



österreichisches
patentamt

(10) **AT 502 395 B1 2007-03-15**

(12)

Patentschrift

- (21) Anmeldenummer: A 1261/2005 (51) Int. Cl.⁸: **C12P 7/02 (2006.01)**
C12N 09/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
- (22) Anmeldetag: 2005-07-27
- (43) Veröffentlicht am: 2007-03-15

(56) Entgegenhaltungen:
EP 645453A2 US 2004/0214297A1

(73) Patentanmelder:
IEP GMBH
D-65203 WIESBADEN (DE)

(54) **OXIDOREDUKTASEN ZUR STEREOSELEKTIVEN REDUKTION VON KETOVERBINDUNGEN**

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Co-Faktors reduziert wird und ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Oxidoreduktase eingesetzt wird, die eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher (a) mindestens 70% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 6 und SEQ ID No 8, oder (b) mindestens 55% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2, oder (c) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3, oder (d) mindestens 75% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4, oder (e) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5, oder (f) mindestens 50% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7, oder (g) mindestens 72 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129.

AT 502 395 B1 2007-03-15

DVR 0078018

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung mit einer Oxidoreduktase reduziert wird. Die Erfindung betrifft ferner neue Oxidoreduktasen zur Verwendung bei der enantioselektiven Reduktion von Ketoverbindungen zu chiralen Hydroxyverbindungen.

Optisch aktive Hydroxyverbindungen sind wertvolle chirale Bausteine mit breiter Anwendung für die Synthese von pharmakologisch wirksamen Verbindungen, aromatischen Substanzen, Pheromonen, Agrochemikalien und Enzyminhibitoren. Dabei ist insbesondere im Pharmasektor ein steigender Bedarf an chiralen Verbindungen und somit chiralen Synthesetechnologien zu verzeichnen, da racemische Verbindungen in Zukunft kaum noch als Arzneimittel Verwendung finden werden.

Die asymmetrische Reduktion prochiraler Ketoverbindungen ist ein Sektor der stereoselektiven Katalyse, in dem die Biokatalyse eine leistungsfähige Konkurrenztechnologie zur chemischen Katalyse darstellt. Die chemische asymmetrische Hydrierung erfordert den Einsatz hochgiftiger und umweltbelastender Schwermetallkatalysatoren, extremer und somit energieintensiver Reaktionsbedingungen sowie große Mengen organischer Lösungsmittel. Des Weiteren sind diese Verfahren häufig gekennzeichnet durch Nebenreaktionen und unzureichende Enantiomerenüberschüsse.

Reduktionen prochiraler Ketoverbindungen zu Hydroxyverbindungen und umgekehrt kommen in der Natur in zahlreichen biochemischen Pathways, sowohl im Primärstoffwechsel als auch im Sekundärstoffwechsel, in jedem Organismus vor und werden von unterschiedlichen Typen von sekundären Alkoholdehydrogenasen und Oxidoreduktasen katalysiert. Diese Enzyme sind in der Regel cofaktorabhängig.

Die prinzipielle Machbarkeit der Nutzung von Biokatalysatoren zu Reduktion von prochiralen Ketoverbindungen zu chiralen Hydroxyverbindungen wurde in der Vergangenheit wiederholt anhand von Modellsystemen demonstriert, wobei sowohl mit isolierten Oxidoreduktasen als auch mit unterschiedlichen Ganzzellbiotransformationssystemen gearbeitet wurde. Dabei erwies sich der biokatalytische Ansatz im wesentlichen hinsichtlich der milden Reaktionsbedingungen, fehlender Nebenprodukte und oft wesentlich besseren erreichbaren Enantiomerenüberschüssen als vorteilhaft. Die Verwendung isolierter Enzyme ist gegenüber Verfahren mit ganzen Zellen hinsichtlich des erreichbaren Enantiomerenüberschusses, der Entstehung von Abbau- und Nebenprodukten als auch hinsichtlich der Produktisolierung von Vorteil. Des Weiteren ist die Verwendung von Ganzzellprozessen nicht jedem Chemieunternehmen möglich, da dafür spezielle Ausrüstung und Know-How erforderlich sind.

Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Verwendung isolierter Oxidoreduktasen in wässrig/organischen Zwei-Phasensystemen mit organischen Lösungsmitteln äußerst effizient, ökonomisch und auch in hohen Konzentrationen (> 5%) möglich ist. Bei den beschriebenen Systemen bildet dabei die zu reduzierende, meist schlecht wasserlösliche Ketoverbindung zusammen mit dem organischen Lösungsmittel die organische Phase. Teilweise kann auch auf das organische Lösungsmittel selbst verzichtet werden, dann wird die organische Phase von der zu reduzierenden Ketoverbindung gebildet (DE 10119274, DE 10327454.4, DE 103 37 401.9, DE 103 00 335.5). Die Coenzymregenerierung wird dabei durch die gleichzeitige Oxidation sekundärer Alkohole realisiert, wobei in den meisten Fällen das preiswerte wassermischbare 2-Propanol verwendet wird.

Beispiele für geeignete R- und S-spezifische Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen hoher Enantioselektivität sind:

Carbonylreduktase aus Candida parapsilosis (CPCR) (US 5,523,223 und US 5,763,236, (Enzyme Microb Technol. 1993 Nov;15(11):950-8)) und *Pichia capsulata* (DE 10327454.4). *Carbonyl-*

reduktase aus *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (US 5,523,223), *Nocardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), Seiten 1721-1729), (Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Sep;62(4):380-6. Epub 2003 Apr 26), und *Rhodococcus ruber* (J Org Chem. 2003 Jan 24;68(2):402-6.).

R-spezifische sekundären Alkoholdehydrogenasen aus Organismen der Gattung *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir* (US5200335), *Lactobacillus brevis* (DE 19610984 A1) (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2000 Dec;56 Pt 12:1696-8), *Lactobacillus minor* (DE10119274) oder *Pseudomonas* (US 05385833)(Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Aug;59(4-5):483-7. Epub 2002 Jun 26., J. Org. Chem. 1992, 57, 1532)

Die heute bekannten Enzyme reichen aber bei weitem nicht aus, um das gesamte Marktpotential an stereoselektiven Reduktionen von Ketoverbindungen auszuschöpfen. Das ist einerseits damit zu begründen, dass die einzelnen Enzyme über sehr unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Substratspektrum, pH-Optima sowie Temperatur- und Lösungsmittelstabilitäten verfügen, die sich häufig gegenseitig ergänzen. Daher können selbst verhältnismäßig ähnliche, homologe Enzyme im Hinblick auf ein bestimmtes Substrat ein völlig unterschiedliches Umsetzungsverhalten aufweisen. Andererseits sind längst nicht alle beschriebenen Enzyme kloniert und in ausreichendem Maße überexprimierbar, was bedeutet, daß diese Enzyme für eine industrielle Anwendung nicht zur Verfügung stehen. Daher ist es zur möglichst breiten Ausschöpfung des synthetischen Potentials der enzymatischen asymmetrischen Hydrierung notwendig, über ein möglichst breites Portfolio industriell zugänglicher unterschiedlicher Oxidoreduktasen zu verfügen, die zudem für eine Anwendung in wässrig/organischen Zweiphasensystemen mit organischen Lösungsmitteln geeignet sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nun eine Reihe neuer, enantioselektiver, R- und S-spezifischer Oxidoreduktasen, die sich durch gute Stabilität in wässrig/organischen Zweiphasensystemen sowie durch gute Exprimierbarkeit in *Escherichia coli* (>500 Units/g *E. coli* Biofeuchtmasse) auszeichnen, sowie ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung.

Die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz aufweisen, bei welcher

- (a) mindestens 70% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 6 und SEQ ID No 8, oder
- (b) mindestens 55% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2, oder
- (c) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3, oder
- (d) mindestens 75% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4, oder
- (e) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5, oder
- (f) mindestens 50 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7.
- (g) mindestens 72 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129.

Das Polypeptid entsprechend SEQ ID No 1 kann aus Hefen, insbesondere aus Hefen der Gattung *Rhodotorula*, insbesondere aus *Rhodotorula mucilaginosa*, gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 9, die für das Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 1 codiert.

Die Oxidoreduktase aus *Rhodotorula mucilaginosa* reduziert beispielsweise 2-Oktanon zu

S-2-Oktanol und oxidiert von beiden Enantiomeren des 2-Oktanol bevorzugt S-2-Oktanol. Die Oxidoreduktase aus *Rhodotorula mucilaginosa* ist beispielsweise ein Homodimer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS - Gel von 30 ± 2 k Da. Das pH -Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 7,0 bis 8,0 und das pH -Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 8,5-10. Die Oxidoreduktase aus *Rhodotorula mucilaginosa* weist eine gute Temperatur - und pH - Stabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 5,5 bis 10 und bei Temperaturen bis 35°C auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust. Ferner weist die Oxidoreduktase aus *Rhodotorula mucilaginosa* eine hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln auf.

Polypeptide entsprechend SEQ ID No 2 oder SEQ ID No 8 können aus Hefen, insbesondere aus Hefen der Gattungen *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Debaromyces* oder *Issatschenkia*, insbesondere aus *Pichia farinosa* DSMZ 3316 oder *Candida nemodendra* DSMZ 70647, gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 10 und eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 16, die für die Aminosäuresequenzen SEQ ID No 2 und SEQ ID No 8 codieren. Die Oxidoreduktase reduziert 2-Butanon bevorzugt zu R-2-Butanol und oxidiert von beiden Enantiomeren des 2-Butanol bevorzugt R-2-Butanol.

Die Oxidoreduktase aus *Pichia farinosa* weist dabei eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber R-2-Butanol und 2-Propanol auf als gegenüber R-2-Oktanol, des weiteren weist das Enzym eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber Aceton und 2-Butanon auf als gegenüber 2-Oktanon.

Die Oxidoreduktase aus *Candida nemodendra* weist hingegen eine ähnliche Aktivität gegenüber R-2-Butanol, 2-Propanol und R-2-Oktanol auf, des weiteren weist das Enzym auch eine in etwa ähnliche Aktivität gegenüber 2-Oktanon auf.

Die Oxidoreduktase aus *Pichia farinosa* ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS-Gel von 27 ± 2 k Da. Das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 5,0 bis 6,0 und das pH-Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 7,5-10. Die Oxidoreduktase aus *Pichia farinosa* weist eine gute pH- und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 5,5 bis 10 auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Die Oxidoreduktase aus *Candida nemodendra* ist ein Homomer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS - Gel von 27 ± 2 k Da. Das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase bei 6 und das pH -Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 10-11. Die Oxidoreduktase aus *Candida nemodendra* weist eine gute pH- und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 6,5 bis 9,5 auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Die Polypeptide entsprechend SEQ ID No 3 oder SEQ ID No 7 können aus Hefen, insbesondere aus Hefen der Gattungen *Pichia* und *Candida*, insbesondere aus *Pichia stipidis* DSMZ 3651 und *Pichia trehalophila* DSMZ 70391, gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 11 und eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 15, die für die Polypeptide SEQ ID No 3 bzw. SEQ ID No 7 codieren.

Die Carbonylreduktase aus Hefen der Gattung *Pichia* und *Candida*, die mindestens 65% Identität zu der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3 oder mindestens 50%-Identität zu der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7 aufweisen, reduzieren 2-Oktanon bevorzugt zu S-2-Oktanol und oxydieren von beiden Enantiomeren des 2-Oktanol bevorzugt S-2-Oktanol. Sie eignen sich auch besonders zur Reduktion von 4-Haloacetoacetat ester zu R-4-Halo-3-hydroxybuttersäureestern.

Die Oxidoreduktase aus *Pichia stipidis* ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS-Gel von 36 ± 2 k Da. Das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxido-

reduktase im Bereich von 5,5 bis 6,5 und das pH-Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 6,5-8,0. Die Oxidoreduktase aus *Pichia stipidis* weist eine gute pH- und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 5,5 bis 10 auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Die Oxidoreduktase aus *Pichia trehalophila* ist Homomer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS-Gel von 36 ± 2 k Da. Das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 7-7,5 und das pH-Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 7-8.

Das Polypeptid entsprechend SEQ ID No 4 kann aus Bakterien der Gruppe *Leuconostoc*, insbesondere aus *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576 gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 12, welche für ein Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4 codiert. Das Polypeptid eignet sich besonders zur Reduktion von 2-Oktanon zu R-2-Oktanol und zur Oxydation von R-2-Oktanol. Es eignet sich auch sehr gut zur Reduktion von 4-Haloacetoacetat ester zu S-4-Halo-3-hydroxybuttersäureestern.

Die Oxidoreduktase aus *Leuconostoc carnosum* ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS - Gel von 27 ± 2 k Da. Das pH -Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 5,0 bis 6,0 und das pH -Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 6,0-9,0. Die Oxidoreduktase aus *Leuconostoc carnosum* weist eine gute Temperatur, pH - und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 4,5 bis 10 sowie bei Temperaturen bis 35°C auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Das Polypeptid entsprechend SEQ ID No 5 kann aus Bakterien der Gruppe *Actinobacteria*, insbesondere aus Bakterien der Gruppe *Microbacterium*, insbesondere aus *Microbacterium spec.* DSMZ 20028 gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 13, die für das Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5 codiert. Das Polypeptid eignet sich sehr gut zur Reduktion von 2-Octanone zu S-2-Oktanol und oxydiert von beiden Enantiomeren des 2-Oktanol bevorzugt S-2-Oktanol oxidiert. Es eignet sich auch sehr gut zur Reduktion von 4-Haloacetoacetat ester zu R-4-Halo-3-hydroxybuttersäureestern.

Die Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec.* DSMZ 20028 ist beispielsweise ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS - Gel von 35 ± 2 k Da. Das pH -Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 6,0 bis 7,5 und das pH -Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 7,5-9,5. Die Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec* weist eine gute Temperatur, pH - und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im pH-Bereich von 4,5 bis 10 sowie bei Temperaturen bis 50°C auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Das Polypeptid entsprechend SEQ ID No 6 kann aus Bakterien der Gruppe *Actinobacteria*, insbesondere aus Bakterien der Gruppe *Gordonia*, insbesondere aus *Gordonia rubripertincta* DSMZ 43570 gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 14, die für das Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 6 codiert. Das Polypeptid eignet sich sehr gut zur Reduktion von 2-Octanone zu S-2-Oktanol und oxydiert von beiden Enantiomeren des 2-Oktanol bevorzugt S-2-Oktanol oxidiert. Es eignet sich auch sehr gut zur Reduktion von 4-Haloacetoacetat ester zu R-4-Halo-3-hydroxybuttersäureestern.

Die Oxidoreduktase aus *Gordonia rubripertincta* DSMZ 43570 ist ein Homomer mit einem Molekulargewicht bestimmt im SDS-Gel von 41 ± 3 k Da. Das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt für diese Oxidoreduktase im Bereich von 4,5 bis 5,5 und das pH-Optimum für die Oxidationsreaktion liegt im Bereich von 7,5 bis 9,5. Die Oxidoreduktase aus *Gordonia rubripertincta* DSMZ 43570 weist eine gute Temperatur, pH- und Lösungsmittelstabilität auf und zeigt im

pH-Bereich von 4,5-10 sowie bei Temperaturen bis 55 °C auch bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden nur geringen Aktivitätsverlust.

Das Polypeptid entsprechend SEQ ID No 129 kann aus Hefen, insbesondere aus Hefen der Gattungen *Lodderomyces*, insbesondere aus *Lodderomyces elongisporus* DSMZ 70320 gewonnen werden. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Nukleinsäuresequenz SEQ ID No 130, die für das Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129 codiert. Das Polypeptid eignet sich sehr gut zur Reduktion von 2-Octanon zu S-2-Oktanol und oxidiert von beiden Enantiomeren des 2-Oktanol bevorzugt S-2-Oktanol oxidiert. Es eignet sich auch sehr gut zur Reduktion von 4-Haloacetoacetat ester zu R-4-Halo-3-hydroxybuttersäureestern.

Die Erfindung betrifft weiterhin Fusionsproteine, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Oxidoreduktasen mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen darstellen, die mit einem weiteren Polypeptid am N-Terminale oder Carboxy-terminalen Ende peptidisch verbunden sind. Fusionsproteine können beispielsweise leichter von anderen Proteinen abgetrennt werden oder können in größeren Mengen rekombinant exprimiert werden.

