys	His	Leu	Asn	Thr	Ser	Cys	Glu	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Met				
	210						215					220							
His	Leu	Ser	Pro	Glu	Asp	Lys	Ile	Pro	Glu	Leu	Phe	Gly	Gly	Tyr	Ile				
225					230					235					240				
Asp	Val	Arg	Asp	Val	Ala	Lys	Ala	His	Leu	Val	Ala	Phe	Gln	Lys	Arg				
				245					250					255					
Glu	Thr	Ile	Gly	Gln	Arg	Leu	Ile	Val	Ser	Glu	Ala	Arg	Phe	Thr	Met				
			260					265					270						
Gln	Asp	Val	Leu	Asp	Ile	Leu	Asn	Glu	Asp	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Gly				
	275						280					285							
Asn	Ile	Pro	Val	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	His	Asn	Thr	Leu				
	290						295					300							
Gly	Ala	Thr	Leu	Asp	Asn	Lys	Lys	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Gly	Phe	Lys				
305					310					315					320				
Phe	Arg	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Asp	Asp	Thr	Ala	Ser	Gln	Ile	Leu				
				325					330					335					
Lys	Phe	Glu	Gly	Arg	Ile														
			340																

<210> 4
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 哈氏噬纤维菌 (Cytophaga hutchinsonii)
 <400> 4

Met	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly	Lys				
1			5					10				15							
Ser	Ile	Cys	Leu	Tyr	Leu	His	Glu	Lys	Gly	Tyr	Ile	Val	Tyr	Gly	Thr				
			20					25				30							
Ser	Arg	Asn	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	His	Glu	Val	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile				
			35				40					45							
Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Asp	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Leu	Lys	Thr				
	50					55					60								
Ile	Ile	Asp	Ala	Glu	Gly	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly				
65					70					75				80					
Ile	Gly	Met	Leu	Gly	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Thr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys				
				85					90					95					
Glu	Val	Phe	Glu	Thr	Asn	Val	Tyr	Gly	Ile	Leu	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala				

100	105	110
Leu Asn Ser Cys Ala Lys Ala Ser Ser Val Lys Arg Val Val Val Thr		
115	120	125
Ser Ser Met Ala Ala Val Gly Tyr Asn Gly Lys Pro Arg Thr Pro Asp		
130	135	140
Val Thr Val Asp Glu Thr Trp Phe Ser Asp Pro Glu Leu Cys Glu Ala		
145	150	155
Ser Lys Met Trp Tyr Val Leu Ser Lys Thr Leu Ala Glu Asp Ala Ala		
165	170	175
Trp Lys Leu Ala Lys Glu Lys Gly Leu Asp Ile Val Thr Ile Asn Pro		
180	185	190
Ala Met Val Ile Gly Pro Leu Leu Gln Pro Thr Leu Asn Thr Ser Ala		
195	200	205
Ala Ala Ile Leu Asn Leu Ile Asn Gly Ala Lys Thr Phe Pro Asn Leu		
210	215	220
Ser Phe Gly Trp Val Asn Val Lys Asp Val Ala Asn Ala His Ile Gln		
225	230	235
Ala Phe Glu Val Pro Ser Ala Asn Gly Arg Tyr Cys Leu Val Glu Arg		
245	250	255
Val Val His His Ser Glu Ile Val Asn Ile Leu Arg Glu Leu Tyr Pro		
260	265	270
Asn Leu Pro Leu Pro Glu Arg Cys Val Asp Glu Asn Pro Tyr Val Pro		
275	280	285
Thr Tyr Gln Val Ser Lys Asp Lys Thr Arg Ser Leu Gly Ile Asp Tyr		
290	295	300
Ile Pro Leu Lys Val Ser Ile Lys Glu Thr Val Glu Ser Leu Lys Glu		
305	310	315
Lys Gly Phe Ala Gln Phe		
325		

<210> 6

<211> 236

<212> PRT

<213> 萨氏假单胞菌 (*Pseudomonas savastanoi*)

<400> 6

Met Thr Leu Ser Ser Ala Pro Ile Leu Ile Thr Gly Ala Ser Gln Arg		
1	5	10
Val Gly Leu His Cys Ala Leu Arg Leu Leu Glu His Gly His Arg Val		
20	25	30
Ile Ile Ser Tyr Arg Thr Glu His Ala Ser Val Thr Glu Leu Arg Gln		

35	40	45
Ala Gly Ala Val Ala Leu Tyr Gly Asp Phe Ser Cys Glu Thr Gly Ile		
50	55	60
Met Ala Phe Ile Asp Leu Leu Lys Thr Gln Thr Ser Ser Leu Arg Ala		
65	70	75
Val Val His Asn Ala Ser Glu Trp Leu Ala Glu Thr Pro Gly Glu Glu		
85	90	95
Ala Asp Asn Phe Thr Arg Met Phe Ser Val His Met Leu Ala Pro Tyr		
100	105	110
Leu Ile Asn Leu His Cys Glu Pro Leu Leu Thr Ala Ser Glu Val Ala		
115	120	125
Asp Ile Val His Ile Ser Asp Asp Val Thr Arg Lys Gly Ser Ser Lys		
130	135	140
His Ile Ala Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Gly Leu Glu Ser Leu Thr Leu		
145	150	155
Ser Phe Ala Ala Arg Phe Ala Pro Leu Val Lys Val Asn Gly Ile Ala		
165	170	175
Pro Ala Leu Leu Met Phe Gln Pro Lys Asp Asp Ala Ala Tyr Arg Ala		
180	185	190
Asn Ala Leu Ala Lys Ser Ala Leu Gly Ile Glu Pro Gly Ala Glu Val		
195	200	205
Ile Tyr Gln Ser Leu Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Thr Tyr Val Thr Gly		
210	215	220
Thr Thr Leu Thr Val Asn Gly Gly Arg His Val Lys		
225	230	235
<210> 7		
<211> 246		
<212> PRT		
<213> 恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)		
<400> 7		
Met Ser Leu Gln Gly Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly		
1	5	10
Ile Gly Gln Ala Ile Ala Leu Glu Leu Gly Arg Gln Gly Ala Thr Val		
20	25	30
Ile Gly Thr Ala Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ala Ala Thr		
35	40	45
Leu Lys Glu His Gly Ile Thr Gly Thr Gly Met Glu Leu Asn Val Thr		
50	55	60
Ser Ala Glu Ser Val Glu Ala Val Leu Ala Ala Ile Gly Glu Gln Phe		

