



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104364377 B

(45)授权公告日 2017.12.22

(21)申请号 201380029844.2

(22)申请日 2013.04.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104364377 A

(43)申请公布日 2015.02.18

(30)优先权数据

10-2012-0036372 2012.04.06 KR

10-2012-0056029 2012.05.25 KR

10-2013-0005814 2013.01.18 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/002885 2013.04.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/151393 KO 2013.10.10

(73)专利权人 梨花女子大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

(72)发明人 朴震昞 宋知爱 全恩瑛

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

(51)Int.Cl.

C12N 15/53(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12P 7/06(2006.01)

(56)对比文件

US 2010285545 A1, 2010.11.11,

CN 101392233 A, 2009.03.25,

CN 1495215 A, 2004.05.12, (续)

审查员 黄磊

权利要求书1页 说明书10页

序列表5页 附图12页

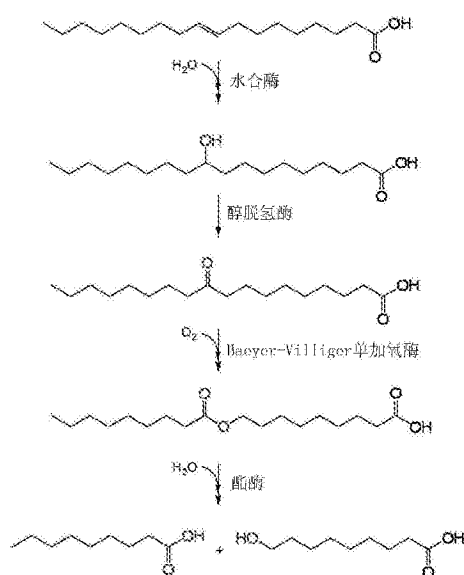
(54)发明名称

通过生物转化从长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸的方法

(57)摘要

本发明涉及被转化以便表达Baeyer-Villiger单加氧酶(BVMO)的转化体,使用该转化体通过生物转化从 C_{16} - C_{20} 长链脂肪酸产生 C_5 - C_{14} 中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇的方法,使用BVMO从脂肪酮酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物的方法,和通过该方法制备的新型 ω -羟基脂肪酸。使用本发明能够表达BVMO的转化体,通过生物转化,通过降解包含在培养基中的 C_{16} - C_{20} 长链脂肪酸可能大量生产降解产物,例如 C_5 - C_{14} ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸、醇和类似物,并因此,本发明可以广泛用于更安全和更经济的生产

ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

CN 101580815 A, 2009.11.18,

Anett Kirschner et al..Design of a secondary alcohol degradation pathway from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in an engineered *Escherichia coli*.《Appl Microbiol Biotechnol》.2007,第75卷1095-1101.

Jessica Rehdorf et al..Cloning, expression and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440.《Biotechnol Lett》.2007,第29卷1393-1398.

Yurui Ji et al..Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases.《Frontiers in microbiology》.2013,第4卷1-13.

Anett Kirschner et al..Cloning, expression, and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *E. coli*.《Appl Microbiol Biotechnol》.2007,第73卷1065-1072.

姜标 等.Baeyer-Villiger 单加氧酶在有机合成中的应用.《有机化学》.2005,第25卷(第10期),1198-1207.

Yong Cheol Park et al..Microbial formation of esters.《Appl Microbiol Biotechnol》.2009,第85卷13-25.

Ji-Won Song et al..Multistep Enzymatic Synthesis of Long-Chain α,ω -Dicarboxylic and ω -Hydroxycarboxylic Acids from Renewable Fatty Acids and Plant oils.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2013,第52卷(第9期),2534-2537.

1. 一种引入油酸水合酶编码基因、醇脱氢酶编码基因、衍生自恶臭假单胞菌的BVM0编码基因和酯水解酶编码基因的转化微生物,其中所述微生物具有从油酸产生 ω -羟基壬酸的能力。

2. 一种引入油酸水合酶编码基因、醇脱氢酶编码基因、衍生自荧光假单胞菌的BVM0编码基因和酯水解酶编码基因的转化微生物,其中所述微生物具有从油酸产生 α, ω -癸二酸的能力。

3. 一种引入油酸水合酶编码基因、醇脱氢酶编码基因、衍生自恶臭假单胞菌的BVM0编码基因和酯水解酶编码基因的转化微生物,其中所述微生物具有从蓖麻油酸产生 ω -羟基十一碳-9-烯酸的能力。

4. 一种引入油酸水合酶编码基因、醇脱氢酶编码基因、衍生自恶臭假单胞菌的BVM0编码基因和酯水解酶编码基因的转化微生物,其中所述微生物具有从羟基廿碳烯酸产生 ω -羟基十三碳-11-烯酸的能力。

5. 一种引入油酸水合酶编码基因、两种不同的醇脱氢酶编码基因、衍生自荧光假单胞菌的BVM0编码基因和酯水解酶编码基因的转化微生物,其中所述微生物具有从油酸产生 α, ω -壬二酸的能力。

6. 根据权利要求5所述的微生物,其中氨基转移酶编码基因进一步被引入以从油酸产生 ω -氨基壬酸。

7. 一种从长链脂肪酸产生降解产物的方法,其包含

- (a) 将权利要求1-6中任一项所述的转化微生物与长链脂肪酸反应以获得反应物;和
- (b) 从所述反应物回收降解产物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述长链脂肪酸是油酸、蓖麻油酸、或羟基廿碳烯酸。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述降解产物是 ω -羟基壬酸、 α, ω -癸二酸、 ω -羟基十一碳-9-烯酸、 α, ω -壬二酸、或 ω -氨基壬酸。

通过生物转化从长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α, ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸的方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及通过生物转化从长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α, ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸的方法。更具体而言,本发明涉及被转化以表达Baeyer-Villiger单加氧酶(BVMO)的转化体,使用该转化体通过生物转化从C16-C20长链脂肪酸产生C5-C14中链 ω -羟基脂肪酸、 α, ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇的方法,使用BVMO从脂肪酮酸产生具有酯基引入其链中的脂肪酸衍生物的方法,和通过该方法制备的新型 ω -羟基脂肪酸。

【背景技术】

[0002] ω -羟基脂肪酸是在脂肪酸末端具有羟基的脂肪酸($\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$)。其作为单体用于聚乙烯基塑料的生产,并广泛用于乳化剂、粘合剂或涂料的生产和化妆品或药品的制备。 ω -羟基脂肪酸也可作为前体用于长链二羧酸的合成,所述长链二羧酸广泛用于聚酰胺、聚酯基塑料、化妆品和家居用品的生产。

[0003] 中链 α, ω -二羧酸($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$)和 ω -氨基脂肪酸($\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$)作为单体用于聚酰胺、聚酯塑料等的生产,并且也用于乳化剂、防冻剂、油漆和涂料的生产。进一步地,其具有多种的生理活性,例如抗菌活性等,并且因此广泛用于化妆品、食品和家居用品的生产。例如,C10中链二羧酸——癸二酸($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$)的年产量超过50,000MT,并且其用于塑料、蜡烛、化妆品、乳化剂、防冻剂和腐蚀抑制剂的生产。进一步地,由于其抗菌活性,癸二酸用于痤疮治疗药物或化妆品和家居用品的生产。

[0004] 这类的中链 ω -羟基脂肪酸、 α, ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸在自然界中稀有发现,并且因此是通过化学合成工业生产的。化学合成存在需要高温和高压、强酸和/或引起严重环境问题的有毒氧化物的问题(美国专利号5,952,517、6,392,074、5,420,316和20110105774)。例如,通过化学裂解,从蓖麻油酸产生癸二酸(美国专利号5,952,517和6,392,074)。然而,蓖麻油酸的化学裂解需要处于200-300°C或更高温度下的高温过程,和使用例如硫酸的强酸,以及使用例如重金属离子催化剂、有机溶剂等的有毒物质。问题在于,该过程是危险的,且在生产后产生大量的环境污染物。

[0005] 壬二酸——C9中链二羧酸,通过油酸的臭氧分解产生(美国专利号5,420,316)。然而,通过上述技术产生壬二酸需要使用强氧化剂臭氧,其产生多种副产物。因此,使用重金属催化剂的分离/纯化过程对除去其产生的副产物是必不可少的。由于包括复杂的分离/纯化过程、环境污染和过度能量使用在内的许多其它问题,研究这些问题的解决方案具有增长的需求。因此,活跃的研究集中在简单和环境友好的生产方法,和在该方法中使用生物催化过程上。例如,使用酶从长链脂肪酸产生长链 ω -羟基脂肪酸的方法和从石油复合烃产生中链二羧酸的生产方法已经被开发。然而,使用酶从可再生的长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α, ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇的方法还没有被开发。

[0006] 本发明人近来证明BVMO能够转化源自C16-C20长链脂肪酸的脂肪酮酸为具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物,其可被酯水解酶裂解,并且他们发现利用引入BVMO基因的转化

微生物,可从长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸、醇等,从而完成本发明。

[0007] 【技术方案】

[0008] 本发明的目的是提供一种能够表达BVM0的转化体。

[0009] 本发明的另一个目的是提供使用转化体通过生物转化,从长链脂肪酸产生多种降解产物的方法。

[0010] 本发明的仍另一个目的是提供化学式1表示的 ω -羟基脂肪酸,其通过上述方法制备。

[0011] 【有益效果】

[0012] 使用本发明能够表达BVM0的转化体,通过生物转化,从包含在培养基中的C16-C20长链脂肪酸可大量产生例如C5-C14 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸、醇的降解产物。因此,其可以以更安全和经济的方式广泛用于产生 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇。

[0013] 【附图描述】

[0014] 图1a是显示使用水合酶、醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶,从长链脂肪酸(C18油酸)产生中链 ω -羟基脂肪酸(C9 ω -羟基壬酸)的连续反应步骤的示意图;

[0015] 图1b是显示使用醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶,从长链脂肪酸(C18蓖麻油酸)产生中链 ω -羟基脂肪酸(C11 ω -羟基十一碳-9-烯酸)的连续反应步骤的示意图;

[0016] 图1c是显示使用醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶,从长链脂肪酸(C20羟基廿碳烯酸(lesquerolic acid))产生 ω -羟基脂肪酸(C13 ω -羟基十三碳-11-烯酸)的连续反应步骤的示意图;

[0017] 图1d是显示使用水合酶、醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶,从长链脂肪酸(C18油酸)产生 α , ω -二羧酸(C10 α , ω -癸二酸)和辛醇的连续反应步骤的示意图;

[0018] 图1e是显示使用水合酶、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)源醇脱氢酶、BVM0、酯水解酶和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)源醇脱氢酶,从长链脂肪酸(C18油酸)产生 α , ω -二羧酸(C9 α , ω -壬二酸)的连续反应步骤的示意图;

[0019] 图1f是显示使用水合酶、藤黄微球菌源醇脱氢酶、BVM0、酯水解酶、恶臭假单胞菌源醇脱氢酶和氨基转移酶,从长链脂肪酸(C18油酸)产生 ω -氨基脂肪酸(C9 ω -氨基壬酸)的连续反应步骤的示意图;

[0020] 图2显示使用本发明的表达油酸水合酶、醇脱氢酶和BVM0的转化体,从油酸产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的生产变化,和显示酯水解产物的GC/MS分析结果的图;

[0021] 图3显示使用本发明的表达醇脱氢酶和BVM0的转化体,从蓖麻油酸产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的生产变化,和显示酯水解产物的GC/MS分析结果的图;

[0022] 图4显示产物的GC/MS分析结果,所述产物来自酯水解酶与具有酯基引入其链的脂肪酸的反应,该脂肪酸使用本发明的表达醇脱氢酶和BVM0的转化体,从羟基廿碳烯酸产生;

[0023] 图5显示使用本发明的表达油酸水合酶、醇脱氢酶和BVM0的转化体,从油酸产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的生产变化,和显示酯水解产物(癸二酸)的GC/MS分析结果的图;

[0024] 图6是显示反应产物的产量随时间的图,所述反应产物来自向具有酯基引入其链

的脂肪酸加入表达酯水解酶和恶臭假单胞菌源醇脱氢酶的转化体,该脂肪酸使用本发明的表达油酸水合酶、藤黄微球菌源醇脱氢酶和BVM0的转化体,从油酸产生。

[0025] 图7是显示使用本发明的表达油酸水合酶、藤黄微球菌源醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶、恶臭假单胞菌源醇脱氢酶的转化体,从蓖麻油酸产生的 α, ω -十一碳-2-烯二酸(顺-2-十一碳烯-1,11-二酸)随时间的生产变化的图;和