Die Erfindung betrifft ferner Antikörper, die spezifisch an die Oxidoreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen binden. Die Herstellung dieser Antikörper erfolgt nach bekannten Methoden durch Immunisierung von geeigneten Säugtieren und anschließender Gewinnung der Antikörper. Die Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein.

Vergleiche von Aminosäuresequenzen können beispielsweise im Internet in Proteindatenbanken wie z.B. SWISS-PROT, PIR sowie in DNA-Datenbanken wie z.B. EMBL, GenBank etc unter Nutzung des FASTA-Programm oder BLAST-Programm durchgeführt werden.

Das optimale Alignment wird dabei mit Hilfe des BLAST -Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) ermittelt (*Altschul et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2264-2268*). Als Scoring-Matrix zur Berechnung der Sequenzähnlichkeit wird die PAM30-Matrix zugrunde gelegt. (*Dayhoff, M.O., Schwarz, R.M., Orcutt, B.C. 1978. A model of evolutionary change in Proteins in Atlas of Protein Sequence and structure 5(3) M.O. Dayhoff (ed) 345-352, National Biomedical Research foundation*).

Die Erfindung betrifft ferner Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 1 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 26 Aminosäuren je Fragment.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MPATLRLDK (SEQ ID No 17) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz QALAAPSNLAPKA (SEQ ID No 18) und oder eine der internen Partialsequenzen VEIHKTVQD (SEQ ID No 19), KVAITGGASGIGL (SEQ ID No 20), SCYVTPEG (SEQ ID No 21), TDFKVDGG (SEQ ID No 22), VMFNNAGIMH (SEQ ID No 23), oder VHAREGIRIN (SEQ ID No 24) enthält.

Die Erfindung betrifft ferner Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 15 Aminosäuren je Fragment.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MAYNFTNKVA (SEQ ID No 25) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz TTLLVDGGYTAQ (SEQ ID No 26) und oder eine der internen Partialsequenzen

EYKEAAFTN (SEQ ID No 27), NKVAITGGISGIGLA (SEQ ID No 28), DVNLNGVFS (SEQ ID No 29), HYCASKGGV (SEQ ID No 30), NCINPGYI (SEQ ID No 31), oder LHPMGRLE (SEQ ID No 32) enthält.

5 Die Erfindung betrifft ferner Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 15 Aminosäuren je Fragment.

10 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MSIPATQYGFV (SEQ ID No 33) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz SAYEGRVFKP (SEQ ID No 34) und/ oder eine der internen Partiaalsequenzen CHSDLHAIY (SEQ ID No 35), GYQQYLLVE (SEQ ID No 36), TFDTQCQKYV (SEQ ID No 37), LLTPYHAM (SEQ ID No 38), LVSKGKVKP (SEQ ID No 39), GAGGLGVNG (SEQ ID No 40), IQIAKAFGAT (SEQ ID No 41) oder LGSFWGTS (SEQ ID No 42) enthält.

15 Die Erfindung betrifft ferner Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 18 Aminosäuren je Fragment.

20 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MTDRLKNKVA (SEQ ID No 43) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz AEFVVDGGYLAQ (SEQ ID No 44) und/ oder eine der internen Partiaalsequenzen WITGRRAN (SEQ ID No 45), GGASIIIMS (SEQ ID No 46), TQTPMGHI (SEQ ID No 47) oder GYIKTPLVDG (SEQ ID No 48) enthält.

25 Die Erfindung betrifft des weiteren Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 18 Aminosäuren je Fragment.

30 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MKALQYTKIGS (SEQ ID No 49) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz LAAGTVRGRAVIVP (SEQ ID No 50) und/oder eine der internen Partiaalsequenzen CHSDEFVMSLSE (SEQ ID No 51), VYGPWGCGRC (SEQ ID No 52), VSLTDAGLTPYHA (SEQ ID No 53), LRAVSAATVIAL (SEQ ID No 54) oder DFGADPTI (SEQ ID No 55) enthält.

35 Die Erfindung betrifft ebenso Proteinfragmente, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Fragmente der Aminosäuresequenz SEQ ID No 6 darstellen, mit einer Anzahl von mehr als 26 Aminosäuren je Fragment.

40 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine mikrobielle Carbonyldehydrogenase die N-terminal die Aminosäuresequenz MKAIQIIQ (SEQ ID No 56) und/oder C-terminal die Aminosäuresequenz DLRGRAVVVP (SEQ ID No 57) und/ oder eine der internen Partiaalsequenzen TAAGACHSD (SEQ ID No 58), TPYHAIKPSLP (SEQ ID No 59), DFGVLQPT (SEQ ID No 60), VYGAWGCG (SEQ ID No 61), DDARHLVP (SEQ ID No 62), MTLGHEGA (SEQ ID No 63) oder
45 GGLGHVGIQLLRHL (SEQ ID No 64) enthält.

Die Erfindung betrifft ferner einen Klonierungsvektor, enthaltend eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen codierend für die Carbonylreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen. Die Erfindung umfasst des weiteren einen solchen Klonierungsvektor der zusätzlich zur Carbonylreduktase ein geeignetes Enzym zur Regenerierung des NAD(P) enthält, wie z.B. Formatdehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen oder Glucosedehydrogenase.

55 Die Erfindung betrifft weiterhin einen Expressionsvektor, der sich in einer Bakterien-, Insekten-,

Pflanzen- oder Säugetierzelle befindet und eine Nukleinsäuresequenz enthält die für die Carbonylreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen kodiert und die in geeigneter Weise mit einer Expressionskontrollsequenz verbunden ist. Die Erfindung betrifft ferner eine rekombinante Wirtszelle, die eine Bakterien-, Hefe, Insekten-, Pflanzen-, oder Säugetierzelle ist und mit einem solchen Expressionsvektor transformiert oder transfektiert wurde sowie ein Herstellungsverfahren zur Gewinnung einer Carbonylreduktase die auf Kultivierung einer solchen rekombinanten Wirtszelle beruht.

10 Geeignete Klonierungsvektoren sind beispielsweise ppCR-Script, pCMV-Script, pBluescript (Stratagene), pDrive cloning Vector (Quiagen, Hilden, Deutschland), pS Blue, pET Blue, pET LIC-Vektoren (Novagen, Madison, USA) sowie TA-PCR Klonierungsvektoren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

15 Geeignete Expressionsvektoren sind beispielsweise pKK223-3, pTrc99a, pUC, pTZ, pSK, pBluescript, pGEM, pQE, pET, PHUB, pPLc, pKC30, pRM1/pRM9, pTrxFus, pAS1, pGEx, pMAL oder pTrx.

20 Geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise trp-lac (tac)-Promotor, trp-lac (trc) promotor, lac-Promotor, T7-Promotor oder λ L-Promotor.

25 Die Oxidoreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen lassen sich so gewinnen, dass die oben genannten rekombinanten E. coli Zellen kultiviert werden, die Expression der entsprechenden Oxidoreduktase induziert wird und anschließend nach etwa 10 bis 18 Stunden (h) die Zellen durch Ultraschallbehandlung, durch Naßvermahlung mit Glasperlen in einer Kugelmühle (Retsch, GmbH, Haan Deutschland 10 min, 24 Hz) oder mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen werden. Der erhaltene Zellextrakt kann entweder direkt verwendet werden oder weiter gereinigt werden. Dazu wird der Zellextrakt be-
30 spielsweise zentrifugiert und der erhaltene Überstand wird einer Ionenaustauschchromatographie unterworfen, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie am Q-Sepharose Fast Flow ® (Pharmacia).

35 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung in Gegenwart eines Co-Faktors mit einer Oxidoreduktase reduziert wird, dadurch gekennzeichnet, daß eine Oxidoreduktase eingesetzt wird, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, bei welcher

40 (a) mindestens 70% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 6 und SEQ ID No 8, oder

(b) mindestens 55% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2, oder

(c) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3, oder

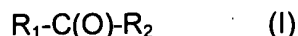
45 (d) mindestens 75% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4, oder

(e) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5, oder

50 (f) mindestens 50 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7.

(g) mindestens 72 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129.

55 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Ketoverbindung die allgemeine Formel I



aufweist, in der R1 für einen der Reste

- 1) $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigtkettig ist,
- 2) $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und gegebenenfalls bis zu vier Doppelbindungen enthält,
- 3) $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und gegebenenfalls bis zu vier Dreifachbindungen enthält,
- 4) $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
- 5) $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
- 6) $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, $-NO_2$ und/oder $-NH_2$ substituiert ist, oder
- 7) $-(C_3-C_7)$ -Cycloalkyl,

steht, wobei die oben unter 1) bis 7) genannten Reste unsubstituiert sind oder unabhängig voneinander ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, $-NO_2$ und/oder $-NH_2$ substituiert sind,

und R₂ für einen der Reste

- 8) $-(C_1-C_6)$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigtkettig ist,
- 9) $-(C_2-C_6)$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und gegebenenfalls bis zu drei Doppelbindungen enthält,
- 10) $-(C_2-C_6)$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und gegebenenfalls zwei Dreifachbindungen enthält, oder
- 11) $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl-C(O)-O- $-(C_1-C_6)$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigtkettig ist und unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, $-NO_2$ und/oder $-NH_2$ substituiert ist,

steht, wobei die oben unter 8) bis 11) genannten Reste unsubstituiert sind oder unabhängig voneinander ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, $-NO_2$ und/oder $-NH_2$ substituiert sind, stehen.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung in Gegenwart eines Co-Faktors mit einer Oxidoreduktase reduziert wird, das dadurch gekennzeichnet, daß eine Oxidoreduktase eingesetzt wird, für welche

- (a) eine Nukleinsäuresequenz aus der Gruppe SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 und SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16 und SEQ ID No 130 codiert, oder für welche
- (b) eine Nukleinsäuresequenz codiert, deren komplementärer Strang mit einer der in (a) genannten Nukleinsäuresequenzen unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert.

Unter dem Begriff Aryl werden aromatische Kohlenstoffreste verstanden mit 6 bis 14 Kohlenstoffatomen im Ring. $-(C_6-C_{14})$ -Arylreste sind beispielsweise Phenyl, Naphthyl, zum Beispiel 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, Biphenyl, zum Beispiel 2-Biphenyl, 3-Biphenyl und 4-Biphenyl, Anthryl oder Fluorenyl. Biphenylreste, Naphthylreste und insbesondere Phenylreste sind bevorzugte Arylreste. Unter dem Begriff "Halogen" wird ein Element aus der Reihe Fluor, Chlor, Brom oder Jod verstanden. Unter dem Begriff $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl wird ein Kohlenwasserstoffrest verstanden, dessen Kohlenstoffkette geradkettig oder verzweigt ist und 1 bis 20 Kohlenstoffatome enthält beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, tertiär-Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonenyl oder Decanyl. Unter dem Begriff "Co-Alkyl" wird eine kovalente Bindung verstanden.

Unter dem Begriff $-(C_3-C_7)$ -Cycloalkyl werden cyclische Kohlenwasserstoffreste verstanden wie Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl oder Cycloheptyl.

Der Begriff $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus" steht für einen monocyclischen oder bicyclischen

5-gliedrigen bis 14-gliedrigen heterocyclischen Ring, der teilweise gesättigt oder vollständig gesättigt ist. Beispiele für Heteroatome sind N, O und S. Beispiele für die Begriffe $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus sind Reste, die sich von Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol, Tetrazol, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Triazolone, Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidindione, Triazole, welche durch F, -CN, -CF₃ oder -C(O)-O-(C₁-C₄)-Alkyl substituiert sind, 3-Hydroxypyrro-2,4-dione, 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazole, Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Indol, Isoindol, Indazol, Phthalazin, Chinolin, Isochinolin, Chinoxalin, Chinazolin, Cinnolin, -Carbolin und benz-anellierte, cyclopenta-, cyclohexa- oder cyclohepta-anellierte Derivate dieser Heterocyclen ableiten. Insbesondere bevorzugt sind die Reste 2- oder 3-Pyrrolyl, Phenylpyrrolyl wie 4- oder 5-Phenyl-2-pyrrolyl, 2-Furyl, 2-Thienyl, 4-Imidazolyl, Methylimidazolyl, zum Beispiel 1-Methyl-2-, -4- oder -5-imidazolyl, 1,3-Thiazol-2-yl, 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 2-, 3- oder 4-Pyridyl-N-oxid, 2-Pyrazinyl, 2-, 4- oder 5-Pyrimidinyl, 2-, 3- oder 5-Indolyl, substituiertes 2-Indolyl, zum Beispiel 1-Methyl-, 5-Methyl-, 5-Methoxy-, 5-Benzyl-, 5-Chlor- oder 4,5-Dimethyl-2-indolyl, 1-Benzyl-2- oder -3-indolyl, 4,5,6,7-Tetrahydro-2-indolyl, Cyclohepta[b]-5-pyrrolyl, 2-, 3- oder 4-Chinolyl, 1-, 3- oder 4-Isochinolyl, 1-Oxo-1,2-dihydro-3-isochinolyl, 2-Chinoxalinyll, 2-Benzofuranyl, 2-Benzo-thienyl, 2-Benzoxazolyl oder Benzothiazolyl oder Dihydropyridinyl, Pyrrolidinyl, zum Beispiel 2- oder 3-(N-Methylpyrrolidinyl), Piperazinyl, Morpholinyl, Thiomorpholinyl, Tetrahydrothienyl oder Benzodioxolanyl.

Bevorzugte Verbindungen der Formel I sind beispielsweise Ethyl-4-chloracetoacetat, Methylacetoacetat, Ethyl-8-chloro-6-oxooctansäure, Ethyl-3-oxovaleriat, 4-Hydroxy-2-butanon, Ethyl-2-oxovaleriat, Ethyl-2-oxo-4-phenylbuttersäure, Ethylpyruvat, Ethylphenylglyoxylat, 1-Phenyl-2-propanon, 2-chloro-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-on, Acetophenon, 2-Octanon, 3-Octanon, 2-Butanon, 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethan-1-one, 2,5-Hexandion, 1,4-Dichlor-2-butanon, Acetoxyaceton, Phenacylchlorid, Ethyl-4-bromoacetoacetat, 1,1-Dichloraceton, 1,1,3-Trichloraceton oder 1-Chloraceton.

Die Oxidoreduktasen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder vollständig gereinigt oder teilweise gereinigt eingesetzt werden oder mit Zellen, enthaltend die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen, durchgeführt werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen. Bevorzugt werden die klonierten Oxidoreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 bzw. deren Homologe eingesetzt.

Je kg umzusetzender Verbindung der Formel I werden 5 000 bis 10 Mio U Oxidoreduktase eingesetzt. (nach oben offen) Der Enzymeinheit 1 U entspricht dabei der Enzymmenge die benötigt wird um 1 µmol der Verbindung der Formel I je Minute (min) umzusetzen.

Die enzymatische Reduktion selbst läuft unter milden Bedingungen ab, so dass die erzeugten Alkohole nicht weiterreagieren. Die erfindungsgemäßen Verfahren weisen eine hohe Standzeit und eine Enantiomerenreinheit von in der Regel mehr als 95% der hergestellten chiralen Alkohole und eine hohe Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge an Ketoverbindungen auf.

Die Carbonylverbindung wird im erfindungsgemäßen Verfahren in einer Menge von 3% bis 50% bezogen auf das Gesamtvolumen eingesetzt, bevorzugt von 5% bis 40%, insbesondere von 10% - 30%.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass das bei der Reduktion gebildete NAD oder NADP kontinuierlich mit einem Cosubstrat zu NADH bzw. NADPH reduziert wird.

Als Cosubstrat werden dabei bevorzugt primäre und sekundäre Alkohole, wie Ethanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 3-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Heptanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol eingesetzt.

Diese Cosubstrate werden mit Hilfe einer Oxidoreduktase und NAD bzw. NADP zu den entsprechenden Aldehyden oder Ketonen und NADH bzw. NADPH umgesetzt. Dadurch kommt es zur Regenerierung des NADH bzw. NADPH. Der Anteil des Cosubstrates für die Regenerierung beträgt dabei von 5 bis 95 Vol%, bezogen auf das Gesamtvolumen.