65	70	75	80
Gly Ala Pro Ala Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn			
	85	90	95
Leu Met Leu Arg Met Lys Asp Asp Glu Trp Phe Asp Val Ile Asp Thr			
	100	105	110
Asn Leu Asn Ser Leu Tyr Arg Leu Ser Lys Gly Val Leu Arg Gly Met			
	115	120	125
Thr Lys Ala Arg Trp Gly Arg Ile Ile Ser Ile Gly Ser Val Val Gly			
	130	135	140
Ala Met Gly Asn Ala Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Gly			
145	150	155	160
Leu Glu Gly Phe Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val Gly Ser Arg Gly			
	165	170	175
Ile Thr Val Asn Ser Val Thr Pro Gly Phe Ile Asp Thr Asp Met Thr			
	180	185	190
Arg Glu Leu Pro Glu Ala Gln Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gln Ile Pro			
	195	200	205
Leu Gly Arg Leu Gly Gln Ala Asp Glu Ile Ala Lys Val Val Ser Phe			
	210	215	220
Leu Ala Ser Asp Gly Ala Ala Tyr Val Thr Gly Ala Thr Val Pro Val			
225	230	235	240
Asn Gly Gly Met Tyr Met			
	245		

<210> 8

<211> 262

<212> PRT

<213> 粪肠球菌 (Enterococcus faecalis)

<400> 8

Met Asp Leu Thr Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly			
1	5	10	15
Leu Gly Glu Gln Ile Cys Tyr Glu Ala Ala Lys Gln Gly Ala Val Val			
	20	25	30
Val Val Cys Ala Arg Arg Ile Asn Leu Ile Gly Lys Val Arg Glu Gln			
	35	40	45
Cys Ala Val Leu Ser Gly Arg Glu Ala Phe Ser Tyr Gln Leu Asp Ile			
	50	55	60
Ala Asp Pro Glu Ser Val Glu Arg Val Val Glu Ala Ile Ser Ala Glu			
65	70	75	80
Val Gly Pro Ile Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Phe Gly Leu Phe			

	85	90	95
Glu Asn Phe Val	Glu Ile Asp Leu	Ala Val Ala Arg	Gln Met Phe Asp
	100	105	110
Val Asn Val Leu	Gly Met Met Thr	Phe Thr Gln Lys	Val Ala Ile Lys
	115	120	125
Met Ile Glu Ala	Gly Gln Gly His	Ile Ile Asn Val	Ala Ser Met Ala
	130	135	140
Gly Lys Met Ala	Thr Ala Lys Ser	Thr Val Tyr Ser	Ala Thr Lys Phe
145	150	155	160
Ala Val Leu Gly	Phe Ser Asn Ala	Leu Arg Leu Glu	Leu Lys Pro Leu
	165	170	175
Gly Val Ala Val	Thr Thr Val Asn	Pro Gly Pro Ile	Gln Thr Glu Phe
	180	185	190
Phe Asp Lys Ala	Asp Pro Thr Gly	Thr Tyr Leu Ala	Ala Val Asp Lys
	195	200	205
Ile Val Leu Asp	Pro Thr Lys Leu	Ala Lys Glu Val	Val Gly Ser Met
	210	215	220
Gly Thr Ser Arg	Arg Glu Ile Asn	Arg Pro Phe Val	Met Glu Ala Ala
225	230	235	240
Ala Arg Phe Tyr	Thr Leu Phe Pro	His Leu Gly Asp	Phe Ile Ala Gly
	245	250	255
Asn Ile Leu Asn	Lys Lys		
	260		
<210>	9		
<211>	319		
<212>	PRT		
<213>	丁香假单胞菌 (<i>Pseudomonas syringae</i>)		
<400>	9		
Met Arg Arg Ile	Leu Ile Thr Gly	Ala Asn Gly Phe	Val Gly Gln Ile
1	5	10	15
Leu Cys Ser Met	Leu Arg Gln Ala	Gly His His Val	Ile Ala Leu Val
	20	25	30
Gly Ala Glu Ser	Ala Leu Ser Ser	His Ala Asp Glu	Ser Val Arg Cys
	35	40	45
Asp Ile Arg Asp	Ala Ser Gly Leu	Glu Gln Ala Leu	Cys Arg Ala Ala
	50	55	60
Pro Thr His Val	Val His Leu Ala	Ala Ile Thr His	Val Pro Thr Ser
65	70	75	80
Phe Asn Asn Pro	Val Leu Thr Trp	Gln Thr Asn Val	Met Gly Ser Val

	85	90	95
Asn Leu Leu Gln Ala Leu Gln Arg Ser Ala Pro Glu Ala Phe Val Leu			
	100	105	110
Phe Val Ser Ser Ser Glu Val Tyr Gly Glu Thr Phe Lys Gln Gly Thr			
	115	120	125
Ala Leu Gly Glu Asp Ser Ala Cys Lys Pro Met Asn Pro Tyr Ala Ala			
	130	135	140
Ser Lys Leu Ala Ala Glu Ala Ala Phe Asn Glu Tyr Phe Arg Gln Gly			
145	150	155	160
Arg Lys Gly Ile Val Val Arg Pro Phe Asn His Ile Gly Ala Arg Gln			
	165	170	175
Ser Pro Asp Phe Ala Thr Ala Ser Phe Ala Arg Gln Ile Ala Leu Ile			
	180	185	190
Glu Ala Gly Lys Gln Ala Pro Gln Leu Lys Val Gly Asn Leu Gln Ala			
	195	200	205
Ala Arg Asp Phe Leu Asp Val His Asp Val Cys Asp Ala Tyr Val Ala			
	210	215	220
Leu Leu Gln Leu Ala Asp Glu Gln Glu Arg Tyr Pro Gly Cys Leu Asn			
225	230	235	240
Ile Cys Arg Gly Glu Pro Thr Ser Leu Gln Thr Leu Leu Thr Gln Leu			
	245	250	255
Met Ala Leu Ser Ser Ser Val Ile Glu Val Thr Ile Asp Pro Asp Arg			
	260	265	270
Met Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Ala Phe Gly Asn Asn Ser Ala Met			
	275	280	285
Arg Cys Ala Thr Gly Trp Lys Pro Lys Thr Lys Leu Asp Asp Thr Leu			
	290	295	300
Glu Ala Leu Leu Asn Tyr Trp Arg His Glu Val Ile Ser Ala Val			
305	310	315	
<210>	10		
<211>	368		
<212>	PRT		
<213>	大麻假单胞菌 (<i>Pseudomonas cannabina</i>)		
<400>	10		
Met Ser Leu Leu Leu Glu Pro Tyr Thr Leu Arg Gln Leu Thr Leu Arg			
1	5	10	15
Asn Arg Ile Ala Val Ser Pro Met Cys Gln Tyr Ser Ser Val Asp Gly			
	20	25	30
Leu Ala Asn Asp Trp His Leu Val His Leu Gly Ser Arg Ala Val Gly			