[0026] 图8是显示反应产物的产量随时间的图,所述反应产物来自向具有酯基引入其链的脂肪酸加入表达酯水解酶、恶臭假单胞菌源醇脱氢酶和氨基转移酶的转化体,该脂肪酸使用本发明的表达油酸水合酶、藤黄微球菌源醇脱氢酶和BVM0的转化体,从油酸产生。

[0027] 【最佳方式】

[0028] 在为了实现上述目的的一方面,本发明提供了引入BVM0 (Baeyer-Villiger单加氧酶)基因的转化体。

[0029] 如本文使用的术语“BVM0 (Baeyer-Villiger单加氧酶)”指一种单加氧酶,其催化多种氧化反应,包括通过酮氧化产生内酯或酯化合物的Baeyer-Villiger氧化。至于本发明的目的,只要BVM0在转化体中表达并能够催化从脂肪酮酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物的反应(例如自10-酮硬脂酸产生10-(辛氧基)-10-氧代癸酸),BVM0可以是,但不被具体限制为,优选地,衍生自下述微生物的BVM0:例如假单胞菌属某种菌株、红球菌属(*Rhodococcus*)某种菌株、短杆菌属(*Brevibacterium*)某种菌株、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)某种菌株、不动杆菌属(*Acinetobacter*)某种菌株、节杆菌属(*Arthrobacter*)某种菌株、短单胞菌属(*Brachymonas*)某种菌株等;更优选地,衍生自恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、维罗纳假单胞菌(*Pseudomonas veronii*)、红球菌属(*Rhodococcus jostii*)或假单胞菌属某种菌株HI-70的BVM0;和最优选地,衍生自恶臭假单胞菌的BVM0。BVM0编码基因的核苷酸序列可从已知的数据库获得,例如NCBI的GenBank,并且由GenBank登记号CAFK01000010表示的基因例证,其是从准备用于BVM0基因表达等的表达载体pJOE-KT2440BVM0 (Biotechnol.Lett., 29:1393-1398, 2007)获得的基因;并且优选为,能够编码SEQ ID NO.9等的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0030] 此外,一个或多个氨基酸(可依据氨基酸残基在蛋白质三维结构中的位置和氨基酸残基的类型而改变,具体是2-20个,优选是2-10个,更优选是2-5个氨基酸)的置换、缺失、插入、添加或者倒位可包含在BVM0氨基酸序列的一个或多个位置处,只要在转化体中该序列能够表达具有催化从脂肪酮酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物的反应的能力的BVM0。只要它能够保持和提高BVM0活性,也包括与BVM0的氨基酸序列具有80%或更多,优选地90%或更多,更优选地95%或更多,甚至更优选地97%或更多同源性的氨基酸序列。因为依据微生物的物种和菌株,显示多肽活性的酶的氨基酸序列可不同,所以置换、缺失、插入、添加或倒位氨基酸也包含自然发生的突变序列或人工突变序列——如果其基于具有BVM0活性的个体之间或不同微生物物种之间的差异,但不具体限制于此。

[0031] 如本文使用的术语“同源性”,指两种不同氨基酸序列或两种不同核苷酸序列之间的同一性,并且可以通过本领域普通技术人员众所周知的方法判定,例如BLAST 2.0,其计算例如分数、同一性和相似性的参数,但不具体限制于此。

[0032] 如本文使用的术语“转化体”,指细胞或微生物,其在通过载体向宿主引入编码期望蛋白质的多核苷酸后突变以表达期望的蛋白质。就这一点而言,被引入宿主细胞的多核

苷酸可具有任何形式,只要其可以被引入宿主细胞并在其中表达。

[0033] 本发明中提供的转化体可通过在宿主细胞中引入带有已知的编码BVM0的多核苷酸序列的表达载体或已知的表达载体pJOE-KT2440BVM0 (Biotechnol.Lett.,29:1393-1398,2007) 制备。就这一点而言,待使用的宿主细胞没有被具体限定,只要其引入了本发明的编码BVM0的多核苷酸序列,从而表达BVM0。优选地,宿主细胞可以是适合于生物转化过程的可培养的单细胞原核或真核细胞,和更优选的大肠杆菌、酵母等等,和最优选的大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞。

[0034] 通过裂解包含在培养基中的C16-C20长链脂肪酸,本发明的转化体可用于C5-C14中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸的产生。为此,除了编码BVM0的基因之外,编码水合酶或脂氧合酶的基因、编码醇脱氢酶的基因、编码酯水解酶(酯酶)的基因和编码氨基转移酶的基因也可进一步引入。

[0035] 如本文使用的术语“水合酶”指通过对碳双键添加水可逆地生产羟基化合物的酶,因其通过逆反应催化从羟基化合物去除水,所以也被叫做脱水酶。水合酶可优选地衍生自以下菌株,例如嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)、溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)等,但不具体限制于此。至于本发明的目的,水合酶可通过对C16-C20长链脂肪酸添加羟基,用于生产羟基脂肪酸的目的。

[0036] 如本文使用的术语“脂氧合酶”指对不饱和脂肪酸添加分子氧的加氧酶和通过识别不饱和脂肪酸的顺,顺-1,4-戊二烯结构,用于从亚甲基立体有择的提取氢原子和异侧氧插入,生产氢过氧化物的酶。至于本发明的目的,与上述的水合酶一样,脂氧合酶可用于通过对C16-C20长链脂肪酸添加羟基生产羟基脂肪酸的目的。

[0037] 如本文使用的术语“醇脱氢酶”指催化从醇中去除氢以产生醛、酮或羧酸的反应的酶。醇脱氢酶可优选的衍生自藤黄微球菌、假单胞菌属某种菌株,但不具体限制于此。至于本发明的目的,醇脱氢酶可通过从通过水合酶或脂氧合酶产生的羟基脂肪酸去除氢,用于产生脂肪酮酸的目的,或用于从通过酯水解酶产生的 ω -羟基脂肪酸产生 ω -氧代脂肪酸(oxofatty acid)或 α , ω -二羧酸的目的。

[0038] 如本文使用的术语“酯水解酶(酯酶)”指水解酯化合物中的酯键的酶。至于本发明的目的,该酯水解酶可用于裂解通过BVM0产生的具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物的酯基的目的。

[0039] 如本文使用的术语“氨基转移酶”指转化 ω -氧代脂肪酸的氧基为氨基的酶。氨基转移酶可衍生自微生物,但不具体限制为,优选地如下菌株:例如青紫色素杆菌(*Chromobacterium violaceum*)、高空芽孢杆菌(*Silicibacter pomeroyi*)、类球红球菌(*Rhodococcus sphaeroides*)、*Mesorhizobium lotimaff*、*Silicibacter*某种等。至于本发明的目的,氨基转移酶可用于从醇脱氢酶产生的 ω -氧代脂肪酸产生 ω -氨基脂肪酸的目的,和优选地,用于从C9、C11、C12和C13 ω -氧代脂肪酸产生 ω -氨基脂肪酸的目的。

[0040] 根据本发明的一个实施方式,将包含衍生自嗜麦芽寡养单胞菌的油酸水合酶基因和衍生自藤黄微球菌的醇脱氢酶基因的pACYC/油酸水合酶/醇脱氢酶表达载体引入大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株来制备表达水合酶和醇脱氢酶的初级转化体,和将为表达衍生自恶臭假单胞菌的BVM0基因的载体的pJOE-KT2440BVM0引入初级转化体来制备能够同时表达油酸水

合酶、醇脱氢酶和BVMO的次级转化体(实施例1)。

[0041] 在为实现本发明上述目的的另一个方面,本发明提供了使用转化体通过生物转化,从长链脂肪酸产生多种降解产物的方法。

[0042] 特别地,本发明的从长链脂肪酸产生降解产物的方法包括以下步骤:(a) 将长链脂肪酸与引入BVMO编码基因的转化体反应以获得反应物;和(b) 从反应物中回收降解产物。就这一点而言,降解产物可以是中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇。优选地,降解产物可以是C5-C14中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或C2-C14正醇,更优选为 ω -羟基壬酸、 ω -羟基十一碳-9-烯酸、 ω -羟基十三碳-11-烯酸、 α , ω -壬二酸(壬二酸)、 α , ω -癸二酸(癸二酸)、 ω -氨基壬酸、庚酸、壬酸、 ω -羟基十一烷酸、 ω -羟基十三烷酸、 α , ω -十一碳-2-烯二酸(顺-2-十一碳烯-1,11-二酸)、 ω -氨基十一碳-9-烯酸、 α , ω 十三碳-2-烯二酸、正辛醇等。

[0043] 就这一点而言,长链脂肪酸可以是,但不具体限制为,优选的C16-C20直链脂肪酸,和更优选的油酸、蓖麻油酸、12-羟基硬脂酸、亚油酸、棕榈油酸、羟基廿碳烯酸等。

[0044] 进一步地,上述反应意味酶促反应,其通过将用作底物的长链脂肪酸与通过转化体产生的多种酶例如水合酶、脂氧合酶、醇脱氢酶、酯水解酶、氨基转移酶反应催化长链脂肪酸的裂解和降解,或转移氨基。由转化体产生的一系列酶在转化体内产生,并且该产生的酶从转化体分泌出来。因此,该反应可在转化体内或外发生。例如,当转化体在包含碳源的培养基中培养时,在培养基中预定量的碳源消耗后,长链脂肪酸被添加至培养基,并且通过从转化体产生的酶催化长链脂肪酸的裂解和降解或氨基转移,从而产生多种降解产物;将转化体加入包含长链脂肪酸的反应缓冲溶液中,并催化裂解和降解长链脂肪酸或氨基转移,从而产生多种降解产物;或从转化体分离每一种酶,并且将分离的酶分别固定在支持物上,然后将其加入包含长链脂肪酸的反应缓冲溶液中,并且通过固定化的酶催化长链脂肪酸的裂解或降解,从而产生多种降解产物。就这一点而言,培养基或缓冲溶液中的长链脂肪酸含量可以是,但不具体限制为,优选地加至0.1-100g/L的终浓度。

[0045] 如本文使用的术语“培养”指在人工控制的环境条件下培养微生物。在本发明中,培养转化体的方法可采用本领域众所周知的方法。特别地,培养方法的实例包括分批法、进料分批或以连续方式的反复进料分批法,但不限制于此。

[0046] 用于培养物的培养基应以适当方式符合具体菌株的要求,同时控制温度、pH等,处于需氧条件下在包含适当的碳源、氮源、氨基酸、维生素等的典型培养基中。待使用的碳源可包括糖类——例如葡萄糖、蔗糖和乳糖——、脂肪酸、甘油。这些材料可分开或组合使用。待使用的氮源可以包括无机氮源,例如氨、硫酸铵、氯化铵和磷酸铵;和有机氮源,例如氨基酸,其包括谷氨酸、蛋白胨、肉膏、酵母提取物、麦芽汁、玉米浆、酪蛋白水解物等。这些氮源可分开或组合使用。为了维持需氧条件,氧或含氧气体(例如空气)被引入培养液中。培养液的温度正常为15°C-37°C,优选为20°C-30°C,且该培养进行10-100小时。

[0047] 此外,从反应溶液回收降解产物例如中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸、醇的步骤,可通过本领域中已知的方法执行,例如透析、离心、过滤、溶剂萃取、层析、结晶等。例如,在通过离心反应溶液移出转化体后获得的上清液可应用溶剂萃取来回收期望的降解产物。另外,任何方法都可以非限制地使用,只要降解产物通过适用于每种降解产物特性的已知实验方法组合回收。

[0048] 当本发明中提供的水合酶编码基因、醇脱氢酶编码基因、BVM0编码基因、酯水解酶编码基因和氨基转移酶编码基因以不同的组合被引入宿主细胞时,可制备具有不同功能的多种转化体,并且制备的每种转化体能够从存在于培养基或反应溶液中的C16-C20长链脂肪酸(油酸、蓖麻油酸、亚油酸、羟基廿碳烯酸等)产生C5-C14中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇。

[0049] 例如,通过向大肠杆菌中引入醇脱氢酶编码基因和BVM0编码基因制备的转化体能够转化长链脂肪酸为具有酯基引入其链的长链脂肪酸。当转化体进一步单独或组合包括酯水解酶、醇脱氢酶或氨基转移酶时,具有酯基引入其链的长链脂肪酸可被转化为多种类型的中链 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸或醇。

[0050] 在本发明的一个实施方式中,能够表达水合酶、醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶的转化体可从长链脂肪酸例如油酸(C18)产生中链 ω -羟基脂肪酸例如 ω -羟基壬酸(C9),在其中水合酶转化长链脂肪酸为羟基脂肪酸,醇脱氢酶通过从转化的羟基脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVM0氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,和酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生中链 ω -羟基脂肪酸(图1a)。