5

Zur Regenerierung des Cofactors kann zusätzlich eine Alkoholdehydrogenase zugesetzt werden. Geeignete NADH-abhängige Alkoholdehydrogenasen sind beispielsweise erhältlich aus Bäckerhefe, aus *Candida boidinii*, *Candida parapsilosis* oder *Pichia capsulata*. Geeignete NADPH-abhängige Alkoholdehydrogenasen kommen ferner vor in *Lactobacillus brevis* (DE 196 10 984 A1), *Lactobacillus minor* (DE 101 19 274), *Pseudomonas* (US 5,385,833) oder in *Thermoanaerobium brockii*. Geeignete Cosubstrate für diese Alkoholdehydrogenasen sind die bereits genannten sekundären Alkohole wie Ethanol, 2-Propanol (Isopropanol), 2-Butanol, 2-Pentanol, 4-Methyl-2-pentanol, 2-Octanol oder Cyclohexanol.

10

15

Ferner kann die Cofactorregenerierung beispielsweise auch mit mittels NAD- oder NADP-abhängiger Formiat-Dehydrogenase (Tishkov et al., J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific Formate dehydrogenase) durchgeführt werden. Geeignete Cosubstrate der Formiat-Dehydrogenase sind beispielsweise Salze der Ameisensäure wie Ammoniumformiat, Natriumformiat oder Calciumformiat. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Verfahren jedoch ohne eine solche zusätzliche Dehydrogenase durchgeführt, d.h. es findet eine substratgekoppelte Coenzymregenerierung statt.

20

25

Der wässrige Anteil des Reaktionsgemisches, in dem die enzymatische Reduktion abläuft enthält bevorzugt einen Puffer, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer, mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise ein pH-Wert von 6 bis 9. Der Puffer kann zusätzlich noch Ionen zur Stabilisierung oder Aktivierung der Enzyme enthalten, beispielsweise Zinkionen oder Magnesiumionen.

30

Die Temperatur beträgt während der Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren zweckmäßig von etwa 10°C bis 70°C, bevorzugt von 20°C bis 40°C.

35

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren wird die enzymatische Umsetzung in Anwesenheit eines mit Wasser nicht oder nur beschränkt mischbaren organischen Lösungsmittels durchgeführt. Dieses Lösungsmittel ist beispielsweise ein symmetrischer oder unsymmetrischer Di(C₁-C₆)alkylether, ein geradkettiges oder verzweigtes Alkan oder Cycloalkan oder ein wasserunlöslicher sekundärer Alkohol, der zugleich das Cosubstrat darstellt. Die bevorzugten organischen Lösungsmittel sind beispielsweise Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether, Butylacetat, Heptan, Hexan, 2-Oktanol, 2-Heptanol, 4-Methyl-2-pentanol oder Cyclohexan. Das Lösungsmittel kann dabei auch gleichzeitig als Cosubstrat zu Cofaktorregenerierung dienen.

40

45

Der Reaktionsansatz besteht beim Einsatz wasserunlöslicher Lösungsmittel bzw. Cosubstrate aus einer wässrigen und einer organischen Phase. Das Substrat verteilt sich entsprechend seiner Löslichkeit zwischen organischer und wässriger Phase. Die organische Phase hat allgemein einen Anteil von 5 bis 95%, bevorzugt von 10 bis 90% bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen. Die zwei flüssigen Phasen werden bevorzugt mechanisch gemischt, so dass eine große Oberfläche zwischen ihnen erzeugt wird. Auch in dieser Ausführungsform kann das bei der enzymatischen Reduktion gebildete NAD bzw. NADP mit einem Cosubstrat, wie beschrieben, wieder zu NADH bzw. NADPH reduziert werden.

50

Die Konzentration des Cofactors NADH bzw. NADPH in der wässrigen Phase beträgt allgemein 0,001 mM bis 1 mM, insbesondere 0,01 mM bis 0,1 mM.

55

In den erfindungsgemäßen Verfahren kann noch ein Stabilisator der Oxidoreduktase/Dehydro-

genase eingesetzt werden. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Glycerin, Sorbitol, 1,4-DL-Dithiothreit (DTT) oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise in einem geschlossenen Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft gerührt. Die Reaktionszeit beträgt von 1 Stunde bis 48 Stunden, insbesondere von 2 Stunden bis 24 Stunden.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wird die wässrige Phase abgetrennt, die organische Phase wird filtriert. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls noch einmal extrahiert werden und wie die organische Phase weiter aufgearbeitet werden. Danach wird gegebenenfalls das Lösungsmittel aus der filtrierten organischen Phase verdampft.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung von chiralen Hydroxyverbindung der Formel II,



wobei R^1 und R^2 wie oben definiert sind, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- a) ein Gemisch, enthaltend die racemische Verbindung der Formel II, in Anwesenheit einer der erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 129 oder deren Homologen, NAD(P) und Wasser inkubiert, wobei ein Enantiomer der Hydroxyverbindung der Formel II zur entsprechenden Ketoverbindung und NAD(P)H umgesetzt wird, und
- b) das verbliebene Enantiomer der Hydroxyverbindung der Formel II isoliert.

Bei Einsatz der Carbonylreduktasen gemäß SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 129 erhält man dabei bevorzugt die entsprechenden chiralen R-Hydroxyverbindungen. Bei Einsatz der Carbonylreduktasen gemäß SEQ ID No 2, SEQ ID No 4 und SEQ ID No 8, erhält man dabei bevorzugt die entsprechenden chiralen S-Hydroxyverbindungen.

Die Reaktionsbedingungen sind im wesentlichen dieselben wie im obengenannten Verfahren zur enantiospezifischen Reduktion der Ketoverbindung der Formel I. Es wird jedoch statt einer enantioselektiven Reduktion der Ketoverbindung der Formel I aus dem racemischen Gemisch der Verbindung der Formel II nur ein Enantiomer der Hydroxyverbindung der Formel II enantioselektiv zur entsprechenden Ketoverbindung oxidiert. Dadurch verbleibt das entgegengesetzte Enantiomer der Hydroxyverbindung der Formel II und kann isoliert werden. Ferner wird im Verfahren anstelle der als Cosubstrate eingesetzten Alkohole wie Ethanol, 2-Propanol (Isopropanol), 2-Butanol, 2-Pentanol oder 2-Octanol, deren entsprechenden Ketone wie Aceton zur Regenerierung des NAD eingesetzt. Beispielsweise wird das Aceton und NAD(P)H mit der erfindungsgemäßen Oxidoreduktase oder einer zusätzlichen Dehydrogenase zu NAD und Isopropanol umgesetzt.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden mit den folgenden Beispiele noch näher erläutert.

Beispiel 1:

Anzucht von Organismen und Screening nach Carbonylreduktaseaktivität

Zum Screening wurden die Hefestämme *Rhodotorula mucilaginosa* DSMZ 70825, *Pichia farino-*

sa DSMZ 3316, *Candida nemodendra* DSMZ 70647, *Pichia stipidis* DSMZ 3651 und *Pichia trehalophila* DSMZ 70391, *Lodderomyces elongisporus* DSMZ 70320 in folgendem Medium kultiviert: Hefeextrakt (3), Malzextrakt (3), Peptone (5) und Glucose (10) (Zahlen in Klammern sind jeweils g/l). Das Medium wurde bei 121 °C sterilisiert und die Hefen wurden ohne weitere
5 pH-Regulierung bei 25°C und auf einem Schüttler bei 160 Umdrehungen pro Minute (rpm) kultiviert.

Der Stamm *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576 wurde in folgendem Medium kultiviert: Glucose (20), Hefeextrakt (5), Fleischextrakt (10), Di-Ammoniumhydrogencitrat (2), Natriumacetat (5),
10 Magnesiumsulfat (0,2), Mangansulfat (0,05), Di-Kaliumhydrogenphosphat (2). Das Medium wurde bei 121°C sterilisiert und der Organismus wurde bei 30°C ohne weitere pH-Regulierung oder Sauerstoffzufuhr kultiviert.

Der Stamm *Microbacterium spec.* DSMZ 20028 wurde auf einem Medium aus Hefeextrakt (3) und Trypticase Sojamehl (30) bei 30°C und 160 Umdrehungen pro Minute (rpm) kultiviert.
15

Der Stamm *Gordonia rubripertincta* DSMZ 43570 wurde auf einem Medium aus Hefeextrakt (4), Glucose (4), Malzextrakt (10) und CaCO₃ (2) bei 37°C und 160 Umdrehungen pro Minute (rpm) kultiviert.
20

Anschließend wurden 125 mg Zellen mit 800 µl Aufschlusspuffer (100 mM Triethanolamin (TEA), pH = 7,0) resuspendiert, mit 1 g Glasperlen versetzt und 10 Minuten (min) bei 4°C in der Kugelmühle aufgeschlossen (Retsch). Der nach 2 min Zentrifugation bei 12000 rpm erhaltene Überstand (Lysat) wurde im folgenden Aktivitätsscreening und zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (ee-Wert) eingesetzt. Als Substrate wurden verschiedene Ketone, wie 2-Butanon, 2-Oktanon, Ethyl-4-chloracetoacetat, Acetophenon oder Ethyl-2-oxo-4-phenylbuttersäure verwendet.
25

Ansatz fürs Aktivitätsscreening:

30 860 µl 0,1 M KH₂PO₄/K₂PO₄ pH = 7,0 1mM MgCl₂
20 µl NADPH oder NADH (10 mM)
20 µl Lysat
100 µl Substrat (100 mM)

35 Die Reaktion wurde 1 min bei 340 nm verfolgt.

Ansatz für ee-Wert Bestimmung:

40 20 µl Lysat
100 µl NADH oder NADPH (50 mM)
60 µl Substrat (100 mM)

Die Ansätze zur ee-Bestimmung wurden nach 24 Stunden (h) beispielsweise mit Chloroform extrahiert und mittels Gaschromatographie (GC) wurde der Enantiomerenüberschuss bestimmt. Der Enantiomerenüberschuss wird wie folgt berechnet:
45

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

Tabelle 1

DSMZ Nr.	Mikroorganismus	Aktivität in U/g Zellen Wirtsorganismus			
		2-Butanon		2-Oktanon	
		NADH	NADPH	NADH	NADPH
70825	Rhodotorula mucilaginosa	<1	-----	<1	-----
3316	Pichia farinosa	12	-----	<1	-----
70647	Candida nemodendra	45	-----	12	-----
3651	Pichia stipidis	10	-----	6,4	-----
70391	Pichia trehalophila	85	-----	45	-----
5576	Leuconostoc carnosum	-----	77	-----	77
20028	Microbacterium spec.	9	-----	26	-----
43570	Gordonia rubripertincta	7,7	-----	13	-----
70320	Lodderomyces elongisporus	40	-----	34	-----

DSMZ steht für Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig. Definition der Enzymeinheiten: 1 U entspricht der Enzymmenge die benötigt wird um 1 μmol Substrat pro min umzusetzen.

Beispiel 2:

Isolierung und Reinigung von NAD(P)H abhängigen mikrobiellen Oxidoreduktasen

Zur Isolierung der NAD(P)H abhängigen mikrobiellen Oxidoreduktasen wurden die Mikroorganismen wie unter Beispiel 1 beschrieben kultiviert. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet und durch Zentrifugation vom Medium getrennt. Die Enzymfreisetzung erfolgte durch Naßvermahlung mittels Glasperlen, kann aber auch durch andere Aufschlussmethoden erreicht werden. Dazu wurden beispielsweise 100 g Zellfeuchtmasse mit 400 ml Aufschlusspuffer (100 mM Triethanolamin, 1 mM MgCl_2 , pH=7,0) suspendiert und mittels einer French press homogenisiert.

Der nach Zentrifugation (7000 rpm) erhaltene Rohextrakt wurde dann mittels FPLC (fast protein liquid chromatography) weiter aufgereinigt.

Alle erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen konnten durch unterschiedliche Kombinationen von Ionenaustauschchromatographie, beispielsweise an Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) oder Uno Q (Biorad, München, Deutschland), hydrophober Interaktionschromatographie, beispielsweise an Octylsepharose Fast Flow oder Butylsepharose Fast Flow (Pharmacia), Keramik-Hydroxyapatit-Chromatographie und Gelpermation aufgereinigt werden.

Beispiel 2a:

Reinigung einer NADH abhängigen Oxidoreduktase aus Pichia farinosa DSMZ 3316

Zur Proteinisolierung wurde das nach Zentrifugation erhaltene Lysat aus *Pichia farinosa* DSMZ 3316 direkt auf eine mit 100 mM Triethanolaminpuffer pH = 7,0 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibrierte Butylsepharose FF-Säule aufgetragen und mit fallendem linearen Salzgradienten eluiert. Die oxidoreduktase-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ein geeignetes Volumen eingengt.

Anschließend wurde die eingengten Fraktionen der Oxidoreduktase mittels Uno Q weiter aufgereinigt. Dazu wurde die Oxidoreduktase direkt auf eine mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH = 7,0 äquilibrierte UnoQ-Säule (Biorad) aufgetragen und mit steigendem linearen Salzgra-

dienten eluiert, wobei die Oxidoreduktase ohne Bindung bei 0 M NaCl eluierte während ein Großteil der Verunreinigungen gebunden wurde und bei höheren Salzkonzentrationen eluierte.

Der dritte Reinigungsschritt wurde an einer Keramik Hydroxyapatit Säule (Pharmacia) durchgeführt, wobei die Oxidoreduktase auf eine mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 1 mM MgCl₂ pH = 6,8 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit steigender Pufferkonzentration (400 mM Kaliumphosphatpuffer 1mM MgCl₂ pH = 6,8 eluiert wurde. Die Oxidoreduktase wurde bei 80-100 mM Kaliumphosphatpuffer eluiert.

Danach wurde das Molekulargewicht der erhaltenen aufgereinigten Oxidoreduktase mit Hilfe von Gelpermeation (Superdex 200 HR; Pharmacia, 100 mM Triethanolamin, pH = 7, 0,15 M NaCl) bestimmt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (69,8 kDa) und Ovalbumin (49,4 kDa) verwendet.

Die folgende Tabelle 2 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen

Tabelle 2:

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Aktivität [U/ml] 2-Butanon	Gesamtaktivität [U] 2-Butanon	Spezifische Aktivität [U/mg] 2-Butanon	Ausbeute
Rohextrakt	70	1,3	80	0,1	100%
Butylsepharose	10	4,4	44	1,7	55%
Uno Q	1,4	17	24	5	30%
Hydroxyapatit	0,7	13,5	9,5	16	12%

Die Enzymaktivität der Oxidoreduktase wurde im Testsystem gemäß Beispiel 1, (Ansatz Aktivitätsscreening) bestimmt und die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte gemäß Lowry et al. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951): 265-275 oder Peterson et al., *Analytical Biochemistry*, 100 (1979): 201-220). Der Quotient von Enzymaktivität zu Proteinmenge ergibt die spezifische Aktivität, wobei der Umsatz von 1 µmol pro min 1 Unit (U) entspricht.

Beispiel 2b:

Reinigung einer NADH abhängigen Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec. DSMZ 20028*

Zur Proteinisolierung wurde das nach Zentrifugation erhaltene Lysat aus *Microbacterium spec. DSMZ 20028* auf eine mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH = 7,0 äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen und mit steigendem linearen Salzgradienten eluierte. Die Oxidoreduktase wurde dabei bei 0,6 bis 0,8 M NaCl eluiert. Die Oxidoreduktase-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ein geeignetes Volumen eingengt.

Anschließend wurden die eingengten Fraktionen der Oxidoreduktase mittels Uno Q weiter aufgereinigt. Dazu wurde die Oxidoreduktase direkt auf eine mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH = 7,0 äquilibrierte UnoQ-Säule (Biorad) aufgetragen und mit steigendem linearen Salzgradienten eluiert, wobei die Oxidoreduktase bei 0,2-0,25 M NaCl eluierte.

Der dritte Reinigungsschritt wurde an einer Keramik Hydroxyapatit Säule (Pharmacia) durchgeführt wobei die Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec. DSMZ 20028* auf eine mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 1 mM MgCl₂ pH = 6,8 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit steigender Pufferkonzentration (400 mM Kaliumphosphatpuffer 1 mM MgCl₂ pH = 6,8) eluiert wurde. Die Oxidoreduktase wurde bei 80-100 mM Kaliumphosphatpuffer eluiert. Danach wurde das Molekulargewicht der erhaltenen aufgereinigten Oxidoreduktase wie unter 2a beschrieben

bestimmt.