35	40	45
Gly Ala Gly Leu Val Ile Ser Glu Ala Met Ala Val Thr Pro Asp Gly		
50	55	60
Arg Ile Thr Pro Glu Asp Leu Gly Leu Trp Asn Asp Glu Gln Ile Glu		
65	70	75
Pro Leu Gln Arg Ile Thr Arg Phe Ile Asn Thr Gln Gly Ala Val Ala		
85	90	95
Gly Ile Gln Leu Ala His Ala Gly Arg Lys Ala Ser Thr Trp Arg Pro		
100	105	110
Trp Leu Gly Lys His Gly Ser Val Pro Leu Thr Glu Gly Gly Trp Thr		
115	120	125
Pro Val Gly Pro Ser Ala Ile Ala Phe Asp Pro Gln His Thr Ala Pro		
130	135	140
Leu Gln Leu Ser Glu Thr Gln Ile Gln Glu Leu Ile Lys Ala Phe Val		
145	150	155
Asp Ser Ala Arg Arg Ala Leu Thr Ala Gly Phe Lys Val Val Glu Ile		
165	170	175
His Ala Ala His Gly Tyr Leu Leu His Gln Phe Leu Ser Pro Leu Ser		
180	185	190
Asn Gln Arg Thr Asp Gln Tyr Gly Gly Ser Phe Glu Asn Arg Ile Arg		
195	200	205
Leu Thr Leu Gln Val Thr Glu Ala Val Arg Ala Val Trp Pro Gln Glu		
210	215	220
Leu Pro Leu Phe Val Arg Val Ser Ala Thr Asp Trp Val Glu Asp Gly		
225	230	235
Trp Asn Ala Glu Glu Thr Val Glu Leu Ala Arg Arg Leu Lys Ala Leu		
245	250	255
Gly Thr Asp Leu Ile Asp Val Ser Ser Gly Gly Thr Ser Ala Asn Ala		
260	265	270
Glu Ile Pro Val Gly Pro Gly Tyr Gln Thr Arg Phe Ala Glu Gln Val		
275	280	285
Arg Lys Glu Ala Asp Ile Ala Thr Gly Thr Val Gly Met Ile Thr Asp		
290	295	300
Pro Ala Gln Ala Glu His Ile Leu Arg Thr Gly Gln Ala Asp Ile Ile		
305	310	315
Leu Leu Ala Arg Glu Leu Leu Arg Asp Pro Tyr Trp Pro Leu Arg Ala		
325	330	335
Asp Glu Asp Leu Gly Gly Arg Gln Ala Thr Trp Pro Ala Gln Tyr Gln		
340	345	350

Arg Ala Thr His Arg Asp Gln Pro Ile His Glu Ser Asp Leu Arg Asp
 355 360 365
 <210> 11
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
 <400> 11
 Met Ser Ser Ser Ser Leu Arg Val Leu Ala Ile Gly Asn Asn Pro Asn
 1 5 10 15
 Ile Leu Phe Tyr Thr Ser Arg Phe Gln Leu Ala Lys Asn Ile Asp Leu
 20 25 30
 Tyr His Val Asn Asp Ser Lys Ser Cys Gln Phe Glu Ile Glu Thr Glu
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Lys Asp Arg Phe Glu Leu Glu Asn His Phe Thr Ser Ile
 50 55 60
 Glu His Leu Thr Glu Ala Leu Ser Ser Lys Ser Ser Glu Ala Val Phe
 65 70 75 80
 Asp Ile Ile Ile Met Ser Ala Pro Ser Leu Gln Glu Leu Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Ile Ile Asp Ser Asn Thr Lys Ile Phe Leu
 100 105 110
 Glu Ser Ser Gly Phe Ile Gln Leu Glu Pro Phe Val Lys Leu Ser Met
 115 120 125
 Glu Ser Pro His Val Asn Val Phe Ser Ile Leu Thr Asp Leu Asp Ile
 130 135 140
 Arg Gln Ile Gly Pro Asn His Phe Lys His Phe Pro Ser Thr Ala Lys
 145 150 155 160
 Glu Asn Thr Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Lys Ser Ser Thr Glu Lys Tyr
 165 170 175
 Ser Ser Gly Val Ile Thr Leu Leu Thr Thr Phe Glu Lys Leu Phe Ala
 180 185 190
 Lys Leu Phe Ser Asn Ile Lys Ile Asn Leu Cys Asn Phe Ser Ser Ile
 195 200 205
 Glu Phe Leu Ser Gln Gln Trp Lys Leu Ala Ile Ser Arg Ile Cys Phe
 210 215 220
 Asp Pro Leu Leu Ile Met Phe Glu Gln Glu Asn Pro Ser Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Gln Gln Ile Ile Ala Lys Pro Leu Ile Ser Gly Leu Val Thr Glu Ile
 245 250 255