[0051] 在本发明的另一个实施方式中,能够表达醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶的转化体可从羟基长链脂肪酸例如蓖麻油酸(C18)产生中链 ω -羟基脂肪酸例如 ω -羟基十一碳-9-烯酸(C11),在其中醇脱氢酶通过从羟基长链脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVM0氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,和酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生中链 ω -羟基脂肪酸(图1b)。

[0052] 在本发明的仍另一个实施方式中,能够表达醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶的转化体可从羟基长链脂肪酸例如羟基廿碳烯酸(C20)产生中链 ω -羟基脂肪酸例如 ω -羟基十三碳-11-烯酸(C13),在其中醇脱氢酶通过从羟基长链脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVM0氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,和酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生中链 ω -羟基脂肪酸(图1c)。

[0053] 在本发明的仍另一个实施方式中,能够表达水合酶、醇脱氢酶、BVM0和酯水解酶的转化体可从长链脂肪酸例如油酸(C18)产生 α , ω -二羧酸例如 α , ω -癸二酸(C10)和辛醇(C8),在其中水合酶将长链脂肪酸转化为羟基脂肪酸,醇脱氢酶通过从转化的羟基脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVM0氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,和酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生 α , ω -二羧酸和醇(图1d)。

[0054] 在本发明的仍另一个实施方式中,能够表达水合酶、藤黄微球菌源的醇脱氢酶、BVM0、酯水解酶和恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶的转化体可从长链脂肪酸例如油酸(C18)产生 α , ω -二羧酸例如 α , ω -壬二酸(C9),在其中水合酶将长链脂肪酸转化为羟基脂肪酸,藤黄微球菌源的醇脱氢酶通过从转化的羟基脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVM0氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生 ω -羟基脂肪酸,和恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶通过去除 ω -羟基脂肪酸的氢产生 α , ω -二羧酸(图1e)。

[0055] 在本发明的仍另一个实施方式中,能够表达水合酶、藤黄微球菌源的醇脱氢酶、BVM0、酯水解酶、恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶和氨基转移酶的转化体可从长链脂肪酸例如

油酸(C18)产生 ω -氨基脂肪酸例如 ω -氨基壬酸(C9),在其中水合酶将长链脂肪酸转化为羟基脂肪酸,藤黄微球菌源的醇脱氢酶通过从转化的羟基脂肪酸去除氢产生脂肪酮酸,BVMO氧化产生的脂肪酮酸来产生具有酯基引入其链的长链脂肪酸,酯水解酶水解产生的具有酯基引入其链的长链脂肪酸的酯键,从而产生 ω -羟基脂肪酸,恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶通过从 ω -羟基脂肪酸去除氢产生 ω -脂肪酮酸,和氨基转移酶转移氨基至产生的 ω -脂肪酮酸,从而产生 ω -氨基脂肪酸(图1f)。

[0056] 同时,从长链脂肪酸产生的 ω -羟基脂肪酸可被恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶转化为 α , ω -二羧酸(实施例5和6),或通过与氨基转移酶的连续反应转化为 ω -氨基脂肪酸(实施例7)。

[0057] 由转化体产生的C5-C14 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸和醇分泌到培养基或反应缓冲溶液中。因此,当转化体被固定在固定化支持物上或转化体在进料分批或连续模式下培养时,C5-C14 ω -羟基脂肪酸、 α , ω -二羧酸、 ω -氨基脂肪酸和醇可大量产生。

[0058] 根据本发明的一个实施方式,嗜麦芽寡养单胞菌源的油酸水合酶基因和藤黄微球菌源的醇脱氢酶基因被引入大肠杆菌BL21(DE3)来制备表达水合酶、醇脱氢酶的转化体,并且荧光假单胞菌源的BVMO基因被引入转化体来制备表达水合酶、醇脱氢酶和BVMO的转化体(实施例4)。进一步地,表达水合酶、醇脱氢酶、BVMO的转化体被培养并与油酸反应。结果,10-羟基硬脂酸、10-酮硬脂酸和具有酯基引入其链的脂肪酸被产生(图5),并且荧光假单胞菌源的酯水解酶加入其中,从而产生 α , ω -癸二酸和辛醇。

[0059] 在为实现本发明上述目的的仍另一个方面,本发明提供了由下面的化学式1表示的新型的 ω -羟基脂肪酸,其由上述方法制备。

[0060] 化学式I



[0062] 上述化合物可通过上述方法制备。例如,培养表达油酸水合酶、醇脱氢酶和BVMO的转化体,然后将其与羟基廿碳烯酸反应以产生具有酯基引入其链的脂肪酸,并且荧光假单胞菌源的酯水解酶被加入并与产生的具有酯基引入其链的脂肪酸反应,从而产生新型的化学式1的 ω -羟基脂肪酸。这样产生的该新型 ω -羟基脂肪酸可通过GC/MS分析以检查其结构。

[0063] 在为实现本发明上述目的的仍另一个方面,本发明提供利用BVMO从脂肪酮酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸衍生物的方法。

[0064] 【发明方式】

[0065] 在下文中,本发明将关于实施例更详细地描述。然而,这些实施例只作说明目的,并且本发明不意欲被这些实施例所限制。

[0066] 实施例1:通过多步酶促合成产生 ω -羟基壬酸

[0067] 1) 基因克隆

[0068] 为制备包含油酸水合酶和醇脱氢酶基因的重组表达载体,克隆了嗜麦芽寡养单胞菌源的油酸水合酶基因和藤黄微球菌源的醇脱氢酶基因。

[0069] 首先,使用质粒载体pET 28(+)/a/油酸水合酶(J.Biotechnol.,158:17-23,2012)作为模板和通过包含PvuI和XhoI限制酶位点制备的引物(SEQ ID NOS:1和2),通过PCR扩增油酸水合酶基因。

[0070] 正向引物:5'-gctagcatgtattacagtaatggtaactatgaa-3'(SEQ ID NO:1)

[0071] 反向引物:5'-ggctcgagctatattagtttacttttctttca-3'(SEQ ID NO:2)

[0072] 扩增的PCR产物用限制酶PvuI和XhoI消化,并插入质粒载体pACYC(由Novagen制造)中来制备pACYC/油酸水合酶表达载体。

[0073] 进一步地,使用藤黄微球菌源的醇脱氢酶DNA序列(Genebank登记号ZP_07049769)作为模板和通过包含EcoRI和HindIII限制酶位点制备的引物(SEQ ID NOS:3和4),通过PCR扩增醇脱氢酶。

[0074] 正向引物:5'-atcgaattcgtccgagttcacccgtttcga-3'(SEQ ID NO:3)

[0075] 反向引物:5'-atatcaagcttcagccgagcggggtgtcct-3'(SEQ ID NO:4)

[0076] 扩增的PCR产物用限制酶EcoRI和HindIII消化,并插入制备的pACYC/油酸水合酶表达载体中来制备pACYC/油酸水合酶/醇脱氢酶表达载体。

[0077] 2) 宿主细胞培养

[0078] 为了维持质粒,将大肠杆菌BL21(DE3)培养在包含10g/l葡萄糖和适当抗生素的Riesenberg培养基中。这时,该Riesenberg培养基包含4g/l N(NH₄)₂HPO₄、13.5g/l KH₂PO₄、1.7g/l柠檬酸、1.4g/l MgSO₄和10ml/l痕量金属溶液(10g/l FeSO₄、2.25g/l ZnSO₄、1.0g/l CuSO₄、0.5g/l MnSO₄、0.23g/l Na₂B₄O₇、2.0g/l CaCl₂和0.1g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄),并且藤黄微球菌被在LB培养基中培养。

[0079] 3) 通过转化体产生 ω -羟基壬酸

[0080] 首先,将插入嗜麦芽寡养单胞菌源的油酸水合酶基因和藤黄微球菌源的醇脱氢酶基因的实施例1-1)的pACYC/油酸水合酶/醇脱氢酶表达载体引入实施例1-2)中培养的大肠杆菌BL21(DE3)菌株来制备初级转化体。

[0081] 然后,将制备来表达恶臭假单胞菌源的BVM0基因的表达载体pJOE-KT2440BVM0(Biotechnol.Lett.,29:1393-1398,2007)引入初级转化体,从而制备能够表达油酸水合酶、醇脱氢酶和BVM0的次级转化体。

[0082] 其后,当次级转化体在30℃和200rpm下,在Riesenberg无机培养基(mineral medium)中培养时,其用IPTG和rhamnose处理以表达油酸水合酶、醇脱氢酶和BVM0,并与1mM油酸反应以产生 ω -羟基壬酸(图2)。图2a是显示通过使用次级转化体产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的产量变化的图,在其中(●)指油酸的浓度,(△)指10-羟基硬脂酸的浓度,(▽)指10-酮硬脂酸的浓度,(■)指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度,和(▲)指 ω -羟基壬酸的浓度。图2b显示了在反应终止后用酯水解酶处理的反应产物的GC/MS分析结果。大多数从油酸制备的具有酯基引入其链的脂肪酸转化为n-壬酸和 ω -羟基壬酸。

[0083] 实施例2:从蓖麻油酸产生 ω -羟基十一碳-9-烯酸

[0084] 使用实施例1中制备的转化体,从底物蓖麻油酸产生 ω -羟基十一碳-9-烯酸。

[0085] 就是说, ω -羟基十一碳-9-烯酸以与实施例1-3)相同的方式产生,除了加入1mM蓖麻油酸代替油酸(图3)。图3a是显示通过使用转化体从蓖麻油酸产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的生产变化的图,在其中(△)指蓖麻油酸的浓度,(▽)指12-酮油酸的浓

度, (■) 指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度, 和 (▲) 指 ω -羟基十一碳-9-烯酸的浓度。图 3b 显示了在反应终止后用酯水解酶处理的反应产物的 GC/MS 分析结果。大多数从蓖麻油酸制备的具有酯基引入其链的脂肪酸转化为 n-庚酸和 ω -羟基十一碳-9-烯酸。

[0086] 实施例3: 从羟基廿碳烯酸产生 ω -羟基十三碳-11-烯酸

[0087] 使用实施例1中制备的转化体, 从底物羟基廿碳烯酸产生 ω -羟基十三碳-11-烯酸。

[0088] 就是说, ω -羟基十三碳-11-烯酸以与实施例1-3) 相同的方式产生, 除了加入 1mM 羟基廿碳烯酸代替油酸(图4)。图4显示了使用转化体和酯水解酶从羟基廿碳烯酸产生 ω -羟基十三碳-11-烯酸后, 反应产物的 GC/MS 分析结果。大多数羟基廿碳烯酸转化为庚酸和 ω -羟基十三碳-11-烯酸。

[0089] 实施例4: 从油酸产生 α , ω -癸二酸

[0090] 将实施例1中制备的 pACYC/油酸水合酶/醇脱氢酶表达载体和荧光假单胞菌源的 BVM0 基因表达载体 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1065-1072, 2007) 引入大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株来制备转化体, 其用来从底物油酸产生 α , ω -癸二酸(癸二酸)(图5)。图5a 是显示通过使用上述转化体产生的具有酯基引入其链的脂肪酸随时间的生产变化的图, 在其中 (●) 指油酸的浓度, (Δ) 指 10-羟基硬脂酸的浓度, (∇) 指 10-酮硬脂酸的浓度, 和 (■) 指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度。图5b 显示了在反应终止后用酯水解酶处理的反应产物的 GC/MS 分析结果。大多数从油酸制备的具有酯基引入其链的脂肪酸转化为癸二酸和正辛醇。

[0091] 实施例5: 从油酸产生 α , ω -壬二酸

[0092] 1) 基因克隆

[0093] 为了制备包含酯水解酶和醇脱氢酶基因的表达载体, 克隆荧光假单胞菌源的酯水解酶基因和恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶基因。

[0094] 首先, 使用质粒载体 pGASTON/酯水解酶 (Agric Biol. Chem., 54:2039-2045, 1990) 作为模版和通过包含 NdeI 和 XhoI 限制酶位点制备的引物 (SEQ ID NOS: 5 和 6), 通过 PCR 扩增酯水解酶基因。

[0095] 正向引物: 5'-gcgccatgatgatgagcacatttggtgcaaaa-3' (SEQ ID NO: 5)

[0096] 反向引物: 5'-gcgcctcgagtcagtggtgatggtgatgatgactccgccgccacttt-3' (SEQ ID NO: 6)

[0097] 扩增的 PCR 产物用限制酶 NdeI 和 XhoI 消化, 并插入质粒载体 pCOLAduet-1 (由 Novagen 制造) 来制备 pCOLAduet-1/酯水解酶表达载体。