Die folgende Tabelle 3 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen

5 Tabelle 3:

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Aktivität [U/ml] 2-Oktanon	Gesamtaktivität [U] 2-Oktanon	Spezifische Aktivität [U/mg] 2-Oktanon	Ausbeute
10 Rohextrakt	55	3,8	212	0,4	100%
Q-Sepharose FF	34	4,1	139	0,56	65%
Uno Q	0,8	9,3	7,5	3,8	3,5%
15 Hydroxyapatit	0,5	4,2	2,1	117	1%

15 *Beispiel 3:*

Bestimmung der N-terminalen Sequenz einer erfindungsgemäßen Oxidoreduktase

20 Die Enzympräparationen nach Beispiel 2 wurden nach der Gelpermeation im 10% igen Natrium-dodecylsulfat (SDS) Gel aufgetrennt und auf eine Polyvinyliden Difluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen.

25 Die auffällige Bande wurde einer N-terminalen Sequenzierung mittels Edman-Abbau (Procise 492 (PE-Biosystems) unterworfen.

Beispiel 4:

30 *Allgemeine Klonierungsstrategie einer enantioselektiven Alkoholdehydrogenase isoliert aus Hefen*

35 Chromosomale DNA wird nach der in Molecular cloning von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure dient als Matrize für die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern. Dabei werden 5'-Primer von der Aminosäuresequenz (SEQIDNo. 66; 72; 80) und die 3'-Primer von der Aminosäuresequenz (SEQIDNo. 67; 73, 81) unter Einbeziehung des für Organismus spezifischen Genkodes abgeleitet (SEQIDNo. 68; 69; 74; 75; 82; 83).

40 Die Amplifizierung wird in PCR-Puffer [67mM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 115 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20], 0.2 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat Mix (dNTPs), 40 pMol je Primer und 2.5 U BioTherm Star Polymerase (Genecraft, Lüdingshausen, Deutschland)] durchgeführt. Nach einer Aktivierung der BioTherm Star Polymerase (8 min 95°C) und folgenden 45-50 Zyklen einer Touch-Down PCR wird die Reaktion auf 4°C abgekühlt und der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1% Agarose Gel zur Analyse aufgetragen.

45 Das spezifische Fragment, das der Polymerase Kettenreaktion resultiert, wird in den TA-Kloningsvektor pCR2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und mit den Primern M13 rev (SEQIDNo 65) und M13 uni (SEQIDNo 128) mit Hilfe von ABI DNA Sequenzer sequenziert.

50 Die 5'- und 3'-terminale Bereiche der Gen kodierenden Sequenz werden mit Hilfe von RACE Methode (rapid amplification of cDNA ends) bestimmt. Basierend auf der Nukleinsäuresequenz des spezifischen Fragments werden Oligonukleotide für 3'-RACE und 5'-RACE konstruiert. Als Matrize für die Synthese vom ersten cDNA Strang mit Hilfe von 3'-RACE System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) dient aus den Zellen präparierte gesamte RNA. Es folgen eine Amplifikation und eine Reamplifikation des spezifischen cDNA mit Hilfe von 3'-RACE Oligonukleotiden

55

(SEQIDNo. 76; 77; 84; 85). Anschließend wird der Ansatz zur Analyse auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen. Das spezifische Fragment, das die fehlende 3'-flankierende Sequenzinformation trägt, wird isoliert in einen TA-Kloningsvektor pCR2.1 ligiert und sequenziert.

5 Die kodierenden und nicht kodierenden 5'-terminalen Sequenzen werden mit Hilfe von 5'-RACE System (Invitrogen) bestimmt. Dazu wird mit Hilfe von Oligo dT-Cellulose (NEB, Beverly, USA) mRNA aus der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA angereichert und in die Synthese des ersten cDNA Stranges mit den genspezifischen Oligonukleotiden (SEQIDNo. 70; 71; 78; 79; 86; 87) angesetzt. Nachfolgende Amplifikation und Reamplifikation der spezifischen cDNA resultiert in
10 einem Fragment, das zur Analyse in ein pCR2.1 TA-Kloningsvektor (Invitrogen) ligiert wird. Das das Fragment enthaltende Plasmid wird mit Hilfe eines ABI DNA Sequenzer analysiert. Somit werden die fehlende Sequenzinformationen über 5'-Ende des Gens gewonnen.

Protein	Rhodotorulla mucilaginosa	Pichia farinosa	Pichia stipitis
15 Ansequenzierte Peptide	VATAVETFG (SEQIDNo 66) FGEAVEQAR (SEQIDNo 67)	LLTQTLALEQAK (SEQIDNo 72) YNFTNKVAITGGI (SEQIDNo 73)	ADQVLLK (SEQIDNo 80) ISFNLGLDLALR (SEQIDNo 81)
20 Primer für Touch-Down PCR	CCRAAYTCVACVGCVTSGC (SEQIDNo 68) GCCTGYTCGACVGCYTCRCC (SEQIDNo 69)	YTGYTCYAANGCYAADGTYTG (SEQIDNo 74) CHAAAYAARGTNGCHATHATYAC HGG (SEQIDNo 75)	GCYGAYCARGTNTTRTTRAAR (SEQIDNo 82) CTYAARGCYAARTCDCCYAAR (SEQIDNo 83)
Primer für 3'-RACE		CAACGTTCTGAAGAGATGACTTAG (SEQIDNo 76) GGTGGAGTGAAGTTATTGAC (SEQIDNo 77)	CTACCATGCCATGAGATTAG (SEQIDNo 84) GCTGTAGACGTCGCTAAGAG (SEQIDNo 85)
25 Primer für 5'-RACE	CTCCGAGGTGTTGAGCGCAT TG (SEQIDNo 70) GACGAGGTTCTTGATGTCGT CCTCC (SEQIDNo 71)	GCCATTCTTAGCCTGTTTCGAGAG (SEQIDNo 78) GTCATCTCTTCAGAACGTTGATC TT (SEQIDNo 79) CCAAAGGAGCTTATAGCAGTCT (SEQIDNo 88)	GATTCTCAAGGCTAAGTCAC (SEQIDNo 86) GATCTAACACCAGCTAATCT (SEQIDNo 87)

30 Basierend auf der Sequenz, die für das Vollängen-Gen kodiert (SEQIDNo. 9; 10; 11) werden spezifische Primer für eine nachfolgende Klonierung dieses DNA Abschnittes in ein passendes Expressionssystem konstruiert. Dafür werden beispielsweise 5'-Primer mit einer Erkennungssequenz für Nde I, bzw. mit einer Erkennungssequenz für Sph I, bzw. für BamHI und 3' Primer mit einer Erkennungssequenz für Hind III modifiziert (SEQIDNo. 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96).

35 Chromosomale DNA dient in nachfolgender PCR als Matrize. Der für die jeweilige Oxidoreduktase kodierende DNA Abschnitt wird mit Hilfe von *Platinum pfx* Polymerase (Invitrogen) amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wird nach der Reinigung über ein 1% Agarose Gel mit entsprechenden DNA Endonukleasen behandelt und in das mit den gleichen Endonukleasen
40 behandelten Rückgrad des pET21a Vektors (Novagen, Madison, USA), bzw. Rückgrad des pQE70 Vektors (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert.

Das entstandene Expressionskonstrukt wird nach der Sequenzierung in Expressionsstamm BL21 Star (Invitrogen), bzw. RB791 (E.coli genetic stock, Yale, USA) gebracht.

4a. Klonierung einer enantioselektiven Oxidoreduktase aus Hefe *Pichia Farinosa*

50 Zur Klonierung der Oxidoreduktase aus *Pichia farinosa* wurde beispielsweise chromosomale DNA aus den frischen Zellen *Pichia Farinosa* nach der in Molecular cloning von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure diente als Matrize für eine Touch-Down PCR mit Oligonukleotiden SEQIDNo. 74; 75. Nach einer 8 minutigen Aktivierung der Biotherm Star Polymerase in einem PCR Cycler (BioRad, Hercules, USA) wurden folgende 30 Temperatur-Zyklen für eine Identifizierung des spezifischen DNA Fragmentes programmiert:

55

94 ° C	45 Sec
60 ° C - 0.5 ° C / cycle	45 Sec
68 ° C	2 min

5 Anschließend wurde das Amplifizierungssignal durch weitere 20 Zyklen

94 ° C	40 Sec
52 ° C	40 Sec
72 ° C	1 Min

10

verstärkt. Nach der Auftrennung des gesamten Reaktionsansatzes in einem 1% Agarose Gel wurde ein spezifisches Fragment mit einer Größe von 550 bp detektiert. Dieses Fragment wurde aus dem Gel eluiert und in den pCR2.1 TA-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Das entstandene Plasmid pCR2.1-PF550 wurde einer Sequenzierung unterzogen.

15

Sequenzanalyse des 550 bp langen Genfragmentes zeigte einen offenen Leserahmen von 174 Aminosäurenresten, in den auch beide Sequenz-Fragmente des N-Terminus und des internen Peptides wieder zu finden waren.

20

Basierend auf die Nukleotidsequenz des 521 bp langen Fragmentes wurden Oligonukleotide für eine 3'-RACE (SEQIDNo 76; 77) und 5'-RACE (SEQIDNo 78; 79; 88) konstruiert. Für die cDNA Synthese Reaktion wurde die gesamte RNA aus den Zellen *Pichia farinosa* wie folgt präpariert.

25

600 mg frische Zellen wurden in 2,5 ml eiskalten LETS Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 5 ml (etwa 20 g) in Salpetersäure gewaschener Glasperlen, equilibriert mit 3 ml Phenol (pH 7.0), dazugegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann insgesamt 10 min jeweils 30 sec gevortext und 30 sec auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 5 ml eiskalten LETS Puffer dazugegeben und noch mal kräftig gevortext. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 11000 g bei 4 ° C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde gewonnen und mit gleichem Volumen an Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (24:24:1) zweimal extrahiert. Anschließend es folgte die Extraktion mit Chloroform. Nach der letzten Extraktion wurde die gesamte RNA durch die Zugabe von 1 / 10 Vol an 5 M LiCl₂ bei -20 ° C 4 h präzipitiert. Die Synthese von dem ersten cDNA Strang wurde mit Hilfe von 3'RACE System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde die spezifische cDNA mit Oligonukleotiden SEQIDNo76 und AUAP (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in der Reaktion: 67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 115 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20], 0.2 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat Mix (dNTPs), 10 pMol je Primer und 2.5 U BioTherm Star Polymerase (Genecraft, Lüdingshausen, Deutschland) und folgenden 30 Temperatur-Zyklen: 94 ° C 40 Sec, 55 ° C 40 Sec, 72 ° C 1 Min amplifiziert.

30

40

Das PCR-Signal wurde durch eine Nest-PCR mit Primer SEQIDNo 77 und Primer UAP (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 30 Temperatur-Zyklen: 94 ° C 40 Sec, 55 ° C 40 Sec, 72 ° C 50 Sec verstärkt. Es resultierte ein spezifisches DNA Fragment einer Größe von ungefähr 400 bp, das nach der Isolierung aus dem 1% Agarose Gel in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert wurde. Die Sequenzanalyse des 382 bp langen DNA Abschnittes lieferte Sequenzinformationen über die 3'-Verlängerung bis zu dem Stop-Kodon und der poly-A Schleife der für die Oxidoreduktase aus *Pichia Farinosa* kodierenden cDNA.

45

50

Für die 5'RACE Reaktion wurden 5 µg gesamt RNA präpariert aus den Zellen *Pichia farinosa* benutzt. Die Synthese von genspezifischer cDNA wurde mittels 5'RACE System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und dem Oligonukleotid SEQIDNo 78 durchgeführt. Die resultierende genspezifische cDNA wurde einer homopolymerischen dCTP Addierungsreaktion unterzogen. Anschließend es folgte eine Amplifizierung der cDNA in einer PCR [67mM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 115 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20], 0.2 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat Mix (dNTPs), 20 pMol Primer SEQIDNo 79 und Primer AAP (Invitrogen), 2.5 U BioTherm Star Polymerase (Genecraft, Lüdingshausen, Deutschland) und folgenden 35 Temperatur-Zyklen: 94 ° C

55

45 sec, 54 ° C 45 sec, 72 ° C 1 min 30 sec. Das PCR-Signal wurde durch eine Nest-PCR mit Primer SEQIDNo 88 und Primer UAP (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 30 Temperatur-Zyklen: 94 ° C 40 sec, 55 ° C 40 sec, 72 ° C 1 min verstärkt. Es resultierte ein spezifisches DNA Fragment einer Größe von ungefähr 350 bp, das nach der Elution aus dem 1% Agarose Gel in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert wurde. Die Sequenzanalyse des 352 bp langen DNA Segmentes lieferte Sequenzinformationen über 5'-Ende der für die Alkoholdehydrogenase / Reduktase kodierenden cDNA.

Somit besitzt das DNA Segment, das für das Protein kodiert, eine gesamt Länge von 765 bp (SEQIDNo 10), und einen offenen Leserahmen von 254 Aminosäuren (SEQIDNo 2). Chromosomale DNA der *Pichia farinosa* Zellen wurde als Matrize für die Generierung der Vollängen-DNA in einer Polymerase Kettenreaktion [10 mM Tris-HCl, (pH 8.0); 50 mM KCl; 10 mM MgSO₄; 0.2 mM dNTP Mix; 20 pMol Primer SEQIDNo 91, bzw. 20 pMol Primer SEQIDNo 92, 20 pMol Primer SEQIDNo 93 und 2 U *Platinum pfx* Polymerase (Invitrogen)] und Temperatur-Zyklen:

Zyklus 1	94 ° C, 2 min
Zyklus 2 x 30	94 ° C, 15 sec
	56 ° C, 20 sec
	68 ° C, 1 min 15 sec

verwendet.

Das resultierende PCR-Produkt wurde nach der Reinigung über 1% Agarose Gel mit Nde I und Hind III, bzw. mit Sph I und Hind III behandelt und in das mit den gleichen Endonukleasen behandelten Rückgrad des Vektors pET21a (Novagen, Madison, USA), bzw. pQE70 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert. Nach der Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes in *E.coli* Top10F' Zellen wurden Plasmid-DNA's Ampicillin-resistenter Kolonien mittels einer Restriktionsanalyse mit Endonukleasen Nde I, bzw. Sph I und Hind III auf die Richtigkeit der erfolgten Ligation überprüft. Die DNA der für das Insert positiven Vektoren wurde in Expressionsstamm BL21 Star (Invitrogen), bzw. RB791 (*E.coli* genetic Stock, Yale, USA) transformiert.

Beispiel 5:

Allgemeine Klonierungsstrategie einer enantioselektiven Oxidoreduktase isoliert aus Bakterien

Genomische DNA wird nach der in Molecular cloning von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure dient als Matrize für die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern. Dabei werden 5'-Primer von der Aminosäuresequenz (SEQIDNo 104; 112) und die 3'-Primer von der Aminosäuresequenz (SEQIDNo 105; 113) unter Einbeziehung des für Organismus spezifischen Genkodes abgeleitet (SEQIDNo 106; 107; 114; 115)

Die Amplifizierung wird in PCR-Buffer [67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 115 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20], 0.2 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat Mix (dNTPs), 40 pMol je Primer und 2.5 U BioTherm Star Polymerase (Genecraft, Lüdingshausen, Deutschland)] durchgeführt. Nach einer Aktivierung der BioTherm Star Polymerase (8 min 95 ° C) und folgenden 45-50 Zyklen einer Touch-Down PCR wird die Reaktion auf 4 ° C abgekühlt und der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1% Agarose Gel zur Analyse aufgetragen.

Das spezifische Fragment, das der Polymerase Kettenreaktion resultiert, wird in den TA-Kloningsvektor pCR2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und mit den Primern M13 rev (SEQIDNo 65) und M13 uni (SEQIDNo 128) mit Hilfe eines ABI DNA Sequenzer sequenziert.