Ile Thr Val Ala Lys Thr Met Gly Ala Arg Leu Asn Ser Ser His Asp
 260 265 270
 Asn Glu Asn Ser Leu Leu Ser Leu Trp Lys Asn Ser Tyr His Ser Thr
 275 280 285
 Asn Lys Pro Pro Ala Leu Val Tyr His Phe Ile His Gln Thr Thr Pro
 290 295 300
 Leu Asn Ile Asp Ile Leu Leu Leu Gln Thr Ile Leu Leu Ala Asp Asp
 305 310 315 320
 Phe Gly Ile Lys Thr Pro Tyr Leu Glu Phe Leu Tyr Ser Val Leu Ser
 325 330 335
 Gln Phe Glu Arg Leu Asn Ser Gly
 340
 <210> 12
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> 海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)
 <400> 12
 Met Glu Tyr Arg Lys Val Gly Lys Trp Gly Val Lys Ile Ser Glu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Ser Trp Leu Thr Phe Gly Lys Gln Leu Asp Leu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Thr Glu Val Val Lys Lys Ala Phe Asn Ser Gly Ile Asn Phe Phe
 35 40 45
 Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ala Gly Gly Ile Ala Glu Ala Met Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ile Leu Lys Asn Phe Arg Arg Glu Asp Leu Val Val Ser Thr Lys
 65 70 75 80
 Ile Phe Trp Gly Gly Ser Gly Pro Asn Asp Leu Gly Leu Ser Lys Lys
 85 90 95
 His Leu Leu Glu Gly Thr Trp Asn Ser Leu Lys Arg Leu Gln Met Asp
 100 105 110
 Tyr Val Asp Ile Leu Tyr Cys His Arg Pro Asp Pro Asn Val Pro Met
 115 120 125
 Glu Glu Val Val Phe Ala Met Asp Tyr Ile Leu Arg Glu Gly Leu Ala
 130 135 140
 Leu Tyr Trp Gly Thr Ser Glu Trp Ser Ala Lys Glu Ile Glu Glu Ala
 145 150 155 160
 His Arg Val Cys Lys Glu Leu Gly Val Met Pro Pro Ile Val Glu Gln
 165 170 175

Pro Gln Tyr Asn Met Phe Val Arg Glu Arg Val Glu Lys Glu Tyr Ala
 180 185 190
 Pro Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Met Gly Leu Thr Thr Tyr Ser Pro Leu
 195 200 205
 Ala Ser Gly Leu Leu Ser Gly Lys Tyr Asn Asn Gly Ile Pro Glu Gly
 210 215 220
 Ser Arg Leu Ala Thr Phe Pro Gln Val Arg Lys Trp Leu Glu Glu Gly
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Asn Glu Lys Thr Phe Lys Lys Leu Arg Lys Leu Gln Asn
 245 250 255
 Ile Ala Asp Gln Leu Gly Ala Ser Leu Pro Gln Leu Ala Ile Ala Trp
 260 265 270
 Ile Leu Lys Asn Lys Asn Val Ser Ser Val Ile Leu Gly Val Ser Arg
 275 280 285
 Pro Glu Gln Leu Glu Glu Asn Leu Lys Ala Val Glu Ile Lys Glu Lys
 290 295 300
 Leu Thr Glu Asp Val Met Glu Glu Ile Glu Lys Ile Leu Asn Glu
 305 310 315
 <210> 13
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 放射根瘤菌 (*Agrobacterium fabrum*)
 <400> 13
 Met Thr Leu Ala Asn Leu Pro Pro Leu Val Thr Val Phe Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Phe Val Gly Arg His Val Val Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Arg Val Ala Val Arg Arg Pro Asp Leu Ala Gly Phe Leu Gln
 35 40 45
 Pro Leu Gly Asn Val Gly Gln Ile Ser Phe Ala Gln Ala Asn Leu Arg
 50 55 60
 Tyr Arg Asp Ser Ile Ile Lys Ala Val Glu Asp Ala Asp His Val Val
 65 70 75 80
 Asn Cys Val Gly Ile Leu Ala Glu Ser Gly Arg Asn Thr Phe Asp Ala
 85 90 95
 Val Gln Glu Phe Gly Ala Lys Ala Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asp Thr
 100 105 110
 Gly Ala Thr Leu Thr His Ile Ser Ala Ile Gly Ala Asp Ala Asn Ser
 115 120 125

Gln Thr Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Gly Arg Ala Glu Ala Ala Ile His
 130 135 140
 Ser Val Leu Pro Gly Ala Val Ile Leu Arg Pro Ser Ile Ile Phe Gly
 145 150 155 160
 Pro Glu Asp Asp Phe Phe Asn Lys Phe Ala Lys Met Ala Arg Asn Leu
 165 170 175
 Pro Phe Leu Pro Leu Ile Gly Gly Gly Lys Thr Lys Phe Gln Pro Val
 180 185 190
 Tyr Val Glu Asp Val Ala Glu Ala Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys
 195 200 205
 Leu Lys Pro Gly Ala Ile Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Asp Val Met Thr
 210 215 220
 Phe Arg Asp Cys Leu Glu Ala Val Leu Ala Ala Thr Tyr Arg Glu Arg
 225 230 235 240
 Ser Phe Val Asn Leu Pro Phe Gly Val Ala Ser Met Ile Gly Lys Leu
 245 250 255
 Ala Ser Leu Val Pro Leu Ile Thr Pro Pro Leu Thr Pro Asp Gln Val
 260 265 270
 Thr Met Leu Lys Lys Asp Asn Val Val Ser Ala Glu Ala Glu Lys Lys
 275 280 285
 Gly Leu Thr Leu Glu Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Arg Val Ala Ser
 290 295 300
 Val Leu Pro Ser Tyr Met Val Gln Tyr Arg Gln His Gly Gln Phe Ser
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Lys Ala Ala
 325

<210> 14

<211> 311

<212> PRT

<213> 苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*)

<400> 14

Met Thr Ala Glu Val Phe Asp Pro Arg Ala Leu Arg Asp Ala Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Thr Gly Val Thr Val Val Thr Ala Ser Asp Ala Ala Gly
 20 25 30
 Lys Pro Ile Gly Phe Thr Ala Asn Ser Phe Thr Ser Val Ser Leu Asp
 35 40 45
 Pro Pro Leu Leu Leu Val Cys Leu Ala Lys Ser Ser Arg Asn Tyr Glu
 50 55 60