[0098] 进一步地, 使用恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶的 DNA 序列 (J. Biotechnol. 262: 17712-17718, 1987) 作为模板和通过包含 BamHI 和 NotI 限制酶位点制备的引物 (SEQ ID NOS: 7 和 8), 通过 PCR 扩增醇脱氢酶。

[0099] 正向引物: 5'-gcgcggatccgatgtacgactatataatcggtt-3' (SEQ ID NO: 7)

[0100] 反向引物: 5'-gcgcgcggccgcttagtggtgatggtgatgatgcagacagctat-3' (SEQ ID NO: 8)

[0101] 扩增的 PCR 产物用限制酶 BamI 和 NotI 消化, 并插入制备的 pCOLAduet-1/酯水解酶表达载体来制备 pCOLAduet-1/酯水解酶/醇脱氢酶表达载体。

[0102] 2) 通过转化体产生 α , ω -壬二酸

[0103] 首先,将插入荧光假单胞菌源的酯水解酶基因和恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶基因的实施例5-1)的pCOLAduet-1/酯水解酶/醇脱氢酶表达载体引入实施例1-2)中培养的大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株来制备转化体。

[0104] 使用实施例1中制备的转化体和实施例5-1)中制备的转化体,从底物油酸产生 α , ω -壬二酸(壬二酸)。使用实施例1中制备的转化体,从油酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸,和使用实施例5-1)中制备的转化体,从具有酯基引入其链的脂肪酸产生壬二酸(图6)。图6是显示产生的壬二酸随时间的生产变化的图,在其中(■)指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度,(▲)指 ω -羟基壬酸的浓度,(◇)指9-氧代壬酸的浓度和(◆)指壬二酸的浓度。

[0105] 实施例6:从蓖麻油酸产生 α , ω -十一碳-2-烯二酸

[0106] 大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株引入实施例1中制备的pACYC/油酸水合酶/醇脱氢酶表达载体、恶臭假单胞菌源的BVM0基因表达载体和实施例5-1)中制备的pCOLAduet-1/酯水解酶/醇脱氢酶表达载体来制备转化体。

[0107] 使用转化体,从蓖麻油酸($C_{18}H_{34}O_3$)产生 α , ω -十一碳-2-烯二酸(图7)。图7是显示使用上述转化体,从蓖麻油酸产生的 α , ω -十一碳-2-烯二酸随时间的生产变化的图,在其中(△)指蓖麻油酸的浓度,(▽)指12-酮油酸的浓度,(■)指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度,(▲)指 ω -羟基十一碳-9-烯酸的浓度,(◇)指9-氧代十一碳-9-烯酸的浓度和(◆)指 α , ω -十一碳-2-烯二酸的浓度。

[0108] 同时,通过使用上述转化体,可从羟基廿碳烯酸产生庚酸和 α , ω -十三碳-2-烯二酸。

[0109] 实施例7:由油酸产生 ω -氨基壬酸

[0110] 1) 转化体的制备

[0111] 首先,将插入荧光假单胞菌源的酯水解酶基因和恶臭假单胞菌源的醇脱氢酶基因的实施例5-1)的pCOLAduet-1/酯水解酶/醇脱氢酶表达载体引入大肠杆菌来制备初级转化体。

[0112] 然后,将Silicibacter源的氨基转移酶表达载体(ChemCatChem,5:154-157,2013)引入初级转化体制备能够表达酯水解酶、醇脱氢酶和氨基转移酶的次级转化体。

[0113] 2) 通过转化体产生 ω -氨基壬酸

[0114] 使用实施例1中制备的转化体和实施例6-1)中制备的次级转化体,从底物油酸产生 ω -氨基壬酸。使用实施例1中制备的转化体,从油酸产生具有酯基引入其链的脂肪酸,和使用实施例6-1)中制备的转化体,从具有酯基引入其链的脂肪酸产生 ω -氨基壬酸(图8)。图8是显示产生的 ω -氨基壬酸随时间的生产变化的图,在其中(■)指具有酯基引入其链的脂肪酸的浓度,(▲)指 ω -羟基壬酸的浓度,(◇)指9-氧代壬酸的浓度和(◆)指 ω -氨基壬酸的浓度。

[0115] 同时,可通过使用转化体,从蓖麻油酸产生庚酸和 α -氨基十一碳-9-烯酸。

	<110>	梨花女子大学校产学协力团	
	<120>	通过生物转化从长链脂肪酸产生中链 ω -羟基脂肪酸、 α,ω -二羧酸和 ω -氨基脂肪酸的方法	
	<130>	OPA13043	
	<150>	KR 10-2012-0036372	
	<151>	2012-04-06	
	<150>	KR 10-2012-0056029	
	<151>	2012-05-25	
	<150>	KR 10-2013-0005814	
	<151>	2013-01-18	
	<160>	9	
	<170>	KopatentIn 2.0	
	<210>	1	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0001]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	1	
		gctagcatgt attacagtaa tggtaactat gaa	33
	<210>	2	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	2	
		ggctcgagct atattagttt actttctttc a	31
	<210>	3	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	3	
	atcgaattcg	tccgagttca	cccgtttcga
			30
	<210>	4	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	4	
	atatcaagct	tcagccgagc	ggggtgtcct
			30
	<210>	5	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0002]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	5	
	gcgccatatg	atgagcacat	ttgttgcaaa a
			31
	<210>	6	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	6	
	gcgcctcgag	tcagtggtga	tggatgatgat gaetccgccg ccacttt
			47
	<210>	7	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

<223> 引物

<400> 7

gcgcggatcc gatgtacgac tatataatcg tt 32

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

gcgcgcggcc gccctagtggt gatgggatg atgcattcag acagctat 48

<210> 9

<211> 546

<212> PRT

<213> Baeyer-Villiger单加氧酶

[0003]

<400> 9

Met Thr Glu Ala Val Thr Lys Ser Asn Gly His Asn Gly Thr His Val
1 5 10 15

Thr Ala Lys Leu Asp Ala Val Val Val Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu
20 25 30

Tyr Gln Leu Tyr Arg Leu Arg Glu Gln Gly Leu Thr Val Arg Ala Phe
35 40 45

Asp Ala Ala Ser Gly Val Gly Gly Thr Trp Tyr Trp Asn Arg Tyr Pro
50 55 60

Gly Ala Arg Phe Asp Ser Glu Ser Tyr Ile Tyr Gln Tyr Leu Phe Ser
65 70 75 80

Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Trp Ser Trp Ser Glu Arg Phe Pro Gly Gln
85 90 95

Pro Glu Ile Glu Arg Trp Leu Asn Tyr Val Ala Asp Arg Leu Asp Leu
100 105 110

Arg Lys Asp Ile Gln Phe Gly Thr Ala Ile Val Ser Ala His Phe Asp
115 120 125

Asp Ala Thr Gln Arg Trp Arg Val Thr Thr Asp Gln Gly Asp Gly Val
130 135 140

[0004]

Asp Thr Gln Phe Ile Ile Thr Cys Cys Gly Met Leu Ser Ala Pro His			
145	150	155	160
Val Ser Phe Pro Gly Gln Asp Thr Phe Gly Gly Gln Val Phe His Thr			
	165	170	175
Ala Arg Trp Pro Ala Gln Pro Val Asp Phe Ala Gly Lys Arg Val Gly			
	180	185	190
Ile Val Gly Asn Gly Ala Thr Gly Ile Gln Val Ile Gln Thr Ile Ala			
	195	200	205
Ser Glu Val Gly His Leu Lys Val Phe Met Arg Thr Pro Gln Tyr Ile			
	210	215	220
Ile Pro Met Lys Asn Pro Lys Tyr Gly Ala Ala Asp Ala Glu Ala Tyr			
225	230	235	240
Lys Ser Lys Phe Lys His Phe Val Glu Arg Leu Pro His Thr Phe Thr			
	245	250	255
Gly Phe Glu Tyr Asp Phe Glu His Ala Trp Ala Ala Leu Thr Ala Glu			
	260	265	270
Lys Arg Arg Glu Val Leu Glu Asp Cys Trp Asn Asp Gly Ser Leu Lys			
	275	280	285
Leu Trp Ile Ser Ser Phe Ala Glu Leu Phe Phe Asp Asp Ala Val Asn			
	290	295	300
Gly Glu Ile Ser Glu Phe Val Arg Glu Lys Met Arg Glu Arg Leu Lys			
305	310	315	320
Asp Pro Lys Leu Cys Asp Leu Leu Ile Pro Gln Asp Tyr Gly Phe Gly			
	325	330	335
Thr His Arg Val Pro Leu Glu Gln Asn Phe Leu Glu Ala Phe His Arg			
	340	345	350
Pro Asn Val Glu Ile Val Glu Val Lys Thr Asn Pro Ile Gln Cys Val			
	355	360	365
Thr Arg Glu Gly Ile Gln Leu Ala Asp Gly Thr Val His Glu Leu Asp			
	370	375	380
Ile Ile Ile Leu Ala Thr Gly Phe Asp Ala Gly Ser Gly Ala Leu Met			
385	390	395	400
Arg Ile Asp Ile Arg Gly Arg Gly Gly Arg Ser Leu Lys Asp Glu Trp			
	405	410	415
Ser Arg Asp Ile Arg Thr Thr Met Gly Leu Gln Ile His Gly Tyr Pro			
	420	425	430

Asn Leu Phe Thr Thr Ala Val Pro Leu Ala Pro Ser Ala Ala Leu Cys
435 440 445

Asn Met Thr Thr Cys Leu Gln Gln Gln Val Glu Trp Ile Asp Asp Cys
450 455 460

Ile Arg Tyr Val Arg Ala Asn Ser Leu Ala Ala Val Glu Pro Thr Lys
465 470 475 480

Glu Thr Gln Asp Ala Trp Val Ala His His Asp Glu Ile Ala Asn Ala
485 490 495

[0005]