5'-und 3'-flankierende Bereiche der Gen kodierenden Sequenz werden mit Hilfe von inversen Polymerase Kettenreaktionsmethode (iPCR) bestimmt. Basierend auf der Nukleinsäuresequenz des spezifischen internen Fragments werden Oligonukleotide SEQIDNo 100; 101; 102; 103; 108; 109; 110; 111; 116; 117; 118; 119 konstruiert. Genomische DNA wird mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease verdaut und in eine Religation eingesetzt, so dass kleinere DNA Abschnitte zirkularisieren. Dieses Religationsgemisch wird dann als Matrize für eine iPCR und Primer SEQIDNo 100; 102; 108; 110; 116; 118 verwendet. Das PCR-Signal wird durch anschließende Nest-PCR mit Primer SEQIDNo 101; 103; 109; 111; 117; 119 verstärkt. Das resultierende spezifische Fragment wird nach der Elution aus dem 1% Agarose Gel in das Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert.

Somit liefert die Sequenzierungsanalyse des Fragment enthaltenden Vektors pCR2.1 die fehlende Sequenzinformationen über 3'- und 5'-kodierende Bereiche des Alkoholdehydrogenase / Reduktase Gens.

Protein	Leuconostoc carnosum	Microbacterium sp.	Gordonia rubropertincta
Ansequenzierte Peptide	NIEETTYEDWK (SEQIDNo 97)	MKALQYTKIGSHPE (SEQIDNo 104) AYEALAAGTVV (SEQIDNo 105)	MKAIQIIQPG (SEQIDNo 112) VGFFTQPYEVSVR (SEQIDNo 113)
Primer für Touch-Down PCR	GACAGAWMGWTTNAARGGW AARGTHGC (SEQIDNo 98) GCBGTRTAWCCNCCRTCDAC DACRAAYTC (SEQIDNo 99)	CTSCARTACACVAAGATCGG (SEQIDNo 106) GCBGCSAGBGYTCRTABGC (SEQIDNo 107)	ATGAARGCNATYCARATYA TYCARCC (SEQIDNo 114) CYTCRTANGGYTGNGTRAARA (SEQIDNo 115)
Primer für iPCR	CTAAGCCAATACCAAGTGTA CCA (SEQIDNo 100) GAACAAATCGTGCTACTGATT CATCAC (SEQIDNo 101) GAAGAAGCCCAATCACAAAG AACTC (SEQIDNo 102) GGCAGTCTATTTAGCTAGTGA AG (SEQIDNo 103)	TCCTCGCTGAGGCTCATCAC (SEQIDNo 108) GCTTCTCGATCTCGACGACTTC (SEQIDNo 109) GCGCAGCGAACTGATCGAG (SEQIDNo 110) GATCCAGCGCTACTCACTCGAC (SEQIDNo 111)	GAGGACGAAGTCGTCGGAATG (SEQIDNo 116) GCCGTCACCTTCAGCAAGACC (SEQIDNo 117) CTCGACGTGAGCGACGACAAG (SEQIDNo 118) GCAAGATCACCGGCAACGATG (SEQIDNo 119)

Basierend auf der Sequenz, die für das Vollängen-Gen kodiert (SEQIDNo. 12; 13; 14) werden spezifische Primer für eine nachfolgende Klonierung dieses DNA Abschnittes in ein passendes Expressionssystem konstruiert. Dabei werden 5'-Primer mit einer Erkennungssequenz für Nde I, bzw. mit einer Erkennungssequenz für Sph I, bzw. für BamHI und 3' Primer mit einer Erkennungssequenz für Hind III modifiziert (SEQIDNo. 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127).

Die Amplifizierung der für das Protein kodierenden Vollängen-DNA aus genomischer DNA mit nachfolgender Restriktion und Ligation in den Expressionsvektor erfolgt wie im Beispiel 3 beschrieben. Der Expressionsstamm BL21 Star (Invitrogen), bzw. RB791 (E.coli genetic stock, Yale, USA) wird mit dem entstandenen Expressionskonstrukt transformiert.

5a Klonierung einer enantioselektiven Alkoholdehydrogenase / Reduktase aus Microorganismus *Microbacterium sp.*

Zur Klonierung der Oxidoreduktase aus *Microbacterium sp.* wurde beispielsweise genomische DNA aus den frischen Zellen *Microbacterium sp.* nach der in Molecular cloning von Manniatis & Sambrook beschriebenen Methode extrahiert. Die resultierende Nukleinsäure diente als Matrize für eine PCR mit je 30 pMol an Oligonukleotiden SEQIDNo. 106; 107. Nach einer 10 minütigen Aktivierung des Biotherm Star Polymerase in einem PCR Cycler (BioRad, Hercules, USA) wurden folgende 30 Temperatur-Zyklen für eine Identifizierung des spezifischen DNA Fragmentes programmiert:

94 ° C 50 sec
 62 ° C 1 min
 72 ° C 1 min

- 5 Nach der Auftrennung des gesamten Reaktionsansatzes in einem 1 % Agarose Gel wurde ein spezifisches Fragment mit einer Größe von ungefähr 1000 bp detektiert. Dieses Fragment wurde aus dem Gel eluiert und in das pCR2.1 TA-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Das entstandene Plasmid pCR2.1-Ms1000 wurde einer Sequenzierung unterzogen.
- 10 Sequenzanalyse des 1002 bp langen Genfragmentes zeigte einen offenen Leserrahmen von 334 Aminosäurenresten, in den auch beide Sequenz-Fragmente des N-Terminus und des internen Peptides wieder zu finden waren.

- 15 Basierend auf der Nukleotidsequenz des 1002 bp langen Fragmentes wurden Oligonukleotide (SEQIDNo 108; 109; 110; 111) für eine inverse PCR (iPCR) konstruiert.

- 20 Genomische DNA (2.5 µg) aus den Zellen *Microbacterium* sp. wurde in einem 50 µl Ansatz mit 20 U Restriktionsendonuklease Sac I 25 min behandelt. Nach der Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion des gesamten Ansatzes und Fällung mit 1/10 Vol an 3M Na-Acetat (pH 5.2) und 2.5 Vol an Ethanol wurde die somit verdaute DNA in 25 µl H₂O aufgenommen. Davon 5 µl (200 ng) wurden in einer Religation Reaktion im gesamten Volumen von 40 µl und 2 U T4 Ligase (Fermentas) eingesetzt. Die religierte genomische DNA (2 µl = 20 ng) wurde dann in eine iPCR [67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 115 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20], 0.2 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat Mix (dNTPs), 30 pMol je Primer (SEQIDNo 108; 110)
- 25 mit 2.5 U BioTherm Star Polymerase (Genecraft, Lüdinghausen, Deutschland)] eingesetzt. Amplifiziert wurde mit folgenden Zyklen:

- 30 Zyklus 1 95 ° C, 10 min
 Zyklus 2 x 30 95 ° C, 1 min
 56 ° C, 1 min
 72 ° C, 2 min

- 35 Das Amplifizierungssignal wurde in einer Nest-PCR mit den Oligonukleotiden SEQIDNo 109 und SEQIDNo 111 verstärkt.

- 40 Anschließend wurde die Amplifizierungsreaktion auf 4 ° C abgekühlt und gesamt auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen. Es resultierte ein spezifische Fragment einer Größe von ungefähr 1000 bp. Nach der Elution aus dem Gel wurde das Fragment in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert.

- 45 Die Sequenzanalyse des das Fragment enthaltenden Plasmids lieferte Informationen über die 5' und 3' flankierende Sequenzen. Somit besitzt das DNA Segment, das für das Protein kodiert, eine gesamt Länge von 1044 bp, das mit einem StopKodon endet (SEQIDNo 13), und weist eine offene Leserrahmen von 347 Aminosäuren (SEQIDNo 5) auf.

- 50 Genomische DNA der *Microbacterium* sp. Zellen wurde als Matrize für die Generierung der das Protein kodierenden Vollängen-DNA in einer Polymerase Kettenreaktion mit Hilfe von GC-Rich PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland) und 30 pMol Oligonukleotiden SEQIDNo 123, bzw. SEQIDNo 124 mit 30 pMol Oligonukleotid SEQIDNo 125 und Temperatur-Zyklen:

- 55 Zyklus 1 95 ° C, 3 min
 Zyklus 2 x 30 95 ° C, 30 sec
 59 ° C, 30 sec
 72 ° C, 45 sec

verwendet.

Das resultierende PCR-Produkt wurde nach der Reinigung über 1% Agarose Gel mit Nde I und Hind III, bzw. mit Sph I und Hind III behandelt und in das mit den gleichen Endonukleasen behandelten Rückgrad des Vektors pET21a (Novagen, Madison, USA), bzw. pQE32 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert. Nach der Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes in E.coli Top10F' Zellen wurden Plasmid-DNA's Ampicillin-resistenter Kolonien mittels einer Restriktionsanalyse mit Endonukleasen Nde I, bzw. Sph I und Hind III auf die Richtigkeit der erfolgten Ligation überprüft. Die DNA der für das Insert positiven Vektoren wurde in den Expressionsstamm BL21 Star (Invitrogen), bzw. RB791 (E.coli genetic Stock, Yale, USA) transformiert.

Beispiel 6:

Expression von rekombinanten Alkoholdehydrogenasen / Reduktasen in E.coli

Die mit dem Expressionskonstrukt transformierte Escherichia coli Stämme BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), bzw. RB791 (E.coli genteic stock, Yale, USA) wurden in 200 ml LB-Medium (1% Tryptone, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl) mit Ampicillin (50 µg / ml), bzw. Carbenicillin (50 µg / ml) kultiviert, bis eine Optische Dichte gemessen bei 550 nm von 0.5 erreicht wurde. Die Expression von rekombinatem Protein wurde durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in einer Konzentration von 0.1 mM induziert. Nach 8 Stunden, bzw. nach 16 Stunden Induktion bei 25 ° C und 220 rpm wurden die Zellen geerntet und bei -20 ° C eingefroren. Für den Aktivitätstest wurden 10 mg Zellen mit 500 µl 100 mM TEA Puffer pH 7.0 und 500 µl Glasperlen versetzt und 10 min mittels einer Kugelmühle aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde dann verdünnt für die entsprechenden Messungen eingesetzt. Aktivitätstest setzte sich wie folgt zusammen: 870 µl 100 mM TEA Puffer pH 7.0, 160 µg NAD(P)H, 10 µl verdünntes Zelllysat. Reaktion wurde gestartet bei der Zugabe von 100 µl einer 100 mM Substratlösung zum dem Reaktionsgemisch.

	Expressionsvektor	Expressionsstamm	Substrat	Aktivität U / g
SEQ ID No 1	pET21a	BL21 Star	Acetophenon	4700 U/g
SEQ ID No 2	pET21a	BL21 Star	2-Butanon	1900 U/g
SEQ ID No 3	pQE70	RB791	CLAE	5220 U/g
SEQ ID No 4	pET21a	BL21 Star	CLAE	8300 U/g
SEQ ID No 5	pET21a	BL21 Star	2-Octanon	8000 U/g
SEQ ID No 6	pQE70	RB791	2-Octanon	1600 U/g
SEQ ID No 7	pET21a	BL21 Star		
SEQ ID No 8	pET21a	BL21 Star	CLAE	7000 U/g

Beispiel 7:

Charakterisierung der rekombinanten Oxidoreduktasen

7a: pH-Optimum

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Puffer hergestellt. Die Konzentration der jeweiligen Pufferkomponenten betrug jeweils 50 mM.

Tabelle 4

PH-Wert	Puffersystem	pH-Wert	Puffersystem
4	Na-acetat/Essigsäure	7,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
4,5	Na-acetat/Essigsäure	8	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5	Na-acetat/Essigsäure	8,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9	Glycin/NaOH
6	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9,5	Glycin/NaOH
6,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	10	Glycin/NaOH
7	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	11	Glycin/NaOH

15 Meßansatz (30°C)-pH Optimum Reduktion:

870 µl der jeweils in Tabelle 3 genannten Puffersysteme
 20 µl NAD(P)H 10 mM
 10 µl Enzym verdünnt

20

Es wurde etwa 2 bis 3 min inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von

100 µl Substratlösung (100 mM)

25

Als Substrat wurden je nach Oxidoreduktase 2-Butanon oder 2-Oktanon eingesetzt.

Die Reaktion wurde 1 min bei 340 nm verfolgt. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die enzymatische Reaktion in dem jeweiligen in Tabelle 4 aufgeführten Puffer bestimmt. Zur Bestimmung des pH-Optimums für die Oxidationsreaktion wurde als Cofaktor NAD(P) und als Substrat 2-Propanol oder 2-Oktanol eingesetzt.

30

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen zusammengestellt.

35

Tabelle 5:

DSMZ Nr.	Mikroorganismus	pH-opt red	pH-opt ox
70825	Rhodotorula mucilaginosa	7-8	8,0-9,5
3316	Pichia farinosa	5-6	7-11
70647	Candida nemodendra	6	10-11
3651	Pichia stipidis	5,5-6,5	6,5-7,5
70391	Pichia trehalophila	7-7,5	7-8
5576	Leuconostoc carnosum	5,0-6	6,5-9,5
20028	Microbacterium spec.	6,5-7,5	7,5-8,5
43570	Gordonia rubripertincta	5	7,5-9,5

50

7b: pH-Stabilität

Die Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Oxidoreduktasen wurde durch Lagerung in den in Tabelle 4 genannten Puffersystemen untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Puffer (50 mM) im Bereich von pH 4 bis 11 angesetzt und die gemäß Beispiel 4 hergestellte Oxidoreduktase damit verdünnt. Nach 30, 60 und 120 min Inkubation wurden aus dem Ansatz 10 µl

55

entnommen und im Aktivitätstest gemäß Beispiel 1 eingesetzt.

Ausgangswert ist dabei der Messwert, den man unmittelbar nach Verdünnung (1:20) des Enzyms in Kaliumphosphatpuffer 50 mM pH = 7.0 erhielt. Dieser Wert entsprach unter den vorgegebenen Bedingungen einer Extinktionsänderung von etwa 0,70 /min und wurde als 100%-Wert gesetzt und alle folgenden Messwerte wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

In Tabelle 6 sind für die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen die pH-Bereiche zusammengestellt indem die Enzyme bei 120 min Inkubation nicht weniger als 50% der Ausgangsaktivität aufwiesen.

Tabelle 6:

DSMZ Nr.	Mikroorganismus	pH-Bereich Stabilität
70825	Rhodotorula mucilaginosa	5,5-9,5
3316	Pichia farinosa	5,5-10,0
70647	Candida nemodendra	6,5-9,5
3651	Pichia stipidis	6,0-7,0
70391	Pichia trehalophila	6,0-8,0
5576	Leuconostoc carnosum	4,5-9,5
20028	Microbacterium spec.	5,0-9,5
43570	Gordonia rubripertincta	4,5-10

7c: *Temperaturoptimum*

Zur Bestimmung der optimalen Testtemperatur wurde die Enzymaktivität für die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen im Temperaturbereich von 15°C bis 70°C im Standardmeßansatz gemessen.

Die ermittelten Temperaturoptima sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Tabelle 7

DSMZ Nr.	Mikroorganismus	Topt
70825	Rhodotorula mucilaginosa	50°C
3316	Pichia farinosa	40°C
70647	Candida nemodendra	65 °C
3651	Pichia stipidis	40°C
70391	Pichia trehalophila	n.b.
5576	Leuconostoc carnosum	60°C
20028	Microbacterium spec.	60°C
43570	Gordonia rubripertincta	45-55°C

7d: *Temperaturstabilität*

In analoger Weise wie unter Beispiel 5c beschrieben wurde die Temperaturstabilität für den Bereich von 15°C bis 70°C bestimmt. Dazu wurde jeweils eine Verdünnung der erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen für 60 min und 180 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und anschließend bei 30°C mit dem obigen Testansatz gemessen. In Tabelle 8 sind für die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen die Temperaturbereiche zusammengestellt indem die Enzyme

bei 120 min Inkubation nicht weniger als 50% der Ausgangsaktivität aufwiesen.

Tabelle 8

DSMZ Nr.	Mikroorganismus	Temperaturstabilität
70825	Rhodotorula mucilaginosa	15-35°C
3316	Pichia farinosa	15-25°C
70647	Candida nemodendra	15-35°C
3651	Pichia stipidis	15-35°C
70391	Pichia trehalophila	15-35°C
5576	Leuconostoc camosum	15-35°C
20028	Microbacterium spec.	15-60°C
43570	Gordonia rubripertincta	15-55°C

7e: Substratspektrum

Das Substratspektrum der erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen wurde durch Messung der Enzymaktivität für Reduktion und Oxidation mit einer Reihe von Ketonen und Alkoholen bestimmt. Dazu wurde der Standard Messansatz gemäß Beispiel 1 mit unterschiedlichen Substraten verwendet.