Ala Thr Val Lys Arg Leu Ser Ser Gln Gly Ala Arg Val Ile Leu Asn
 20 25 30
 Val His His Glu Ile Glu Ala Thr Asp Trp Gln Ala Leu Thr Ala Glu
 35 40 45
 Tyr Pro Arg Leu Thr Gln Leu Val Gly Asp Val Ser Asp Asp Gln Ser
 50 55 60
 Ala Ala Asn Leu Ile Asp Thr Val Met Thr Asn Phe Gly Arg Leu Asp
 65 70 75 80
 Gly Leu Val Asn Asn Ala Gly Val Thr His Asp Gln Leu Leu Thr Arg
 85 90 95
 Leu His Ala Glu Asp Phe Met Ser Val Ile Gln Thr Asn Leu Leu Gly
 100 105 110
 Thr Phe Asn Met Thr Lys Tyr Ala Leu Lys Val Met Gln Arg Gln Arg
 115 120 125
 Gln Gly Ala Ile Val Asn Val Ala Ser Val Val Gly Leu His Gly Asn
 130 135 140
 Val Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ser Lys Ala Gly Ile Ile Gly Leu
 145 150 155 160
 Thr Lys Thr Thr Ala Lys Glu Ala Ala Arg Arg Gln Val Arg Cys Asn
 165 170 175
 Ala Val Ala Pro Gly Met Ile Thr Thr Ala Met Thr Ala Gln Leu Asn
 180 185 190
 Asp Arg Val Thr Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ile Pro Leu Lys Arg Phe
 195 200 205
 Gly Thr Pro Asp Glu Ile Ala Gln Ala Ile Asp Phe Leu Leu His Gln
 210 215 220
 Pro Tyr Leu Thr Gly Gln Val Leu Thr Val Asp Gly Gly Met Thr Ile
 225 230 235 240
 <210> 16
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 富克葡萄孢盘菌 (*Botryontinia fuckeliana*)
 <400> 16
 Met Arg Val Leu Leu Thr Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ala Ala His Ile
 1 5 10 15
 Leu Asp Ile Leu Leu Ser Arg Gly His Thr Val Ile Thr Thr Val Arg
 20 25 30
 Ser Gln Gln Lys Ile Asp Ala Ile Lys Ala Ala His Pro Asp Val Pro
 35 40 45

Ala Ser Lys Leu Asp Phe Phe Ile Val Glu Asp Ile Ala Lys Glu Asn
50 55 60

Ala Phe Asp Glu Cys Leu Lys Lys Phe Gly Glu Gly Leu Glu Ala Val
65 70 75 80

Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Phe Asn Val Thr Asp Thr Lys Lys
85 90 95

Asp Leu Leu Asp Pro Ala Ile Ile Gly Thr Thr Ala Ile Leu His Ala
100 105 110

Ile Lys Lys Phe Ala Pro Ser Val Thr Arg Val Val Val Thr Ser Ser
115 120 125

Phe Ala Ser Ile Ile Asp Ala Ser Lys Gly Asn Trp Pro Asp His Thr
130 135 140

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

Asn Pro Ser Asn Gly Tyr Arg Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Ala
165 170 175

Ala Trp Glu Phe Val Glu Lys Glu Asn Pro Asn Phe Thr Leu Ser Thr
180 185 190

Met Asn Pro Pro Leu Val Leu Gly Pro Ile Val His Tyr Leu Asn Ser
195 200 205

Leu Asp Ala Leu Asn Thr Ser Asn Gln Arg Val Arg Asp Val Leu Gln
210 215 220

Gly Lys Trp Lys Glu Glu Ile Pro Gly Thr Gly Thr Phe Ile Trp Ile
225 230 235 240

Asp Val Arg Asp Leu Ala Leu Ala His Val Lys Ala Ile Glu Ile Ala
245 250 255

Glu Ala Ala Gly Lys Arg Phe Phe Ile Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Asn
260 265 270

Lys Glu Ile Cys Glu Ile Ile Arg Lys Asn Phe Pro Glu Asp Gly Gly
275 280 285

Glu Leu Pro Gly Lys Glu Val Lys Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Gly Gly
290 295 300

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

Phe Arg Gly Leu Glu Glu Ser Ile Val Asp Leu Val Lys Ser Leu Lys
325 330 335

Glu Val Gly Val
340

<210> 17

<211> 243
 <212> PRT
 <213> 尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)
 <400> 17
 Met Ser Arg Asn Leu Ala Leu Val Thr Gly Ser Thr Gln Gly Ile Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ala Lys Glu Leu Ala Ile Lys His Asn Tyr Gln Val Leu
 20 25 30
 Leu Gly Val Arg Asn Thr Lys Ala Gly Glu Glu Ile Ala Ser Asp Leu
 35 40 45
 Arg Lys Glu Gly His Glu Ala Ser Val Val Glu Leu Asp Leu Thr Ser
 50 55 60
 Ala Asp Ser Ile Asp Lys Ala Val Lys His Ile Asp Glu Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Tyr Leu Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Val Leu Leu Asp Arg Gln
 85 90 95
 Glu Gly Leu Ser Thr Trp Asp Leu Phe Ser Lys Thr Phe Thr Thr Asn
 100 105 110
 Val Phe Gly Thr Gly Cys Leu Thr Gln Ser Leu Leu Pro Leu Leu Arg
 115 120 125
 Lys Ala Lys Asn Ser Pro Pro Arg Ile Val Phe Val Thr Ser Val Met
 130 135 140
 Gly Ser Leu Thr Lys Ala Thr Asp Glu Thr Thr Thr Tyr Tyr Asn Ile
 145 150 155 160
 Asp Tyr Lys Ala Tyr Asp Ala Ser Lys Ala Ala Val Asn Met Leu Met
 165 170 175
 Phe Asn Phe Ala Arg Glu Leu Asp Ala Val Gly Gly Lys Val Asn Ser
 180 185 190
 Val Cys Pro Gly Leu Val Lys Thr Gly Leu Thr Asn Tyr His Glu Trp
 195 200 205
 Gly Thr Ser Pro Glu Thr Gly Ala Glu Arg Ile Val Glu Met Ala Thr
 210 215 220
 Ile Gly Glu Asp Gly Pro Thr Lys Thr Ile Ser Asp Arg Asn Gly Glu
 225 230 235 240
 Leu Pro Leu
 <210> 18
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)