Thr Leu Ile Ala Lys Thr Asn Ser Trp Tyr Leu Gly Ser Asn Val Lys
500 505 510

Gly Lys Pro Arg Arg Val Leu Ser Tyr Cys Gly Gly Val Gly Ala Tyr
515 520 525

Arg Gln Lys Cys Asp Glu Val Ala Ala Ser Gly Tyr Gln Gly Phe Ala
530 535 540

Met Arg
545

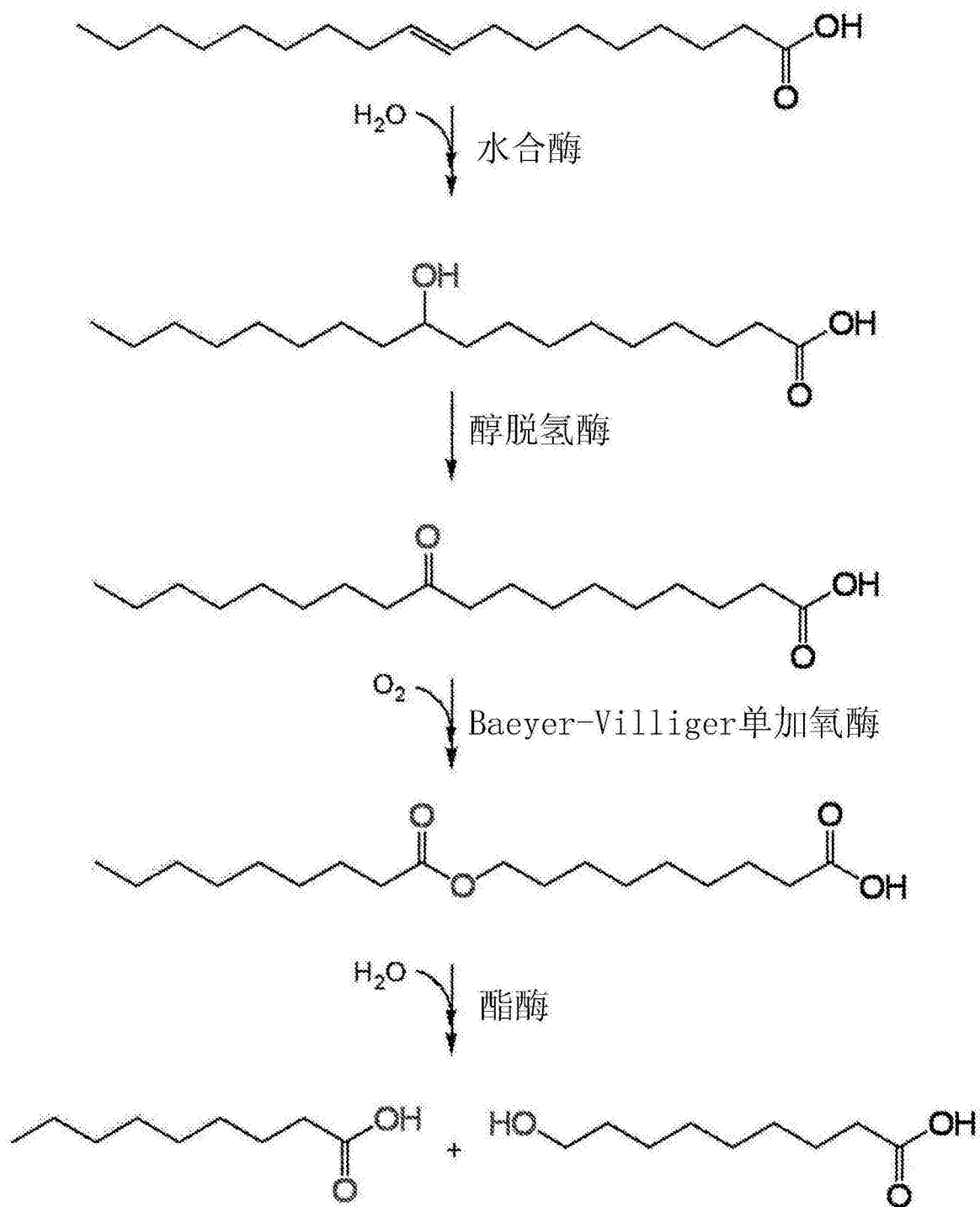


图1a

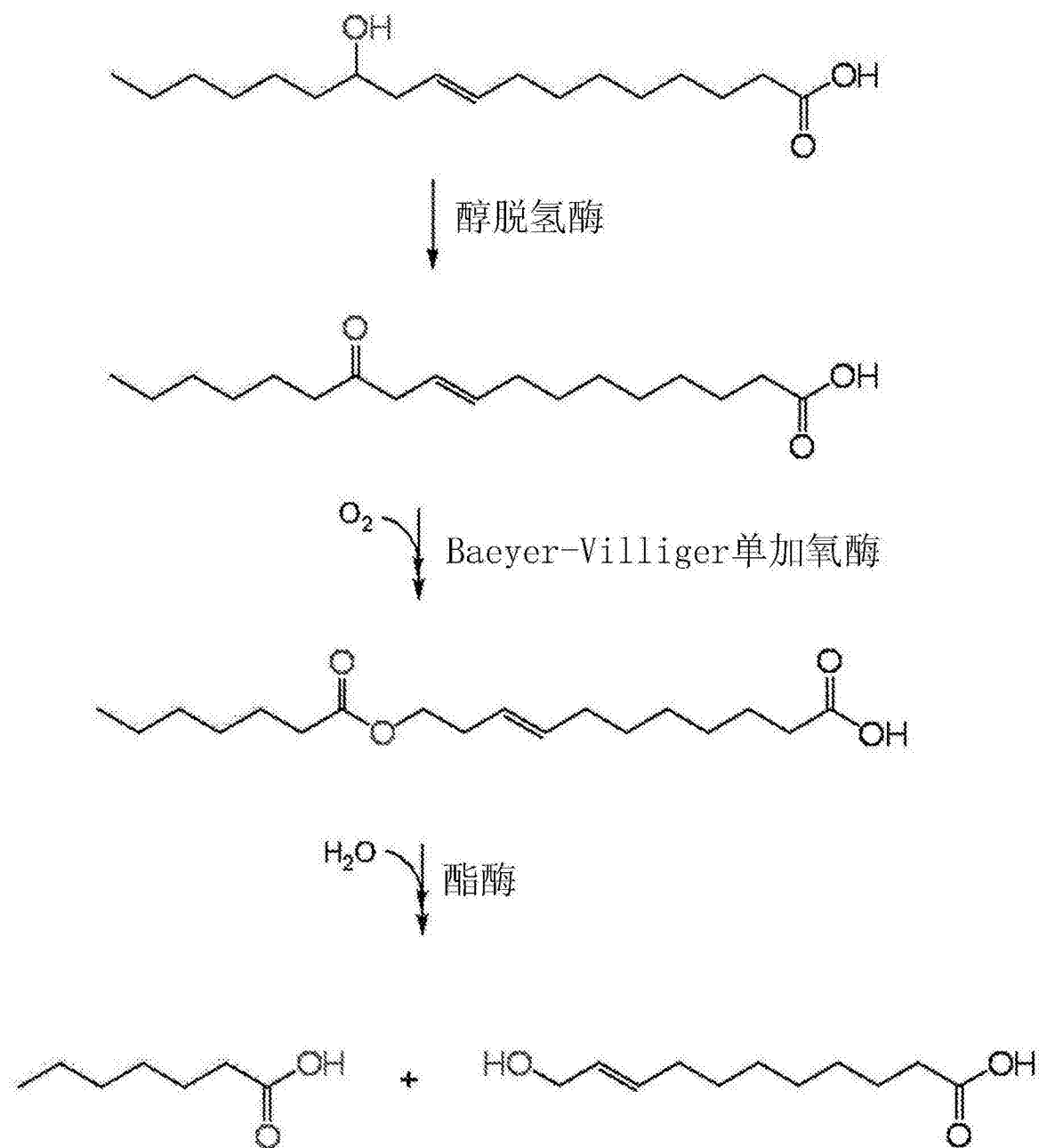


图1b

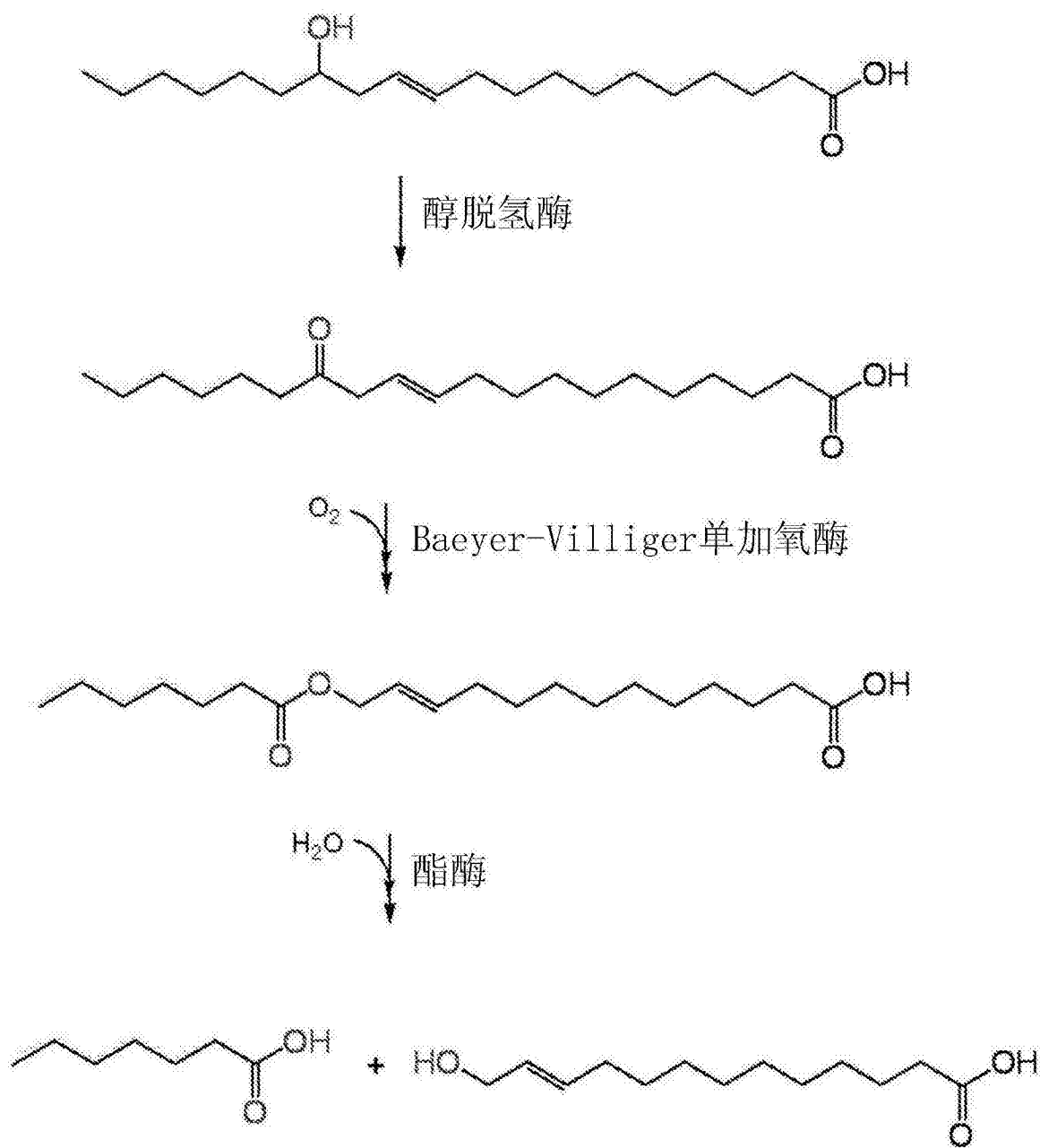


图1c

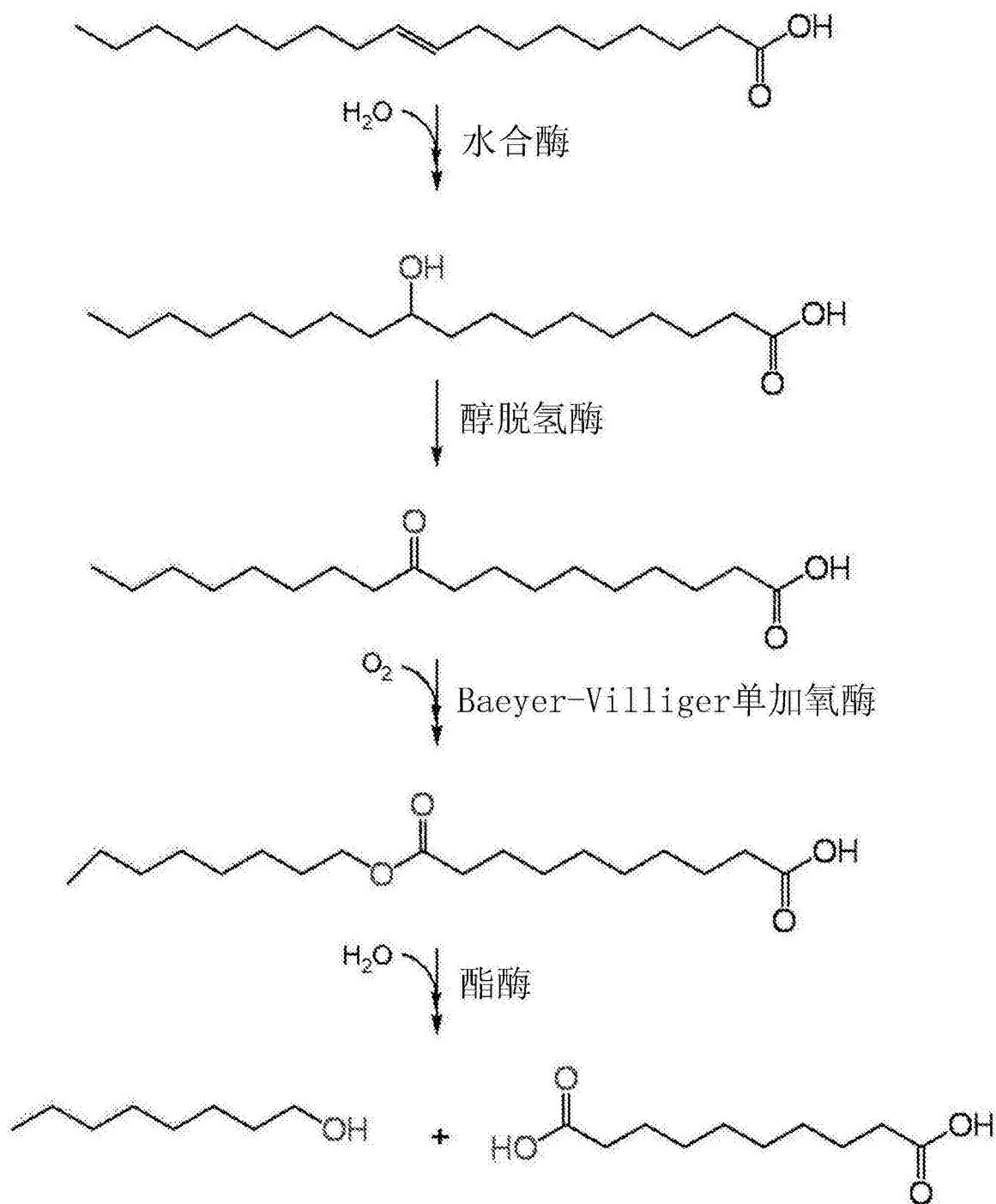


图1d

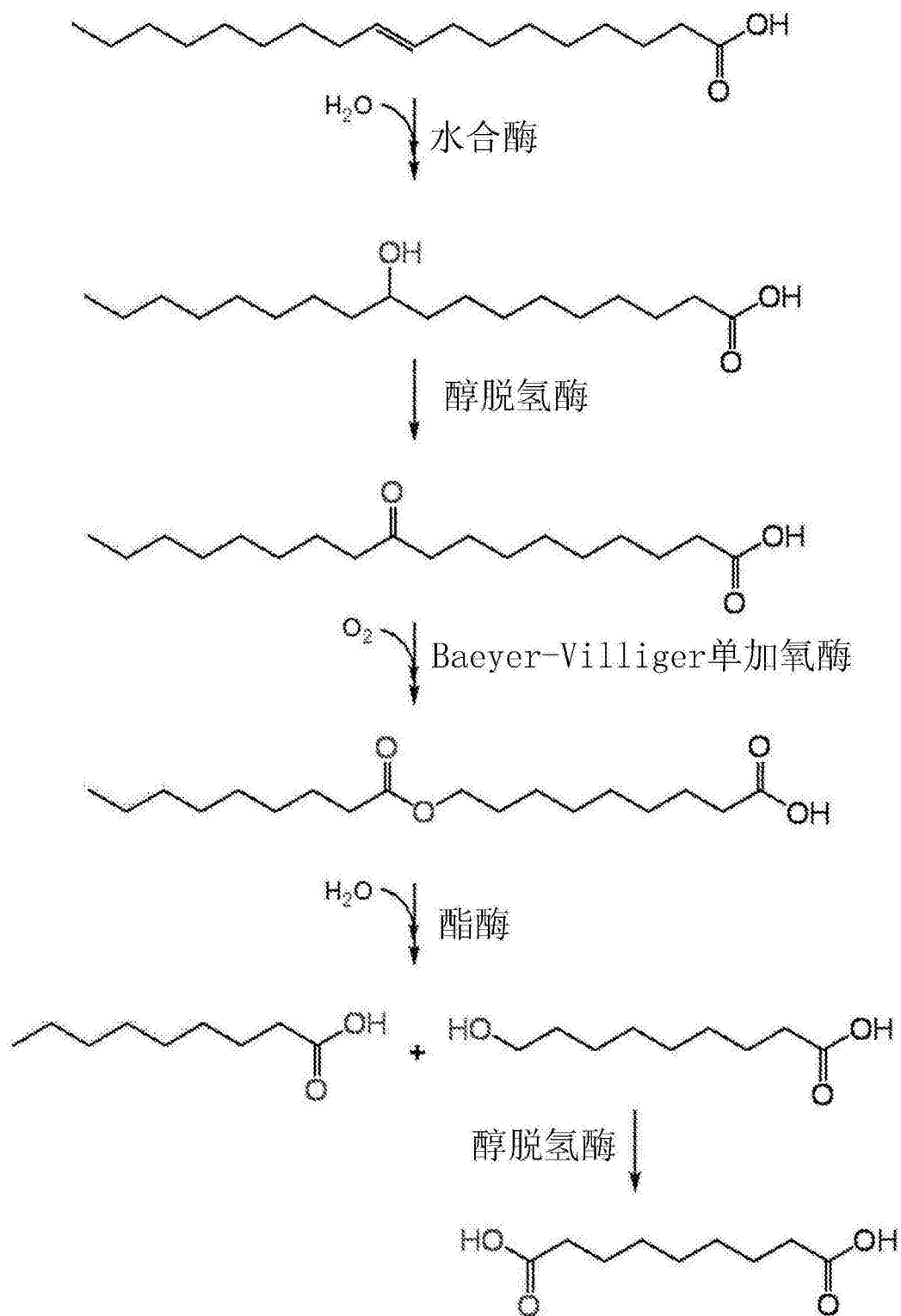


图1e