Die Aktivität mit Methylacetoacetat wurde für alle Enzyme gleich 100% gesetzt und alle anderen Substrate wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 9: Substratspektren Reduktion

Substrat	Rhodotorula mucilaginosa SEQ ID NO1	Pichia farinosa SEQ ID NO2	Pichia stipidis SEQID NO3	Leuconostoc camosum SEQID NO4	Microbacterium spec. SEQID NO5	Gordonia rubripertincta SEQID NO6
1-Phenyl-2-propanon	66%	10%	30%	13%	80%	82%
Phenacyl-Chlorid	36%	130%	9%	37%	<2%	7%
Acetophenon	12%	195%	32%	28%	52%	23%
Acetonaphton	n.b.	25%	84%	n.b.	125%	68%
Butyrophenon	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2-Octanon	71%	20%	27%	28%	227%	75%
3-Octanon	29%	10%	40%	18%	47%	52%
2-Butanon	190%	65%	49%	36%	4%	14%
Ethyl-2-oxovaleriat	4%	85%	60%	25%	<2%	23%
Ethyl-2-oxo-4-phenyl buttersäure	4%	35%	16%	10%	<2%	18%
Ethylpyruvat	60%	560%	148%	122%	480%	160%
Ethylphenyl-glyoxylat	8%	35%	3%	4%	<2%	11 %
Ethyl-4-chloro acetoacetat	79%	70%	100%	80%	110%	110%
Methyl acetoacetat	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ethyl-3-oxovaleriat	60%	45%	73%	30%	<2%	56%
Aceton	82%	55%	100%	28%	<2%	7%

7f: Stabilität im wässrig/organischen Zwei-Phasensystem

Die Stabilität der neuartigen Oxidoreduktasen in wässrig/ organischen Zweiphasensystemen wurde untersucht, indem die in Beispiel 6 gewonnenen Lysate (aus rekombinanter Expression) in einem für die jeweilige Oxidoreduktase geeigneten, wässrigem Puffer verdünnt wurden (ca. 10 Units/ml Puffer). Zu der im Puffer verdünnten Oxidoreduktase wurde dann das selbe Volumen eines organischen, nicht wassermischbaren Lösungsmittels gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung (Thermomixer mit 170 rpm) inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden jeweils aus der wässrigen Phase 10 µl entnommen und für die Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtestansatz (Kaliumphosphatpuffer (KPP) 100 mM, pH = 7.0, 0,2 mM NAD(P)H, 10 mM Substrat) eingesetzt. Auch hier wurde der Ausgangswert direkt nach Verdünnung im Puffer gleich 100% gesetzt und alle weiteren Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 9: Enzymaktivität nach 24 h Inkubation im wässrig organischen Zwei-Phasensystem

System	Puffer	Butyl-acetat	Diethyl-ether	MTBE	Diisopro-pyl-ether	Heptan	Cyclo-hexan
Rhodotorula mucilaginosa SEQ ID No 1	100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%
Pichia farinosa SEQ ID No 2	100%	40-60	60-80%	80-100%	40-60%	40-60	40-60%
Candida nemodendra SEQ ID No 8	100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%
Pichia stipidis SEQ ID No 3	100%	40-60%	n.b.	20-50%	60-80%	80-100%	40-60%
Leuconostoc carnosum SEQ ID No 4	100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%
Microbacterium spec. SEQ ID No 5	100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%
Gordonia rubripertincta SEQ ID No 6	100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%	80-100%

MTBE = Methyl-tert-butylether

Tabelle 10: Substratspektren Oxidation

Substrat	Rhodotorula mucilaginosa SEQ ID NO1	Pichia farinosa SEQ ID NO2	Pichia stipidis SEQID NO3	Leuconostoc carnosum SEQID NO4	Microbacterium spec. SEQID NO5	Gordonia rubripertincta SEQID NO6
S-2-Oktanol	100%	0%	100%	0%	100%	100%
R-2-Oktanol	0%	100%	0%	100%	0%	0%
S-2-Butanol	266%	100%	237%	56%	5%	45%
R-2-Butanol	60%	340%	74%	178%	0%	17%
S-Phenyl-2-propanol	200%	0%	26%	0%	10%	0%
R-Phenyl-2-propanol	0%	0%	0%	6%	0%	0%

Substrat	Rhodotorula mucilaginosa SEQ ID NO1	Pichia farinosa SEQ ID NO2	Pichia stipidis SEQID NO3	Leuconostoc carnosum SEQID NO4	Microbacterium spec. SEQID NO5	Gordonia rubripertincta SEQID NO6
5 Ethyl-(S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ethyl-(R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate	0%	0%	0%	0%	10%	0%
10 2-Propanol	180%	180%	218%	67%	< 1%	27%
Cyclohexanol	26%	120%	0%	n.b.	n.b.	7%

15 **Beispiel 8: Präparative Umsetzungen**

8a: Synthese von Methyl-(3S)-3-hydroxypentanoate mit Oxidoreduktase aus Rhodotorula mucilaginosa

20 Für den präparativen Ansatz wurde ein Gemisch aus 25 ml Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 1 mM ZnCl₂, 10% Glycerin), 375 ml 4-Methyl-2-pentanol, 100 ml Methyl 3-oxopentanoate, 100 mg NAD und 37 kU rekombinante Oxidoreduktase aus Rhodotorula mucilaginosa DSMZ 70825 für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren 97% des
25 eingesetzten Methyl 3-oxopentanoate zu Methyl-(3S)-3-hydroxypentanoate reduziert. Die das Produkt enthaltende 4-Methyl-2-pentanolphase wurde anschließend von der wässrigen Phase abgetrennt, filtriert und das Produkt Methyl-(3S)-3-hydroxypentanoate durch Destillation gewonnen.

30 Auf diese Weise wurde das Produkt Methyl-(3S)-3-hydroxypentanoate in einer Reinheit von > 99% und mit einem Enantiomerenüberschuss von >99,5% in hoher Ausbeute gewonnen.

8b: Synthese von (2R)-1-chloropropan-2-ol mit Oxidoreduktase aus Pichia farinosa

35 Für die Umsetzung wurde ein Gemisch aus 80 ml Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin), 15 ml 2-Propanol, 5 ml Chloraceton, 10 mg NAD und 2 kU rekombinante Oxidoreduktase aus Pichia farinosa DSMZ 3316 für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren das eingesetzte Chloraceton vollständig zu
40 (2R)-1-chloropropan-2-ol reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde gewonnen. Das auf diese Weise hergestellte (2R)-1-chloropropan-2-ol weist einen mit einem Enantiomerenüberschuss von >99% auf.

8c: Synthese von (R)-2-Chlor-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-ol mit Oxidoreduktase aus Pichia stipidis

45 Für die Umsetzung wurde ein Gemisch aus 20 ml Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH = 8,5, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin), 20 g 2-Chlor-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-on gelöst in 80 ml 4-Methyl-2-pentanol, 10 mg NAD und 20 000 U rekombinante Oxidoreduktase aus Pichia stipidis DSMZ 3651 für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren
50 mehr als 99% des eingesetzten 2-Chlor-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-on's reduziert. Die das Produkt enthaltende 4-Methyl-2-pentanolphase wurde anschließend von der wässrigen Phase abgetrennt, filtriert und das Produkt (R)-2-Chlor-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-ol durch Destillation gewonnen.

55 Auf diese Weise wurde das Produkt (R)-2-Chlor-1-(3-chlorphenyl)ethan-1-ol in einer Reinheit

von > 98% und mit einem Enantiomerenüberschuss von >99,9% in hoher Ausbeute gewonnen.

8d: Synthese von Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybuttersäure mit Oxidoreduktase aus *Leuconostoc carnosum*

5

Für die Umsetzung wurde ein Gemisch aus 8 mL Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 1 mM MgCl₂), 24 ml Isopropanol, 8 ml Ethyl-4-Chloracetoacetat, 2 mg NADP und 6,7 kU (= 6 ml) rekombinante Oxidoreduktase aus *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576 für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren mehr als 99% des eingesetzten Ethyl-4-chloracetoacetat zu Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybuttersäure reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde aufgearbeitet indem zuerst das 2-Propanol mittels Rotationsverdampfer entfernt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt gewonnen. Das auf diese Weise gewonnene Rohprodukt Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybuttersäure wies einen Enantiomerenüberschuss von > 99,5% auf.

15

8e: Synthese von (1S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethan-1-ol mit Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec.*

20

Für die Umsetzung wurde ein Gemisch aus 1 mL Puffer (100 mM TEA, pH = 7, 10% Glycerin, 1 mM ZnCl₂), 3 ml 4-Methyl-2-pentanol, 1 ml 1-[3,5 bis-(trifluoro-methyl)phenyl]ethan-1-on, 2 mg NAD und 0,7 kU rekombinante Oxidoreduktase aus *Microbacterium spec.* DSMZ 20028 für 24 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 24 h waren mehr als 90% des eingesetzten 1-[3,5 bis-(trifluoro-methyl)phenyl]ethan-1-on zu (1S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethan-1-ol reduziert. Die das Produkt enthaltende 4-Methyl-2-pentanolphase wurde anschließend von der wässrigen Phase abgetrennt, filtriert und das Produkt (1S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethan-1-ol durch Destillation gewonnen. Das auf diese Weise gewonnene Rohprodukt (1S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethan-1-on wies einen Enantiomerenüberschuss von > 99,5% auf.

25

Sequenzprotokoll

Aminosäuresequenzen

30

SEQ ID No 1:

Rhodotorula mucilaginosa DSMZ 70825 Proteinsequenz Carbonylreduktase

40

1	mpatrlrdkk	vaiitggasg	iglesalvfa	gegahvvvad	inveaanrav	eiiktqvqda
61	pkaiavkcdv	skeddiknlv	atavetfgrl	dvmfnnagim	hpeddnalnt	seriwdltmn
121	invkgvwwgc	kyaidamrkn	pggskgsiin	tasfvailga	atpqaiyas	kgavlamtre
181	lamvharegi	rinslcpvgl	ktellmkfld	tpekkerrmv	hipmgrfgea	veqaraaafl
241	asddssfitg	tdfkvdggis	scyvtpeseg	alaapsnlap	ka	

45

SEQ ID No 2:

Pichia farinosa DSMZ 3316 Proteinsequenz Carbonylreduktase

50

1	maynftnkva	iitggisgig	latvekfaki	gakvwigdiq	keeykeaaft	nlknkginld
61	qltyvhtdvt	ansanenllk	taissfggvd	fvvangiak	dqrseemtye	dfkkiidvnl
121	ngvflskkla	idywlknkkk	gsivntgsil	sfgtgpplsh	ycaskggvkl	ltqtlaieqa
181	kngirvncin	pgyirtplle	flpkdkydal	vdlhpmgrlg	epeeianaia	flvsdeasfi
241	tgtilvdgg	ytaq				

55

SEQ ID No 3:

Pichia stipidis DSMZ 3651 Proteinsequenz Carbonylreduktase

	1	misipatqygf	vftkkdglki	renmpvlepk	adqvlkvda	vglchsdhha	iydgdfgdn
	61	yvmgheiagt	ivkkgamvdf	wlIntrvacf	gpnschgcl	crtgfendci	nvvnwvfglg
5	121	knggyqqyll	vekprnlvai	pdnvelsdaa	aitdalltpy	hamrlagvrs	gkllqigag
	181	glgvngiqia	kafgaqvtvi	dkkpeavdva	kslgadevys	alpestspgs	fdvaidyvst
	241	qgtfdtcqky	vrrsknivpv	glaaprisfn	lgdlalrein	vlgswgtss	dlkecdfivs
	301	kgvkvkpvvtv	aplklpeyi	vklnsayeg	rvvfkp		

10 SEQ ID No 4:

Leuconostoc carnosum DSMZ 5576 Proteinsequenz Carbonylreduktase

	1	mtdrlnkva	iitggtlgig	lamaqkfee	gakvvtgrr	anvgaealkt	igdesvarfv
	61	qhdsadekgw	idlfentikw	fghvdtvnn	agvaiaknie	ettyedwkfl	qsinsdgvfl
15	121	gkygmqymk	nqaggasiin	mssiegvvd	pnlaaynhs	ggvrilksa	alhaalndyn
	181	lrvtihpgy	iktplvdgid	gaaeaqsrt	qtpmghigep	ndiaymavyl	aseeskfatg
	241	aefvvdggyl	aq				

20 SEQ ID No 5:

Microbacterium spec. DSMZ 20028 Proteinsequenz Carbonylreduktase

	1	mkalqytkig	shpeveiek	pspgpgqvl	kvtaagvchs	defvmslsee	qytaagyplp
	61	ltlgegagi	veelgeveh	lsvgdavavy	gpwgcgrcn	caqgkenyct	naqaegimpp
25	121	glgapsmae	ymivdsarhl	vplgdldpvq	nvsltdaglt	pyhavktslp	klgagttavv
	181	igtgglghva	iqilravsa	tvialdvnde	klalakevga	hhtvmsdgg	vdairritdg
	241	lganavdfv	gadptiatai	gaaaldadit	ivgigggtah	vfgtvayda	alripywgsr
	301	selievldla	rsgqvgeiq	rysliddgpa	yealaagtvr	gravivp	

30 SEQ ID No 6:

Gordonia rubripertincta DSMZ 43570 Proteinsequenz Carbonylreduktase

	1	mkaiqiipg	kppelrevk	ptprpgqvl	kvtaagachs	ddfvlnlpee	gfpylplmtl
35	61	ghagagvae	vgtvgtgise	gtsvavygaw	gcvchfcar	glenycsrag	elgitppglg
	121	npgamaeyll	vddarhlvpl	gdldpvaavp	ltdagltpyh	aikpslpklv	ggttavviga
	181	gglgvhvqi	lrhltpsri	aldvsddkla	farevgahev	vlsdadavan	vrkitgndga
	241	tavfdvlgq	ptldiamgv	gtmgdvvivg	igdinvatak	gfftqpyevs	vrapywgard
	301	elievldlar	dgvlevaver	fslddgveay	rriaandlrg	ravvvpd	

40 SEQ ID No 7:

Pichia trehalophila DSMZ 70391 Proteinsequenz Carbonylreduktase

45	1	mctsqsgyvy	hsgrplltke	elsipepkgs	eivlkvraag	lcssdvhlv	sslptypns
	61	famgheiage	iyklgpnvda	dkysigdgya	vghlncgdc	sfckvgsqnl	ctdnnstwyg
	121	lgknggyeq	vlvksvhli	kipegvfse	aavasdavlt	pyhaistcnl	katskvlvig
	181	cgglgtcalq	iiklysavv	cvdskaelee	lakeygadef	ytdlkskssvp	kmsfcdvdf
	241	vaiqptftis	qnyvksggii	kpvglgapsl	tfslldlgr	dvkiigsfwg	tqaeqkdcme
50	301	liqrglvkpl	itsftfdefp	qayellstgk	skgrlvisq		

55 SEQ ID No 8:

Candida nemodendra DSMZ 70647 Proteinsequenz Carbonylreduktase

55

	1	mgynlinkva	vvtggcsgig	lavtkkylel	gakvvigdvs	tkekfnevss	elkvaglInvn
	61	nlnfvsadss	keddnkrld	eaiknfgld	ivcanagigs	mipfhemtfe	awrkillavnl
	121	dgvflldrfa	idywlknskp	gvivnmgsih	sfvaapglah	ysaskggvkl	ltealaleys
	181	skgirvnsvn	payiqtslle	flpedkmnal	kavhpigrig	kpeevanava	fissdeatfi
5	241	hgtsllvdgg	ytaq				

Nukleinsäuresequenzen

SEQ ID No 9:

10

Rhodotorula mucilaginosa Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atgcctgcca	ctctccgct	cgacaagaag	gttgccatca	tcaccggagg	agcatccggg
	61	atcggcctcg	agtcggccct	cgtcttgcc	ggagaaggcg	cccacgtcgt	cgtcgccgac
15	121	atcaacgtcg	aagctgcaa	ccgcgccgtc	gagatcatca	agaccagggt	tcaggacgcc
	181	cccaaggcga	tcgccgtcaa	gtgcgacgtc	tccaaggagg	acgacatcaa	gaacctcgtc
	241	gcgactgctg	tcgaaacttt	tggcaggctc	gatgtcatgt	tcaacaacgc	cggcatcatg
	301	caccccgagg	acgacaatgc	gctcaacacc	tcggagcgca	tctgggacct	gaccatgaac
	361	attaacgtca	agggagtctg	gtggggctgc	aagtacgca	tcgacgccat	gcgcaagaac
20	421	ccgggcggca	gcaaggggag	catcatcaac	acggctcgt	tcgtcgccat	cctcggagcg
	481	gcgacgcctc	agatcgata	caccgctcg	aagggtgccg	tctggccat	gactcgcgag
	541	ctcgccatgg	ttcacgcgcg	cgaagggatc	cgaatcaact	cgctctgccc	cggctccgctc
	601	aagacagagc	tcctgatgaa	gttcctcgac	acgccggaga	agaaggagcg	ccggatggtg
	661	cacatcccga	tgggtcgctt	cggtgaggcg	gttgagcagg	ctcgcgcggc	cgcgttcctc
25	721	gctagcgacg	acagcagctt	catcaccgga	actgactca	aggtcgacgg	cggtatcagc
	781	tcgtgctacg	tcacgccgga	ggcgagcag	gccctcgcg	cgccgtcaa	ctggctccc
	841	aaggcgtag					

SEQ ID No 10:

30

Pichia farinosa DSMZ 3316 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atggcctata	acttactaa	caaagtcgct	atcattacag	gaggaattc	cggattggt
	61	ttagctacag	tcgagaaatt	cgtaagttg	ggtgctaaag	tcgcatagg	agacattcaa
35	121	aaagaagaat	ataaagaagc	tgctttaca	aattgaaga	acaagaagaat	taattctgat
	181	caattgacgt	atgtccacac	ggacgtcacc	gcaaattcgg	caaatgagaa	cctttaaag
	241	actgctataa	gctccttgg	tggcgtgac	ttgtcgtag	caaactctgg	aatagcaaaa
	301	gatcaacgtt	ctgaagagat	gactatgaa	gattcaaga	aaataatcga	tgtaactta
	361	aacggtgttt	ttccttga	taagctagca	attgattatt	ggttaaaaaa	taagaaaaag
40	421	ggctctattg	tcaacacggg	atctattctt	tcatttgtg	gtacccccgg	gtatcacat
	481	tattgtcgt	caaaggttg	agtgaagtta	ttgacacaaa	cctggctct	cgaacaggct
	541	aagaatggca	taagagtga	ttgtataaat	cctggtata	taagaacacc	ttattagag
	601	ttttgccta	aggacaagta	tgacgctta	gtggatctc	atccaatggg	tagattaggt
	661	gaacctgagg	aaattgcaa	tgccattgca	ttcctcgtct	ctgacgaagc	gagctcata
45	721	actggtacta	ctctactcgt	tgatggagga	tatacagccc	agtaa	

SEQ ID No 11:

50

Pichia stipidis DSMZ 3651 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atgtctattc	ctgctacaca	atatggtttc	gtctcacca	aaaaggacgg	ttaaaaatt
	61	cgcgagaaca	tgctgttct	cgaacccaag	gctgaccaag	tcttgcttaa	agtcgacgca
	121	gtaggattgt	gtcactctga	cctcatgcc	atctacgacg	gcttcgactt	tggtgacaat
	181	tacgttatgg	gccacgaaat	cgccggcacc	attgcaaga	aggagccat	ggtcgacttt
55	241	tgggacctaa	acaccogt	tgctgtttt	ggtccaaact	cctgtggcca	tgtcaact

301	tgctgactg	gtttgaaaa	tgattgtatc	aatgtcgtca	acggctggft	tggattaggt	
361	aaaaacggag	gctaccagca	atattgttg	gtgaaaagc	ctcgtaatf	ggttgctatt	
421	ccagacaacg	tcgagctgtc	cgatgcagct	gccattaccg	acgcttggf	gacccctac	
481	catgccatga	gattagctgg	tgtagatca	ggcacgaagc	tctgcaaat	tgggtctgga	
5	541	ggattgggag	taaattggtat	tcagattgct	aaagcattg	gagctcaagt	cactgttatc
601	gacaaaaagc	ccgaggctgt	agacgtcgt	aagagcctag	gcgcagatga	agtatattct	
661	gcacttctg	aatcaaccag	tccgggaagt	ttcgtgttg	ctatcgacta	cgtttctact	
721	caaggcactt	tcgacacttg	tcaaaagtac	gtcagatcta	agggtaatat	tgtcccgtt	
781	ggattggccg	ctccaagaat	ttcgtttaac	ttgggagatt	tggcccttag	agaaattaat	
10	841	gtccttggtg	gcttctgggg	tacatcatcc	gactgaagg	aatgttctga	ttggctcagc
901	aagggcaag	tcaaacctaa	ggtgactgtt	gctccattga	agcaattgcc	tgaatacatt	
961	gtcaagttac	agaattcggc	ctacgaaggt	agagtcgtgt	tcaagccatg	a	

SEQ ID No 12:

15

Leuconostoc carnosum DSMZ 5576 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

1	atgacagatc	ggftaaagaa	taaagtgtct	attatcactg	gtggtacact	tggattggc	
61	ttagcaatgg	ctcaaaagtt	tgtagaagaa	ggcgctaaag	ttgtcattac	tgggctcgt	
20	121	gctaattgtg	gtgcagaagc	gctaaagaca	attggtgatg	aatcagtagc	acgattgtt
181	caacatgatg	catctgatga	aaaaggctgg	attgatttat	ttgaaaatac	gattaaatgg	
241	ttgggtcatg	tcgatacggf	tgtaataat	gccgggtgtg	caattgctaa	aaacattgaa	
301	gagacaacat	atgaagactg	gaaattttg	caatcaatca	actctgatgg	cgtttctta	
361	ggaactaagt	acggtatgca	atatatgaaa	aaccaagctg	gtggtgcctc	aattattaat	
25	421	atgtcatcta	ftgaaggatt	tgftggtgat	cctaacttag	ctgctataa	tattcaaaa
481	ggfgtgtcc	gcattftgag	taagtcagct	gcactacatg	cagcattgaa	tgactataac	
541	ttacgtgtca	acacgattca	cccaggatat	atcaaaacac	cattggttga	tggattgat	
601	ggtgcagaag	aagcccaatc	acaaagaact	caaacaccta	tgggacatat	tggfgaacct	
661	aatgatattg	catatatggc	agtctattta	gctagtgaag	aatcaaaagtt	tgcaacaggt	
30	721	gctgaattcg	ttgftgatgg	cggctatttg	gcacaataa		

SEQ ID No 13:

Microbacterium spec. DSMZ 20028 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

35

1	atgaaggcac	tccagtacac	gaagatcgga	tcccaccccg	aagtcgtcga	gatcgagaag	
61	ccctcgccgg	gtcccgggca	ggtactgtct	aaagtcaccg	ccgccggcgt	ctgccactcg	
121	gacgagttcg	tgatgagcct	cagcggaggag	cagtacaccg	ctgccggcta	ccccctgccg	
181	ctcaccctcg	ggcacgaagg	cgccggcatc	gtcggaggagc	tcggcgaagg	tgtcgagcac	
40	241	ctgagcgtcg	gagacgccgt	cgccgtctac	ggcccctggg	gftgctggccg	ctgccgcaac
301	tgcgcgcagg	gcaaggagaa	ctactgcacg	aacgccccagg	cggaggggat	catgctccc	
361	ggtctcgggg	ctcccggctc	aatggcggag	tacatgatcg	tcgacagcgc	gcgacacctc	
421	gftccgctcg	gcgacctcga	ccccgtgcag	aacgtttcct	tgacggatgc	cggcctgacc	
481	ccgtaccacg	cggftcaagac	gtcacttccg	aagctgggcg	ccggaacgac	ggcggctcgtg	
45	541	atcggcaccg	ggggftctcg	acacgtcgcg	attcagatcc	tgcgggctgg	gtcggccgcg
601	accgtgatcg	cgftggacgt	caacgacgag	aaactcgcgc	tggccaagga	ggtcggcgcc	
661	catcacaccg	tcatgagcga	cggcggcgcc	gtcgcgcga	ftgccggct	caccgacggt	
721	ctgggcgcga	acgcccftt	cgactftctc	ggtgcggacc	cgacgatcgc	gacggcgata	
781	ggagcagccg	cgctcgacgc	agacatcacg	atcgtcggca	tcggcggcgg	aacggctcac	
50	841	gtcggfttctg	gcaccgtcgc	ftatgacgcg	gcgcttgcga	tcccgtatftg	gggctcgcgc
901	agcgaactga	tcgaggtgct	cgacctcgcg	cgctcagggc	aggtgggagf	cgagatccag	
961	cgctactcac	tcgacgacgg	cccgaaggcg	tacgaggcgc	tcgccgcggg	cacggftccgc	
1021	ggccgcgcgg	tcatcgtccc	ctga				

55

SEQ ID No 14:

Gordonia rubripertincta DSMZ 43570 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atgaaggcca	ttcagatcat	ccagccgggc	aaaccgccgg	agctgcgcga	ggtcgagaaa
	61	cccacgccgc	gtcccgggca	ggtgttgctg	aaggtgacgg	cagccggcgc	ctgccattcg
5	121	gacgacttcg	tcctcaacct	gcccagggaa	ggattcccct	atcccttgcc	gatgacgctc
	181	ggccacgaag	gggcccggcgt	ggtcgccgag	gtcgggtaccg	gcgtcaccgg	catctcogag
	241	ggcacctcgg	tggccgtgta	cggagcctgg	ggttcggcgg	tctgtcactt	ctgcgcccgc
	301	ggcctggaga	actactgcag	cggagccggc	gaactcggca	tcaccccacc	gggtctcggc
	361	aacccgggcg	cgatggccga	gtacctgctc	gtggacgacg	cacggcatct	ggtgccgctc
10	421	ggtgacctcg	acccggtggc	tgcagtcca	ctcaccgatg	ccggcctcac	gacctaccac
	481	gcgatcaaac	cctcgcttcc	gaagctggtc	ggcggcacca	cggcagtggt	catcggagcc
	541	ggtggtctcg	ggcatgtcgg	gatccaactg	cttcgccacc	tgaccccgtc	ccgggtgatc
	601	gctctcgacg	tgagcgacga	caagctcggc	ttcgcgcgcg	aggctcggggc	tcacgaggtg
	661	gtctctccg	acgccgatgc	cgctcgcaac	gtccgcaaga	tcaccggcaa	cgatggtcgc
15	721	accgccgtct	tcgactcgt	cgggctgcaa	cctacgctcg	acatcgcgat	gggcgtcgtc
	781	gggacctggt	gtgacgtggt	gatcgtgggc	atcggtgaca	tggcgcacc	ggcgaaggtc
	841	ggcttctca	cccagcccta	cgagggtcgc	gtacgcgcgc	cgtactgggg	ggcgcgcgac
	901	gaactcatcg	agggtctgga	tctcgcacgc	gatggggttc	tcgagggtggc	ggtcgaacga
	961	ttctactcgc	atgacggcgt	cgaggcctac	cgccgactgg	ccgccaatga	ccttcgaggg
20	1021	cgagcagtcg	tggtgccgta	ctga			

SEQ ID No 15:

Pichia trehalophila DSMZ 70391 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

25	1	atgtgtactt	ctcaatctgg	ctacgtttat	cattctggta	gaccactttt	aactaaagaa
	61	gaacttcaa	ttcccgaacc	aaaaggctct	gaaattgttc	taaaagttcg	tgacgtggt
	121	ttatgttcat	cagatgttca	tgttctaaac	agcagtttac	cattgactta	cccaaacagt
	181	tttgctatgg	gtcatgaaat	tgccggtgaa	attataagc	ttggtccaaa	cgttgacgct
30	241	gataaatatt	caattggaga	tgatgatgca	gttcatgggt	tgaactcctg	tggtgattgt
	301	tccttctgta	agggtgtag	tcaaaacctg	tgtaccgata	acaattcaac	tggtagcgg
	361	ttaggtaaga	atggtgggta	tgaacagtac	gttttagtta	aaagtgttca	tgacttaatt
	421	aaaattccag	aagggttag	tttctcagag	gccgcagttg	cttcagatgc	tgtttaact
	481	ccatatcatg	ctatcagcac	ctgtaacttg	aaggcaactt	ccaaagttt	agttattggt
35	541	tgtggtgggt	taggtacctg	tgctttacaa	atcatcaa	tgtacagtcg	atatgtgtc
	601	tgtgtgact	ccaaagcaga	attagaagaa	cttgctaaag	aatatggcgc	tgatgaattc
	661	tacaccgatt	tatcaaaatc	cagcgttccc	aaaatgtcat	ttgatttgt	tttgatttt
	721	gttgccattc	agccaactt	caccatttct	caaaattacg	tcaagagcgg	tggtatcatc
	781	aaacctgttg	gcttaggtgc	tcctagctta	acatttagtt	tattggactt	agggtgtaga
40	841	gacgtaaga	tcattggctc	tttctggggt	acacaagctg	aacaaaaaga	ctgatggaa
	901	ctaattcaaa	gagggttagt	caagccatta	attacaagtt	tcacttttga	tgaatttct
	961	caagcttatg	aattgtgtc	gactgggaaa	tccaagggta	gattggttat	cagtcaatag

SEQ ID No 16:

45

Candida nemodendra DSMZ 70647 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atgggttaca	acttaataca	caaagttgca	gtcgtcacag	gaggctgctc	cggaaattggt
	61	ctcgcagtga	ccaaaaaata	tcttgaactg	ggagcaaaaag	tggtcatagg	agatgtatcc
50	121	actaaagaga	agttaacga	gglatcctcg	gaactcaaag	ttgcaggcct	aaatgtaaac
	181	aattaaact	ttgttcagc	agacagtagc	aaagaagacg	acaacaaacg	tttagttgac
	241	gaagcaatca	agaactttgg	tggctctgat	attgtgtgtg	ctaatacccg	tatcggtagc
	301	atgattccat	tccatgaaat	gacattgaa	gcatggagaa	agttactcgc	agtaaacctt
	361	gatggtgtgt	tcttgctaga	cagattcgca	attgattact	ggtaaagaa	tagcaaacct
55	421	ggtgttatcg	tcaacatggg	ttcaatccac	tctttcgtcg	ctgctccagg	attagacat

481 tactctgctt ccaagggagg tgcaaacta ttgaccgaag ctcttgctct agagtactcg
 541 tccaagggta ttagagtaaa ttctgtgaat cctgcatata ttcaaacctc attgctagaa
 601 ttcttccag aagacaaaat gaatgccttg aaggcggtgc accctattgg ccgfttaggt
 661 aaaccagaag aagtagccaa tgctgtcgca ttctcagtt ccgatgaagc aacctcata
 5 721 catggtactt ctcttctagt tgatggaggt tacaccgctc aataa

Proteinfragmente

Rhodotorula mucilaginosa DSMZ 70825 Proteinsequenz Carbonylreduktase

10
 SEQ ID No 17: MPATLRLDK (N-Terminus)
 SEQ ID No 18: QALAAPSNLAPKA (C-Terminus)
 SEQ ID No 19: VEIIKTQVQD
 SEQ ID No 20: KVAIITGGASGIGL (spez. Fragment)
 15 SEQ ID No 21: SCYVTPEG (spez. Fragment)
 SEQ ID No 22: TDFKVDGG (spez. Fragment)
 SEQ ID No 23: VMFNNAGIMH (spez. Fragment)
 SEQ ID No 24: VHAREGIRIN (spez. Fragment)

Pichia farinosa DSMZ 3316 Proteinsequenz Carbonylreduktase

20
 SEQ ID No 25: MAYNFTNKVA (N-Terminus)
 SEQ ID No 26: TLLVDGGYTAQ (C-Terminus)
 SEQ ID No 27: EYKEAFTN (spez. Fragment)
 25 SEQ ID No 28: NKVAIITGGISGIGLA (spez. Fragment)
 SEQ ID No 29: DVNLNGVFS (spez. Fragment)
 SEQ ID No 30: HYCASKGGV (spez. Fragment)
 SEQ ID No 31: NCINPGYI (spez. Fragment)
 SEQ ID No 32: LHPMGRLE (spez. Fragment)