<400> 18

Met Asp Leu Gln Asn Lys Arg Val Leu Val Thr Gly Ser Thr Gln Gly
 1 5 10 15
 Ile Gly Ala Ala Thr Ala Leu Ala Phe Ala Gln Lys Gly Cys Gln Val
 20 25 30
 Leu Leu Asn Gly Arg Arg Pro Glu Leu Pro Glu Glu Ile Ala Asp Gln
 35 40 45
 Leu Glu Lys Ile Gly Ala Asp Tyr Gln Tyr Phe Ser Ala Asp Val Ser
 50 55 60
 Asp Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Phe Lys Glu Ile Gly Glu Ile Asp
 65 70 75 80
 Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Lys Asp Gln Ile Met Ile Gly
 85 90 95
 Met Lys Leu Ala Asp Phe Asp Gln Val Ile Lys Val Asn Leu Arg Ser
 100 105 110
 Ser Phe Met Leu Thr Gln Lys Ala Leu Lys Lys Met Leu Lys Lys Arg
 115 120 125
 Ser Gly Ala Ile Ile Asn Met Ala Ser Ile Val Gly Gln His Gly Asn
 130 135 140
 Ala Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ser Lys Ala Gly Val Ile Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Thr Ala Ala Lys Glu Ala Ala Gly Arg Gly Val Arg Val Asn
 165 170 175
 Ala Ile Ala Pro Gly Met Ile Ala Ser Gln Met Thr Ala Val Leu Pro
 180 185 190
 Asp Glu Val Lys Glu Gln Ala Leu Ser Gln Ile Pro Leu Ala Arg Phe
 195 200 205
 Gly Lys Ala Glu Glu Val Ala Gln Ala Ala Val Phe Leu Ala Glu Asn
 210 215 220
 Asp Tyr Val Thr Gly Gln Thr Leu Val Val Asp Gly Gly Met Thr Ile
 225 230 235 240

<210> 19

<211> 338

<212> PRT

<213> 支顶孢属(Acremonium)

<400> 19

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

	20	25	30
Arg Ser Lys Glu Lys Ala Gln Lys Ile Leu Asp Ala His Lys Ala Glu			
	35	40	45
Ala Asp Arg Leu Glu Val Ala Ile Val Pro Glu Ile Ala Arg Glu Asp			
	50	55	60
Ala Phe Asp Glu Val Val Lys Thr Pro Gly Ile Glu Val Val Ile His			
65	70	75	80
Pro Ala Ser Pro Cys His Leu Asn Phe Thr Asp Pro Gln Lys Glu Leu			
	85	90	95
Ile Asp Pro Ala Val Leu Gly Thr Thr Asn Ile Leu Arg Ala Ile Lys			
	100	105	110
Arg Asp Ala Pro Gln Val Arg Arg Val Ile Ile Thr Ser Ser Val Ala			
	115	120	125
Ala Ile Phe Asn Thr Lys Asp Pro Val Ser Thr Leu Thr Glu Gln Ser			
130	135	140	
Trp Asn Pro Asn Asp Leu Ser Asn Ile His Asp Ser Arg Ala Val Ala			
145	150	155	160
Tyr Cys Val Ser Lys Thr Leu Ala Glu Arg Ala Ala Trp Asp Tyr Val			
	165	170	175
Asp Gln Glu Lys Pro Asn Phe Asp Leu Val Thr Val Asn Pro Pro Leu			
	180	185	190
Val Leu Gly Pro Val Val Gly His Phe Ser Asn Val Asp Ser Ile Asn			
	195	200	205
Ala Ser Asn Glu Cys Leu Ala Asn Leu Val Arg Gly Lys Trp Arg Asp			
	210	215	220
Glu Ile Pro Pro Thr Gly Pro Val Asn Ile Trp Ile Asp Val Arg Asp			
225	230	235	240
Val Ala Ala Ala His Val Arg Ala Met Glu Arg Gln Glu Ala Gly Gly			
	245	250	255
Lys Arg Leu Phe Thr Val Gly Gly Arg Phe Ser Tyr Thr Lys Ile Ala			
	260	265	270
Glu Ile Val Arg Glu His Gly Pro Asp Arg Phe Lys Asp Lys Met Pro			
	275	280	285
Arg Ala Glu Ala Arg Ser Gly Asp Ala Asn Tyr Thr Gly Pro Val Leu			
	290	295	300
Lys Phe Asp Asn Gly Glu Thr Asn Arg Ile Leu Gly Ile Glu Trp Thr			
305	310	315	320
Pro Leu Glu Lys Ser Val Leu Asp Phe Val Glu Ser Ile Lys Glu Phe			
	325	330	335

Asp Leu
 <210> 20
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 木霉属(Tricoderma)
 <400> 20
 Met Thr Lys Val Leu Leu Thr Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ala Ala His
 1 5 10 15
 Ile Leu Glu Gln Leu Leu Ala Lys Asn Tyr Thr Val Ile Thr Thr Val
 20 25 30
 Arg Thr Lys Ser Lys Ala Asp Leu Ile Lys Glu Ala His Ala Asp Leu
 35 40 45
 Val Lys Ser Gly Arg Leu Ser Val Ala Ile Val Pro Asp Ile Ala Val
 50 55 60
 Leu Ser Ala Phe Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Ala Ser Gly Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Asp Leu Glu Tyr Val Val His Thr Ala Ser Pro Leu Phe Phe Thr
 85 90 95
 Phe Thr Asp Ala Gln Lys Glu Ile Ile Thr Pro Ala Leu Asn Gly Thr
 100 105 110
 Arg Gly Ile Leu Glu Ala Val Lys Arg Ser Ala Pro Lys Val Lys Arg
 115 120 125
 Val Val Ile Thr Ser Ser Phe Ala Ala Ile Leu Ser Glu Asp Asp Phe
 130 135 140
 Thr Asn Pro Asn Ala Thr Phe Ser Glu Ser Ser Trp Asn Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Lys Asp Ala Asn Arg Ser Ile Ala Thr Gly Tyr His Val Ser Lys
 165 170 175
 Val Glu Ser Glu Arg Leu Ala Trp Asp Phe Ile Lys Asn Glu Lys Pro
 180 185 190
 Asn Phe Asp Leu Val Thr Val Asn Pro Pro Leu Val Leu Gly Pro Val
 195 200 205
 Ala His Ser Leu Ala Ser Val Asp Ala Ile Asn Ala Ser Asn Glu Arg
 210 215 220
 Ile Ala Asp Leu Leu Arg Gly Lys Trp Lys Ala Glu Ile Pro Glu Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Asp Leu Tyr Ile Asp Val Arg Asp Thr Ala Lys Ala His
 245 250 255
 Ile Lys Ala Leu Glu Leu Pro Glu Ala Ser Gly His Arg Leu Phe Pro