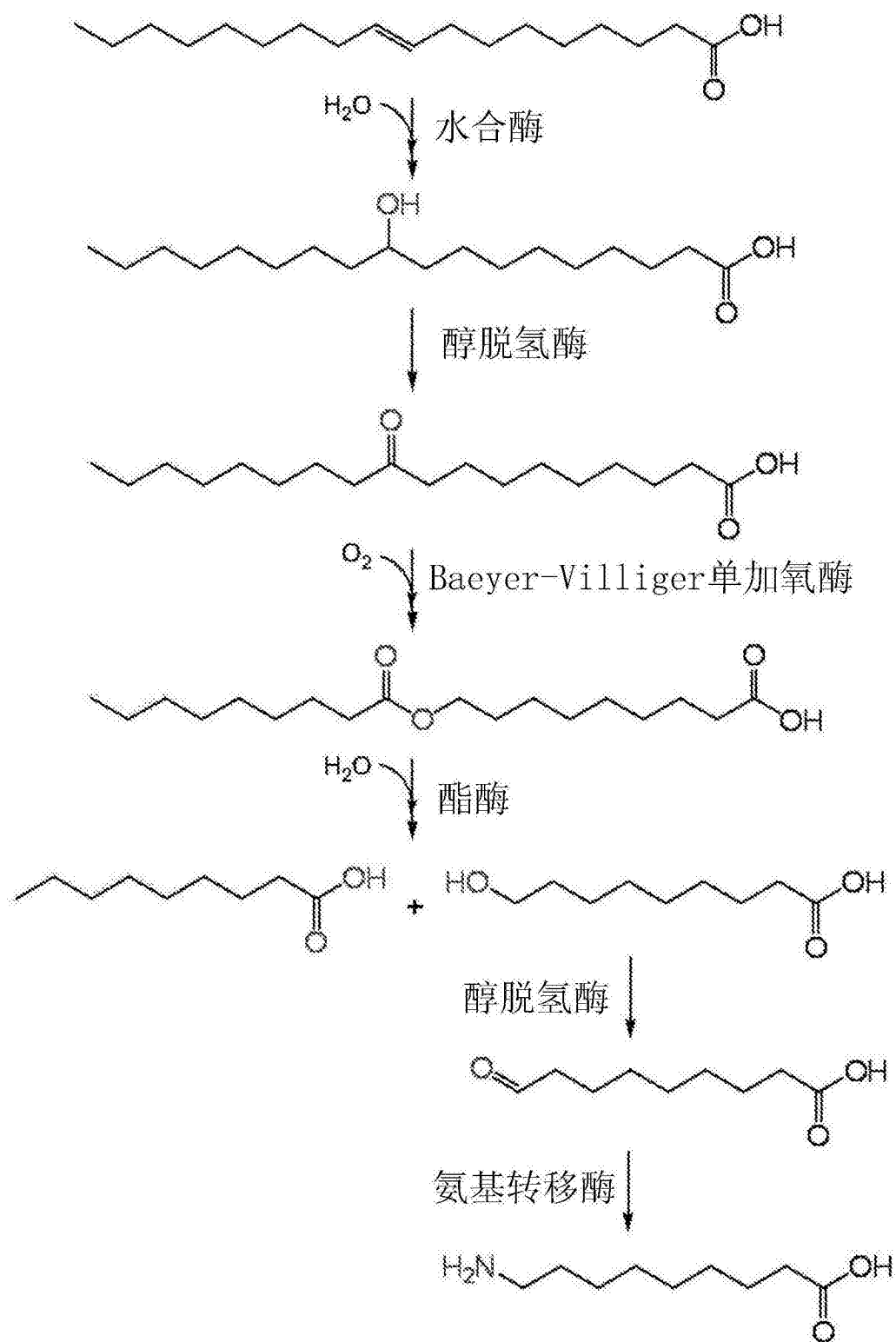


图1f

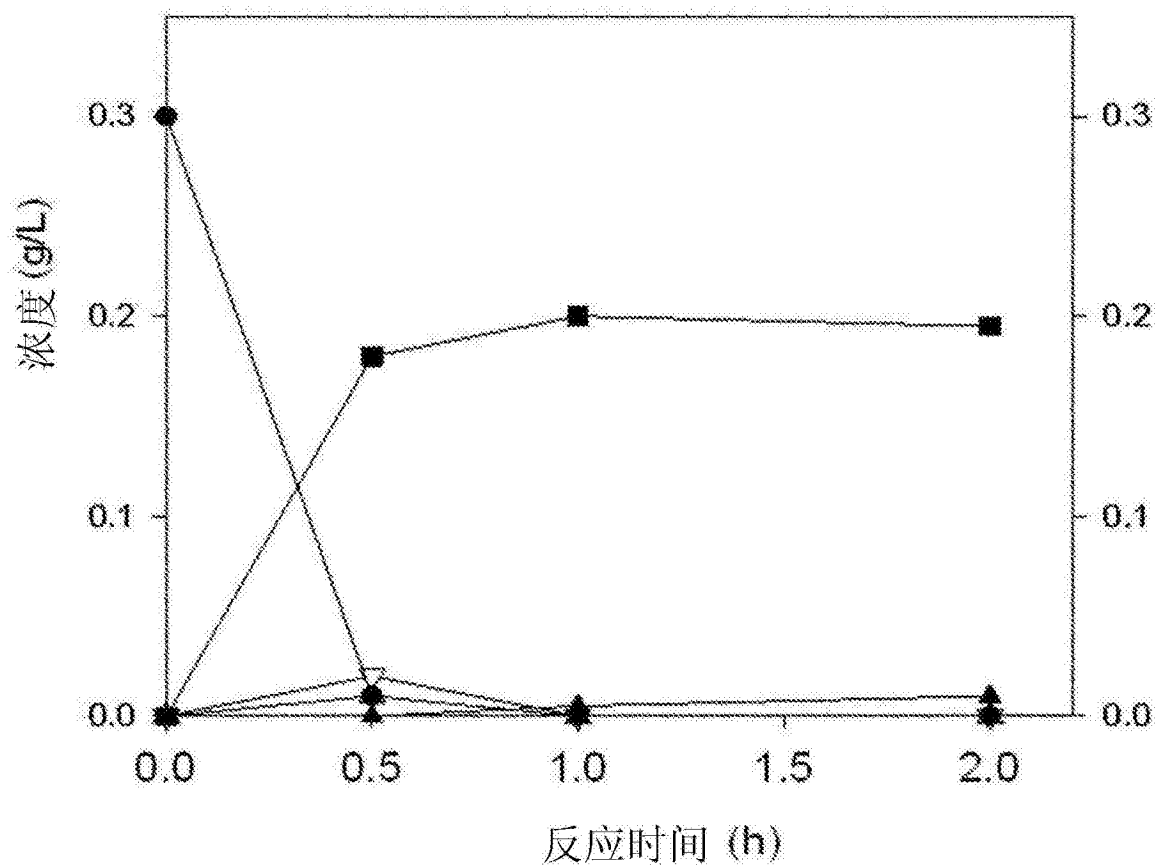


图2a

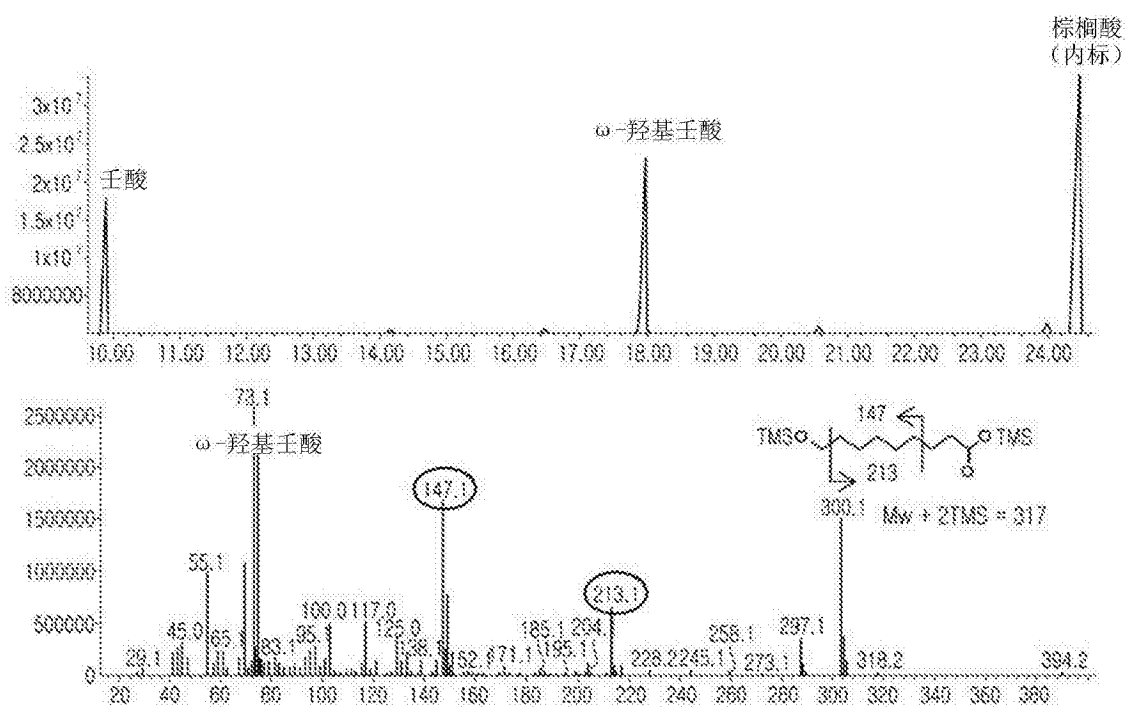


图2b

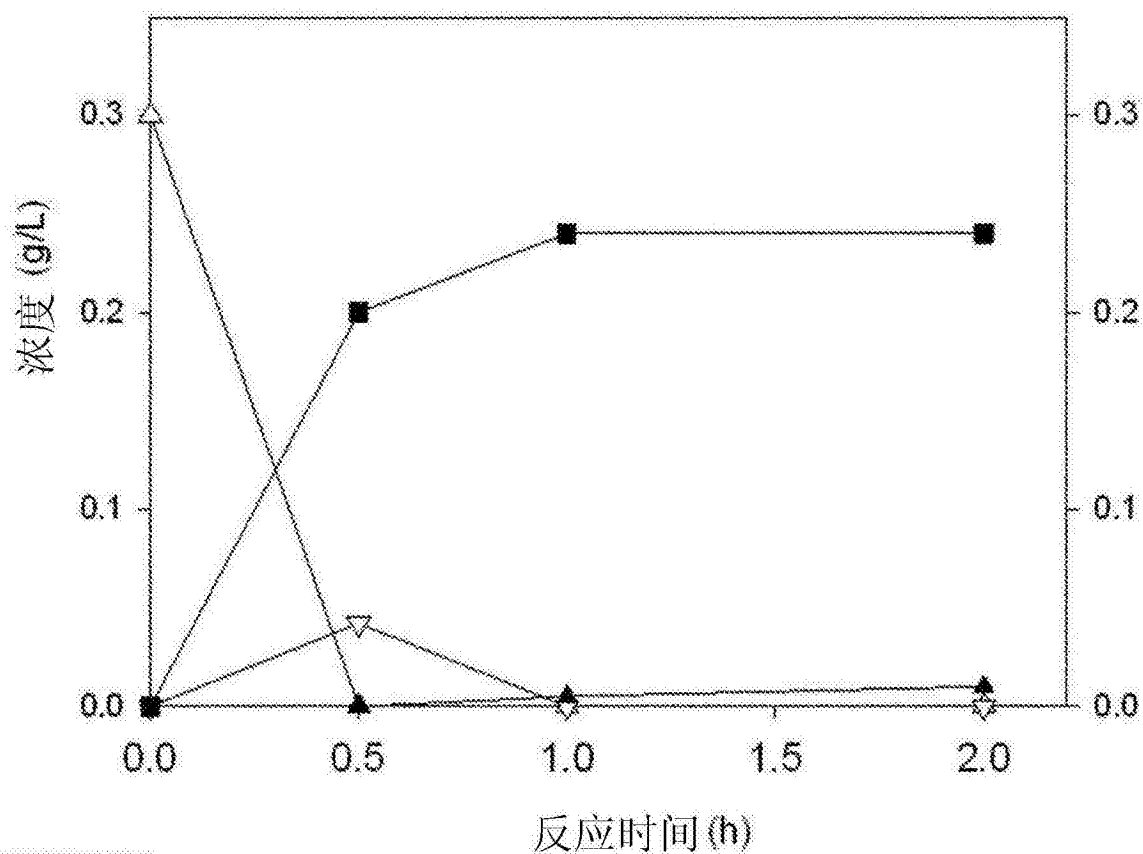


图3a

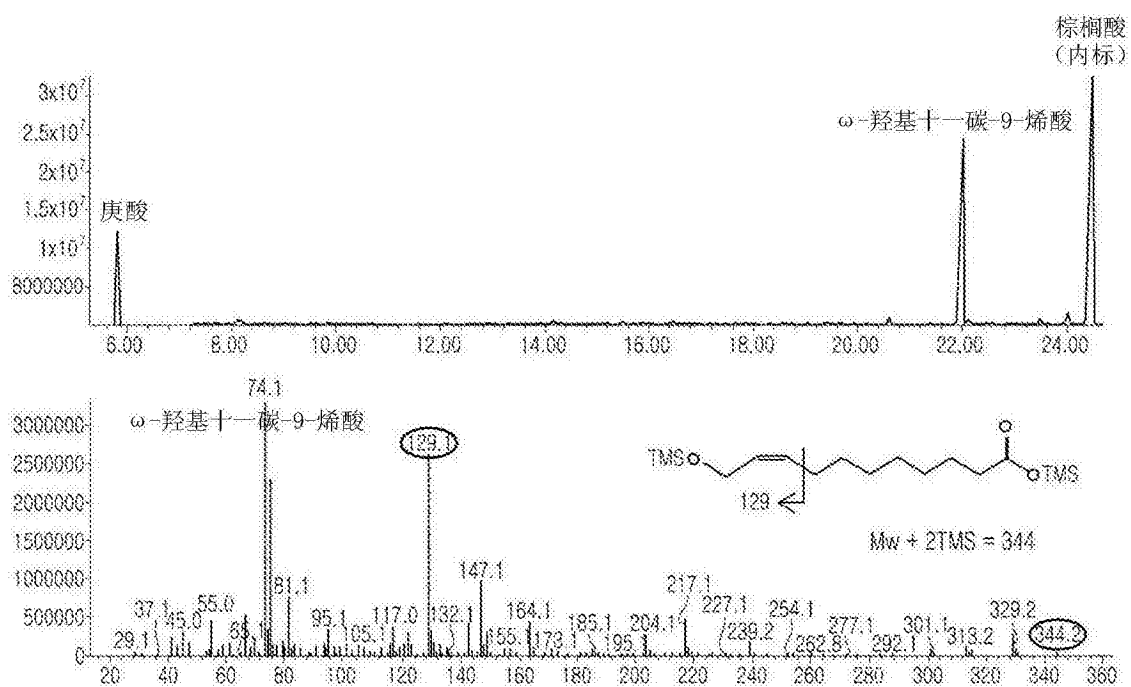


图3b

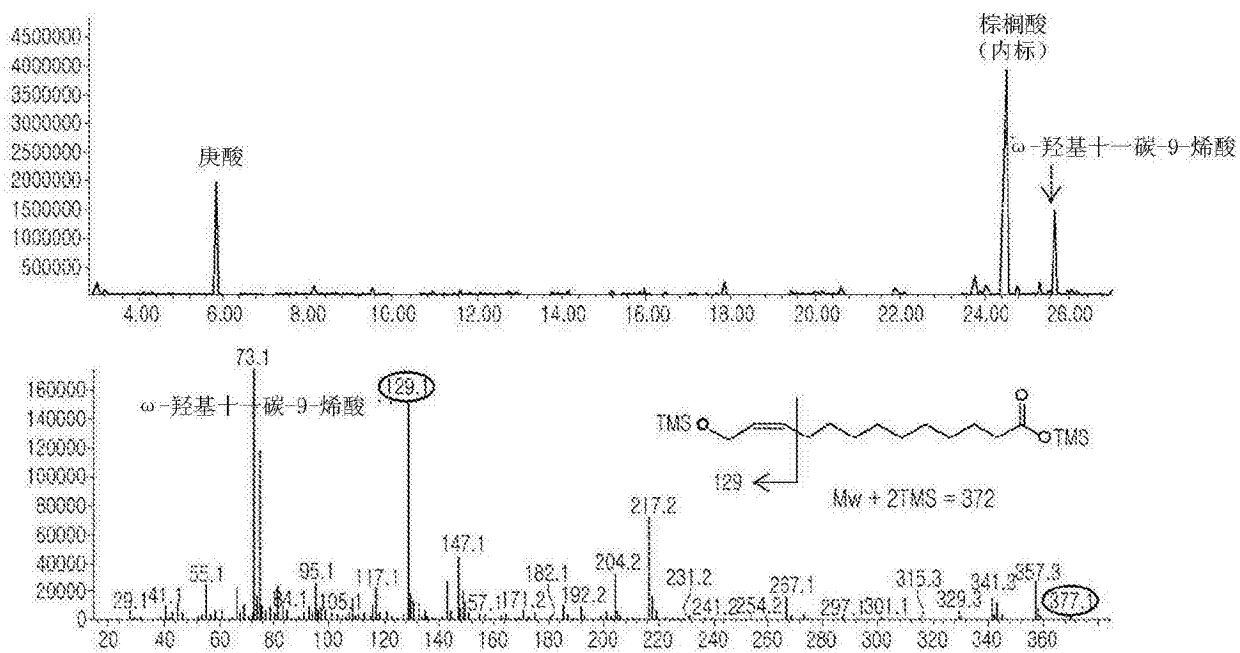