145	150	155	160
Tyr Arg Gly Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Ala Ala Trp Glu Phe Val			
	165	170	175
Glu Arg Glu Lys Pro Asn Phe Thr Leu Thr Val Leu Asn Pro Pro Val			
	180	185	190
Ser His Phe Leu Phe Ser Arg His Lys Asp Val Ala Val Thr Phe Phe			
	195	200	205
Ser Asp Ser Phe Gln His Cys Arg Trp Ser Thr Ala Arg Ser Cys Thr			
	210	215	220
Pro Trp His His Trp Thr Ile Ser Thr Pro Arg Ala Ser Glu Ser			
225	230	235	

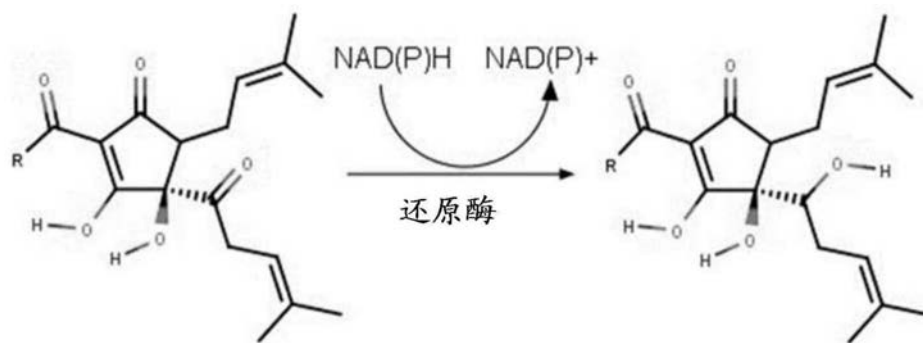
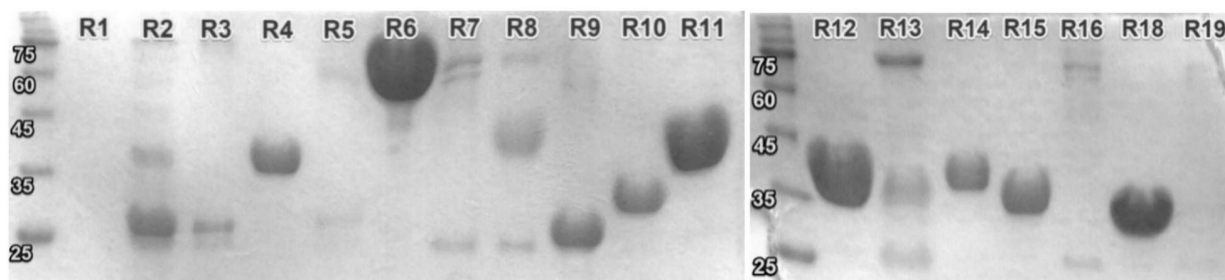
图1. 异 α 酸的代表性差向异构体的酶催化还原

图2. 所有纯化的还原酶的SDS-PAGE分析。

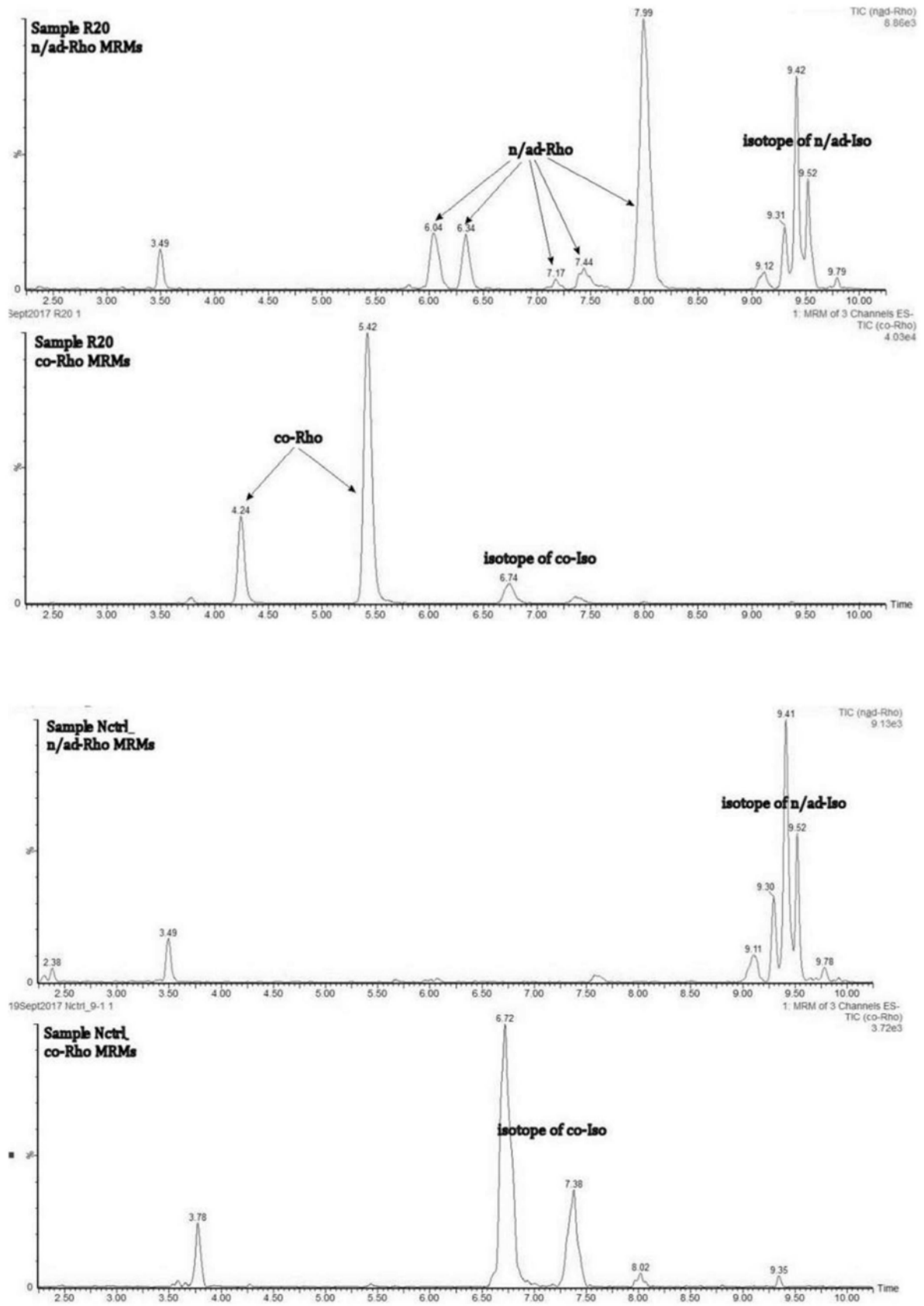


图3. 在30℃下与还原酶R20一起孵育24小时 (顶部两个图) 和与还原酶R20一起孵育 (底部两个图) 的异α酸的UPLC色谱图。

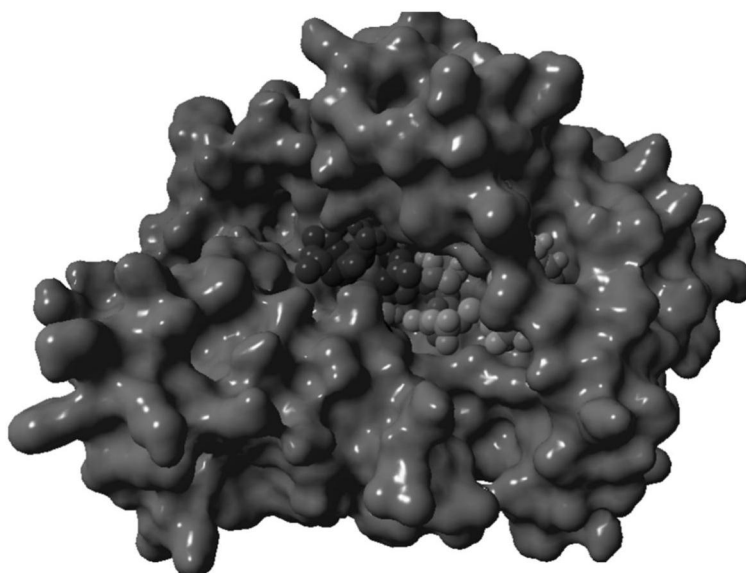


图4. 还原酶R17 (深灰色, 表面呈现) 的结构模型, 其中代表性底物 (反-异萹草酮, 黑色) 和辅因子 (NADPH, 浅灰色) 结合到活性位点空腔。

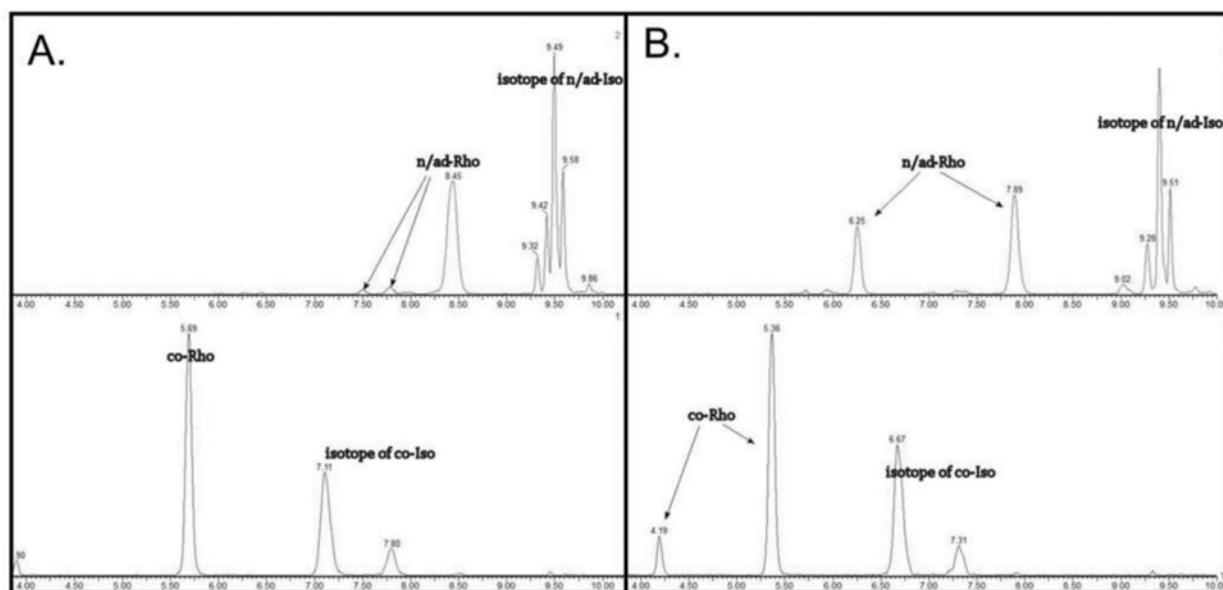


图5. (A) 仅产生二氢-(ρ)-异 α 酸的一种非对映体的酮还原酶和 (B) 产生二氢-(ρ)-异 α 酸的两非对映体的酮还原酶的UPLC色谱图。