图4

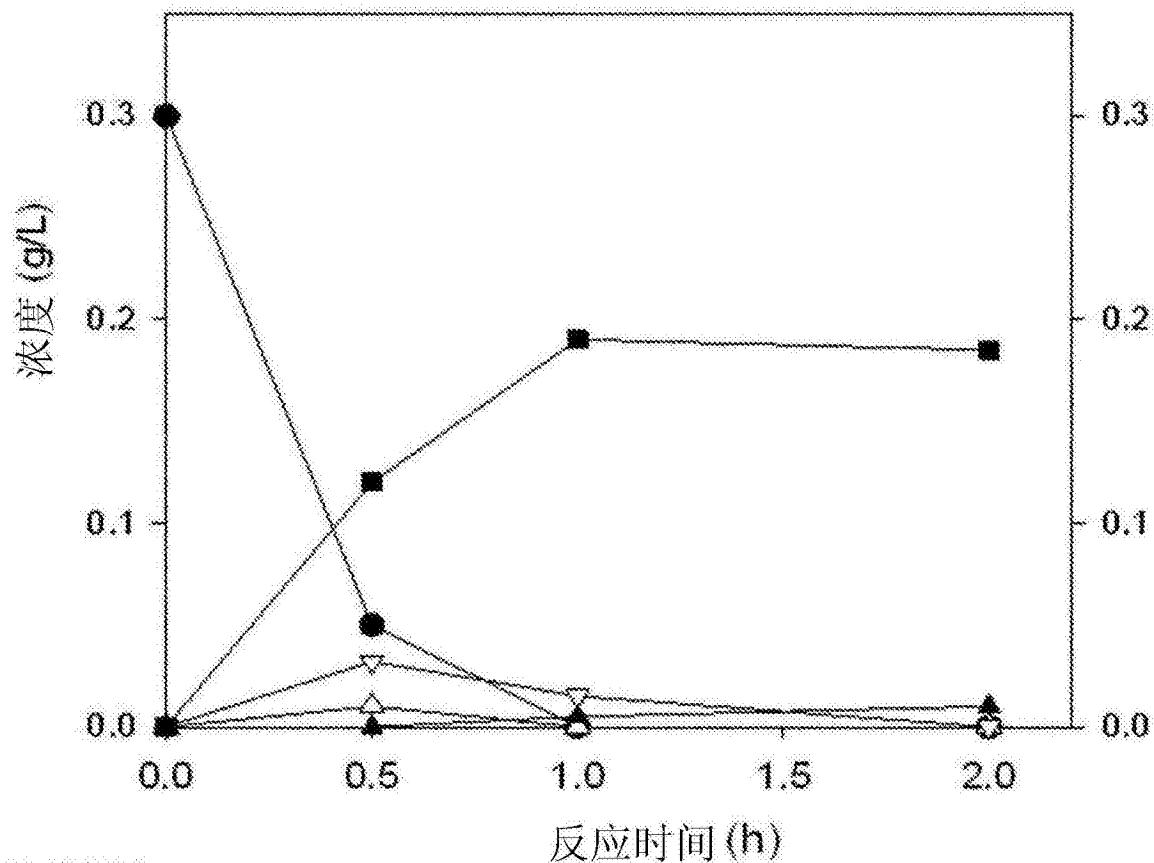


图5a

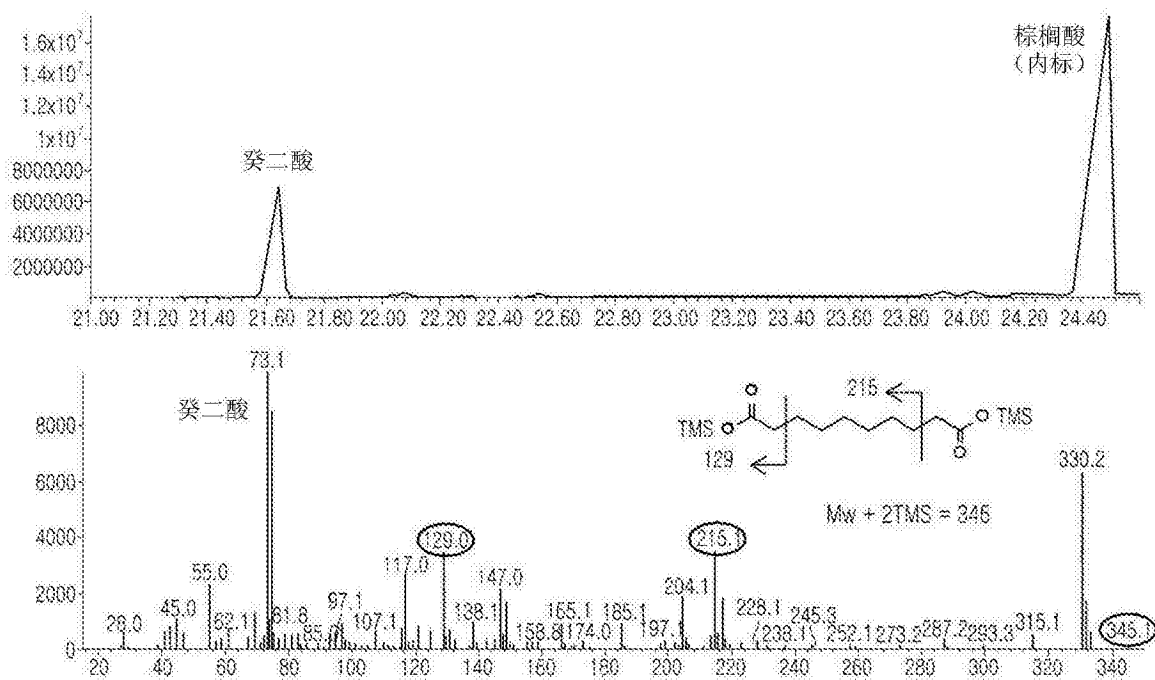


图5b

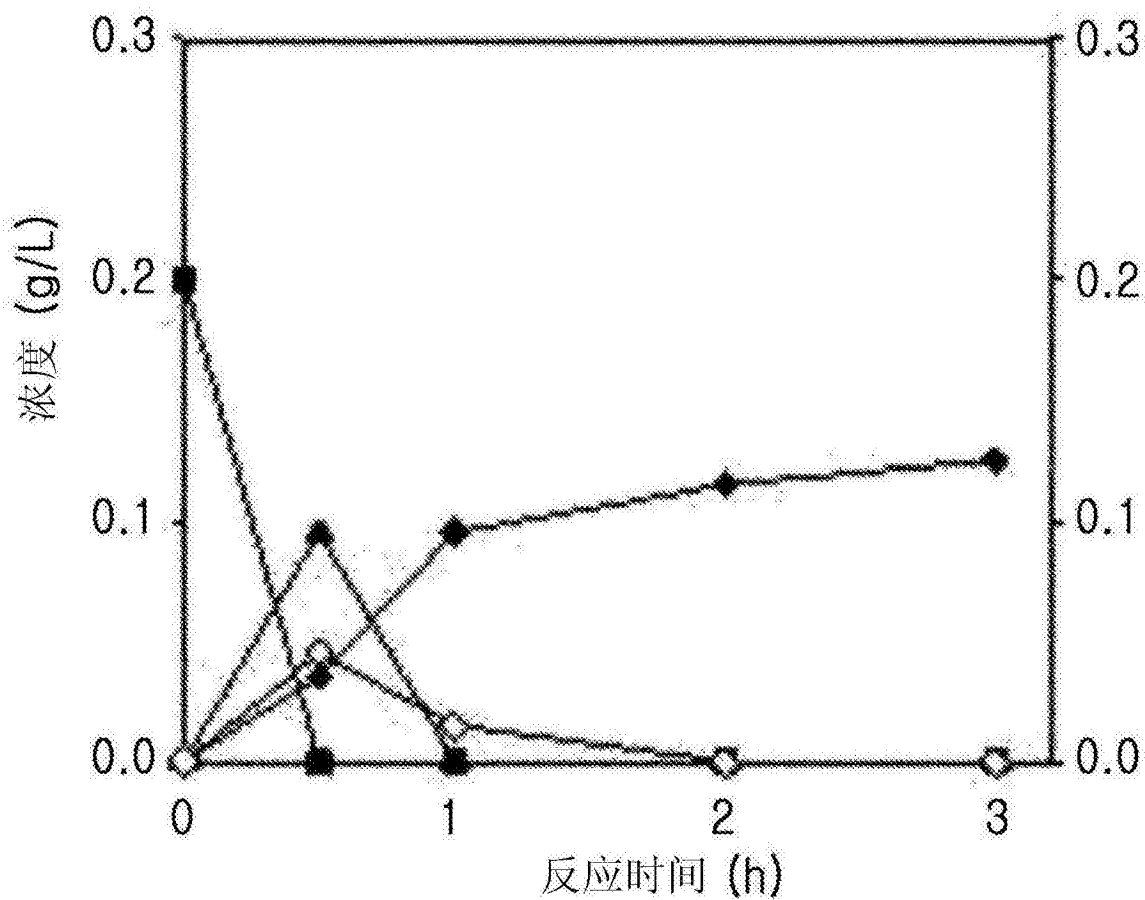


图6

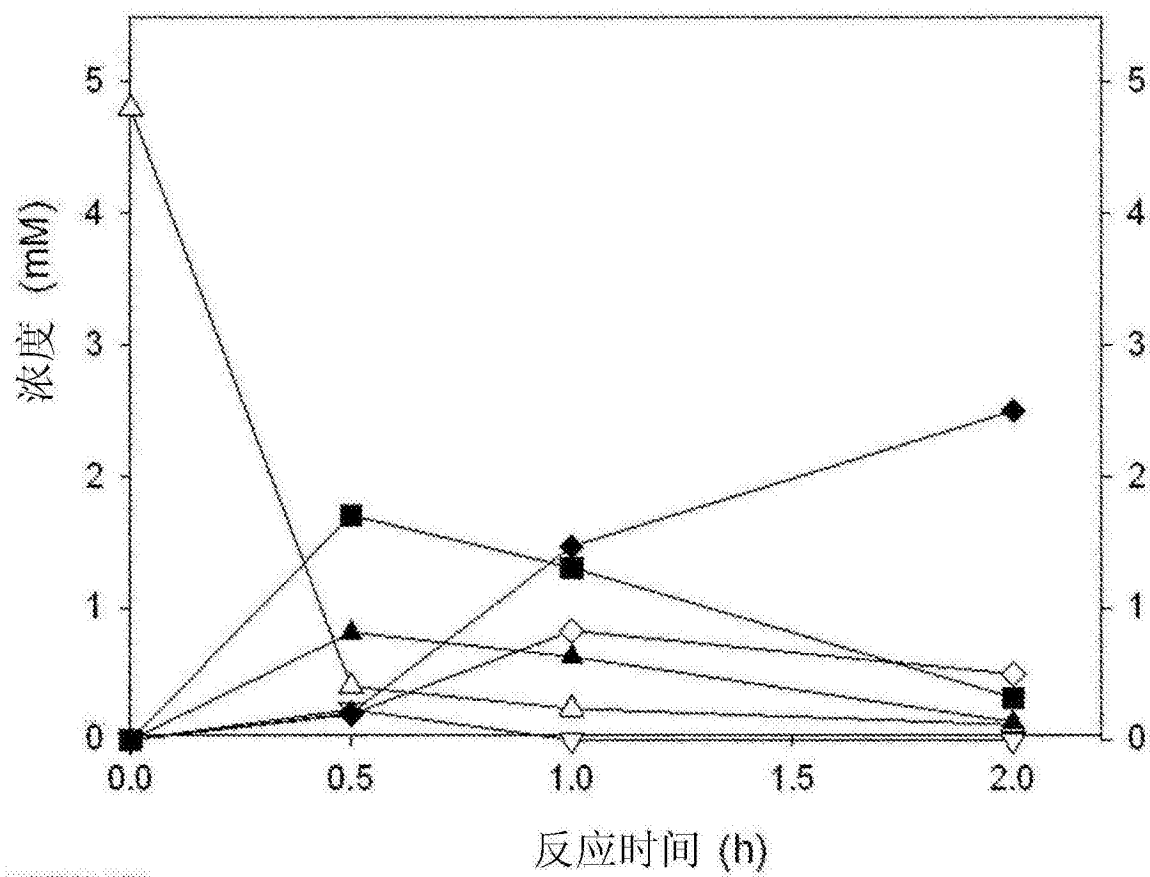


图7

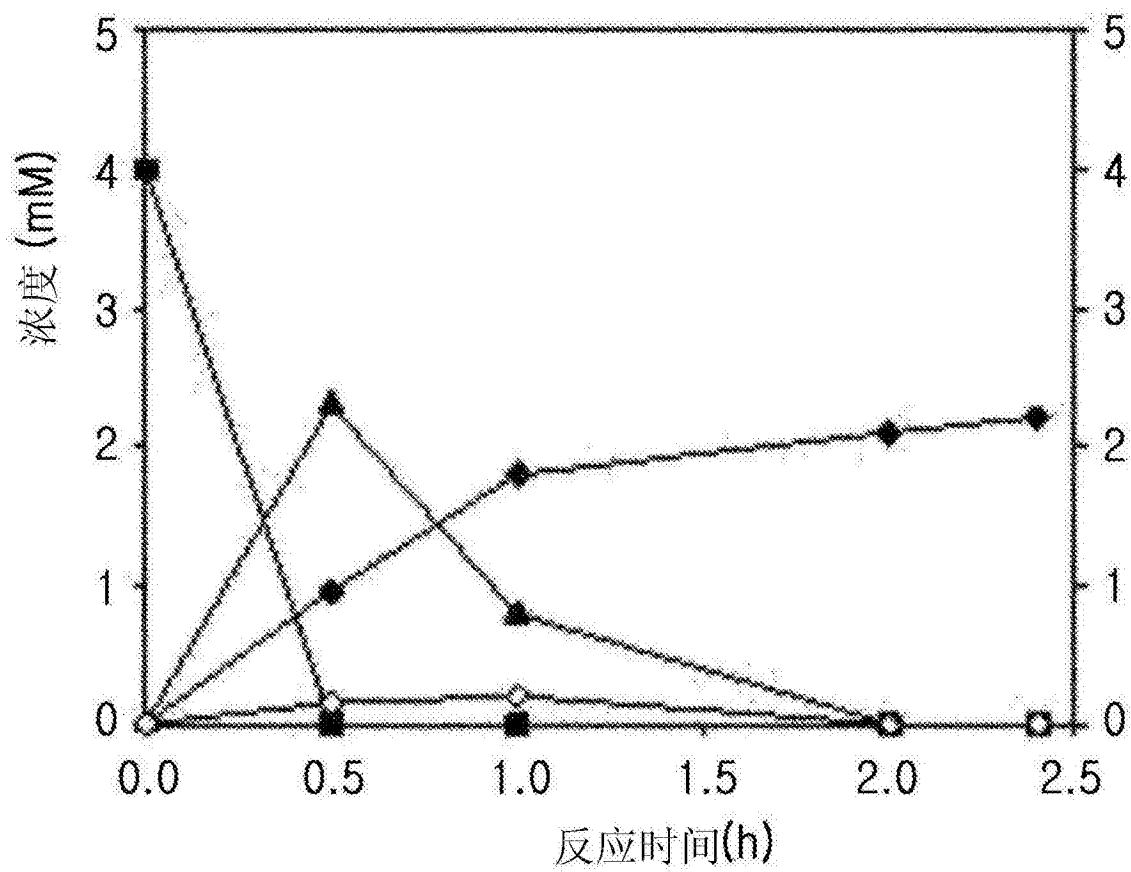


图8