Pichia stipidis DSMZ 3651 Proteinsequenz Carbonylreduktase

30
 SEQ ID No 33: MSIPATQYGFV (N-Terminus)
 SEQ ID No 34: SAYEGRVVKFP (C-Terminus)
 35 SEQ ID No 35: CHSDLHAIY (spez. Fragment)
 SEQ ID No 36: GYQQYLLVE (spez. Fragment)
 SEQ ID No 37: TFDTCQKYV (spez. Fragment)
 SEQ ID No 38: LLTPYHAM (spez. Fragment)
 SEQ ID No 39: LVSKGKVKP (spez. Fragment)
 40 SEQ ID No 40: GAGGLGVNG (spez. Fragment)
 SEQ ID No 41: IQIAKAFGAT (spez. Fragment)
 SEQ ID No 42: LGSFWGTS (spez. Fragment)

Leuconostoc carnosum DSMZ 5576 Proteinsequenz Carbonylreduktase

45
 SEQ ID No 43: MTDRLKNKVA (N-Terminus)
 SEQ ID No 44: AEFVVDGGYLAQ (C-Terminus)
 SEQ ID No 45: VVITGRRAN (spez. Fragment)
 SEQ ID No 46: GGASIINMS (spez. Fragment)
 50 SEQ ID No 47: TQTPMGHI (spez. Fragment)
 SEQ ID No 48: GYIKTPLVDG (spez. Fragment)

Microbacterium spec. DSMZ 20028 Proteinsequenz Carbonylreduktase

55 SEQ ID No 49: MKALQYTKIGS (N-Terminus)

SEQ ID No 50: LAAGTVRGRAVIVP (C-Terminus)
 SEQ ID No 51: CHSDEFVMSLSE (spez. Fragment)
 SEQ ID No 52: VYGPWGCGRG (spez. Fragment)
 SEQ ID No 53: VSLTDAGLTPYHA (spez. Fragment)
 5 SEQ ID No 54: LRAVSAATVIAL (spez. Fragment)
 SEQ ID No 55: DFIGADPTI (spez. Fragment)

Gordonia rubripertincta DSMZ 43570 Proteinsequenz Carbonylreduktase

10 SEQ ID No 56: MKAIQIIQ (N-Terminus)
 SEQ ID No 57: DLRGRAVVVP (C-Terminus)
 SEQ ID No 58: TAAGACHSD (spez. Fragment)
 SEQ ID No 59: TPYHAIKPSLP (spez. Fragment)
 SEQ ID No 60: DFIGLQPT (spez. Fragment)
 15 SEQ ID No 61: VYGAWGCG (spez. Fragment)
 SEQ ID No 62: DDARHLVP (spez. Fragment)
 SEQ ID No 63: MTLGHEGA (spez. Fragment)
 SEQ ID No 64: GGLGHVGIQLLRHL (spez. Fragment)
 SEQ ID No 65: CAGGAAACAGCTATGACC
 20 SEQ ID No 66: VATAVETFGR
 SEQ ID No 67: FGEAVEQAR
 SEQ ID No 68: CCRAAYTCVACVGCVTSGC
 SEQ ID No 69: GCCTGYTCGACVGCYTCRCC
 SEQ ID No 70: CTCCGAGGTGTTGAGCGCATTG
 25 SEQ ID No 71: GACGAGGTTCTTGATGTCGTCCTCC
 SEQ ID No 72: LLTQTLALEQAK
 SEQ ID No 73: YNFTNKVAIITGGI
 SEQ ID No 74: YTG YTCYAANGCYAADGTYTG
 SEQ ID No 75: CHAAYAARGTNGCHATHATYACHGG
 30 SEQ ID No 76: CAACGTTCTGAAGAGATGACTTATG
 SEQ ID No 77: GGTGGAGTGAAGTTATTGAC
 SEQ ID No 78: GCCATTCTTAGCCTGTTGAGAG
 SEQ ID No 79: GTCATCTTTCAGAACGTTGATCTT
 SEQ ID No 80: ADQVLLK
 35 SEQ ID No 81: ISFNLGDLALR
 SEQ ID No 82: GCYGAYCARGTNTTRTTRAAR
 SEQ ID No 83: CTYAARGCYAARTCDCCYAAR
 SEQ ID No 84: CTACCATGCCATGAGATTAG
 SEQ ID No 85: GCTGTAGACGTCGCTAAGAG
 40 SEQ ID No 86: GATTCTCAAGGCTAAGTCAC
 SEQ ID No 87: GATCTAACACCAGCTAATCT
 SEQ ID No 88: CCAAAGGAGCTTATAGCAGTCT
 SEQ ID No 89: GGGAAATTCCATATGCCTGCCACTCTCCG
 SEQ ID No 90: CGGCAAGCTTATTACGCCTTGGGAGCCAAGTTG
 45 SEQ ID No 91: GGAAATTCCATATGGCCTATAACTTCACTAAC
 SEQ ID No 92: CACTGCATGCTGATGGCCTATAACTTCACTAAC
 SEQ ID No 93: CGCAAGCTTATTACTGGGCTGTATATCCTC
 SEQ ID No 94: GGAAATTCCATATGATGTCTATTCTGCTACAC
 SEQ ID No 95: CACTGCATGCGAATGTCTATTCTGCTACAC
 50 SEQ ID No 96: CCCAAGCTTATCATGGTTTGAACACGACTCTAC
 SEQ ID No 97: IEETTYEDWK
 SEQ ID No 98: GACAGAWMGWTTNAARGGWAARGTHGC
 SEQ ID No 99: GCBGTRTAWCCNCCRTCDACDACRAAYTC
 SEQ ID No 100: CTAAGCCAATACCAAGTGTACCA
 55 SEQ ID No 101: GAACAAATCGTGCTACTGATTCATCAC

SEQ ID No 102: GAAGAAGCCCAATCACAAAGAACTC
 SEQ ID No 103: GGCAGTCTATTTAGCTAGTGAAG
 SEQ ID No 104: MKALQYTKIGSHPE
 SEQ ID No 105: AYEALAAGTVV
 5 SEQ ID No 106: CTSCARTACACVAAGATCGG
 SEQ ID No 107: GCBGCSAGBGCYTCRTABGC
 SEQ ID No 108: TCCTCGCTGAGGCTCATCAC
 SEQ ID No 109: GCTTCTCGATCTCGACGACTTC
 SEQ ID No 110: GCGCAGCGAACTGATCGAG
 10 SEQ ID No 111: GATCCAGCGCTACTCACTCGAC
 SEQ ID No 112: MKAIQIIQPG
 SEQ ID No 113: VGFFTQPYEVSVR
 SEQ ID No 114: ATGAARGCNATYCARATYATYCARCC
 SEQ ID No 115: CYTCRTANGGYTGNGTRAARAA
 15 SEQ ID No 116: GAGGACGAAGTCGTCCGAATG
 SEQ ID No 117: GCCGTACCTTCAGCAACACC
 SEQ ID No 118: CTCGACGTGAGCGACGACAAG
 SEQ ID No 119: GCAAGATCACCGGCAACGATG
 SEQ ID No 120: CATATGGCTAGCATGACAGATCGGTAAAGAATAAAG
 20 SEQ ID No 121: GCGCGGATCCATGACAGATCGGTAAAGAATAAAG
 SEQ ID No 122: CCCAAGCTTCTTATTGTGCCAAATAGCCG
 SEQ ID No 123: GGAAATTCCATATGAAGGCACTCCAGTACAC
 SEQ ID No 124: CACTGCATGCTGATGAAGGCACTCCAGTACAC
 SEQ ID No 125: CCCAAGCTTAACGTCAGGGGACGATGAC
 25 SEQ ID No 126: CACTGCATGCGAATGAAGGCCATTTCAGATCATC
 SEQ ID No 127: CCCAAGCTTATTAGTCAGGCACCACGACTGCTC
 SEQ ID No 128: TGTA AACGACGGCCAGT

SEQ ID No 129:

30

Lodderomyces elongisporus DSMZ 70320 Proteinsequenz Carbonylreduktase

	1	msipttqygf	vynkssgltl	nksipvasag	vgqllmkvds	vglchsdlhv	iyegldcgdn
	61	yvmgheiagt	vvdvgpevdr	wnvgdrrvaav	gpngcggcra	crdgienvck	hsfgnwyglg
35	121	sdggyqqyll	vqkprnlvki	pdnvpsdvaav	astdavltpy	haikmagvpg	tskvlivgag
	181	glgcnvqvva	kafgahvtil	dkkeraraea	vkfgadvaye	slplstepgs	fdacldfsvsv
	241	qatfgicqkf	capkgciipa	glgapkltd	ladldreir	ilgtfwgtat	dleevfdlv
	301	kglvkpmvra	akleelpdyi	eklrkneyeg	rivfnp		

40 SEQ ID No 130:

Lodderomyces elongisporus DSMZ 70320 Nukleinsäuresequenz Carbonylreduktase

	1	atgtcaattc	caactaccca	atatggtttt	gtttacaata	agtcgtctgg	cttaacattg
45	61	aacaagagta	tacctgttgc	ctcggcaggt	gtgggtcaat	tgcttatgaa	ggttgactct
	121	gttggattgt	gccactcgga	cctccatgtg	atttacgaag	gtttggattg	tggtgataac
	181	tatgtcatgg	gccatgagat	tgccggtacc	gtggttgatg	ttggtccaga	ggttgataga
	241	tggaatgttg	gtgatagagt	tgccgctgtg	ggcctcaaatg	gttgtggtgg	ttgcagagcc
	301	tgtcgcgacg	gaattgaaaa	tgatgtaaa	cactcttttg	gtaattggta	tggtctgggc
50	361	tcagatggcg	gataccaaca	atatttgctt	gtgcaaaaac	cacgcaattt	ggtaagatt
	421	cctgacaatg	ttcctcgga	tgtagctgca	gcctcgactg	acgctgtatt	gacaccatac
	481	cacgcaatca	agatggctgg	tgtggggcca	acatcaaagg	tgctcattgt	tggtcgctgt
	541	ggcttgggct	gcaatgccgt	gcaagtgcc	aaggcatttg	gtgctcatgt	cactattttg
	601	gacaagaagg	aacgcgcgcg	cgctgaagct	gtcaagtttg	gtgccgacgt	tgcttatgag
55	661	agcttaccac	tgagcaccga	gccaggctca	ttgatgcau	gtttggattt	tggtctgtg

```

721 caagcaacgt ttggcatttg ccaaaagttt tgtgcaccaa aagggtgcat catccccgcg
781 gggctcgggt caccaaagtt gacgctgat ttggcagatt tggattgcg cgaaattcgt
841 attttgggta cttttgggg aaccgcgacc gatttgagg aggtgttga cttggttga
901 aagggacttg ttaagccat ggtgcgtgca gccaagtgg aggaattgcc agactatatt
5 961 gaaaagtga gaaagaatga atatgaaggt agaattgtct ttaatccata ag

```

I 7984 Sequenzprotokoll
SEQUENCE LISTING

10 <110> IEP GmbH

<120> Oxidoreduktasen zur stereoselektiven Reduktion von Ketoverbindungen

<130> I 7984

15

<140> A 1261/2005

<141> 2005-07-27

<160> 130

20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 282

25

<212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<400> 1

```

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

```

	Lys 145	Gly	Ser	Ile	Ile	Asn 150	Thr	Ala	Ser	Phe	Val 155	Ala	Ile	Leu	Gly	Ala 160
5	Ala	Thr	Pro	Gln	Ile 165	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser 170	Lys	Gly	Ala	Val	Leu 175	Ala
	Met	Thr	Arg	Glu 180	Leu	Ala	Met	Val	His 185	Ala	Arg	Glu	Gly	Ile 190	Arg	Ile
10	Asn	Ser	Leu 195	Cys	Pro	Gly	Pro	Leu 200	Lys	Thr	Glu	Leu	Leu 205	Met	Lys	Phe
	Leu	Asp 210	Thr	Pro	Glu	Lys	Lys 215	Glu	Arg	Arg	Met	Val 220	His	Ile	Pro	Met
15	Gly 225	Arg	Phe	Gly	Glu	Ala 230	Val	Glu	Gln	Ala	Arg 235	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu 240
	Ala	Ser	Asp	Asp	Ser 245	Ser	Phe	Ile	Thr	Gly 250	Thr	Asp	Phe	Lys	Val 255	Asp
20	Gly	Gly	Ile	Ser 260	Ser	Cys	Tyr	Val	Thr 265	Pro	Glu	Gly	Glu	Gln 270	Ala	Leu
25	Ala	Ala	Pro 275	Ser	Asn	Leu	Ala	Pro 280	Lys	Ala						

<210> 2

<211> 254

30 <212> PRT

<213> *Pichia farinosa*

<400> 2

35	Met 1	Ala	Tyr	Asn	Phe 5	Thr	Asn	Lys	Val	Ala 10	Ile	Ile	Thr	Gly	Gly 15	Ile
	Ser	Gly	Ile	Gly 20	Leu	Ala	Thr	Val	Glu 25	Lys	Phe	Ala	Lys	Leu 30	Gly	Ala
40	Lys	Val	Val 35	Ile	Gly	Asp	Ile	Gln 40	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys 45	Glu	Ala	Ala
	Phe	Thr 50	Asn	Leu	Lys	Asn	Lys 55	Gly	Ile	Asn	Leu	Asp 60	Gln	Leu	Thr	Tyr
45	Val 65	His	Thr	Asp	Val	Thr 70	Ala	Asn	Ser	Ala	Asn 75	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys 80
50	Thr	Ala	Ile	Ser	Ser 85	Phe	Gly	Gly	Val	Asp 90	Phe	Val	Val	Ala	Asn 95	Ser
	Gly	Ile	Ala	Lys 100	Asp	Gln	Arg	Ser	Glu 105	Glu	Met	Thr	Tyr	Glu 110	Asp	Phe

55

Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asn Val Gly Ala Glu Ala Leu
 35 40 45
 5 Lys Thr Ile Gly Asp Glu Ser Val Ala Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Lys Gly Trp Ile Asp Leu Phe Glu Asn Thr Ile Lys Trp
 65 70 75 80
 10 Phe Gly His Val Asp Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Val Ala Ile Ala
 85 90 95
 Lys Asn Ile Glu Glu Thr Thr Tyr Glu Asp Trp Lys Phe Leu Gln Ser
 100 105
 15 Ile Asn Ser Asp Gly Val Phe Leu Gly Thr Lys Tyr Gly Met Gln Tyr
 115 120 125
 Met Lys Asn Gln Ala Gly Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Asn Leu Ala Ala Tyr Asn His Ser Lys
 145 150 155
 25 Gly Gly Val Arg Ile Leu Ser Lys Ser Ala Ala Leu His Ala Ala Leu
 165 170 175
 Asn Asp Tyr Asn Leu Arg Val Asn Thr Ile His Pro Gly Tyr Ile Lys
 180 185
 30 Thr Pro Leu Val Asp Gly Ile Asp Gly Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Gln Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Tyr Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Glu Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 40 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Leu Ala Gln
 245 250

<210> 5

<211> 347

45 <212> PRT

<213> Microbacterium sp.

<400> 5

50 Met Lys Ala Leu Gln Tyr Thr Lys Ile Gly Ser His Pro Glu Val Val
 1 5 10 15
 Glu Ile Glu Lys Pro Ser Pro Gly Pro Gly Gln Val Leu Leu Lys Val
 20 25 30

55

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

	325						330				335					
	Gly	Thr	Val	Arg	Gly	Arg	Ala	Val	Ile	Val	Pro					
				340				345								
5	<210> 6 <211> 347 <212> PRT <213> <i>Gordona rubropertinctus</i>															
10	<400> 6															
	Met	Lys	Ala	Ile	Gln	Ile	Ile	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Glu	Leu	Arg
	1				5					10					15	
15	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Thr	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Lys	Val
				20					25					30		
20	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	His	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Leu	Asn	Leu	Pro
			35					40					45			
	Glu	Glu	Gly	Phe	Pro	Tyr	Pro	Leu	Pro	Met	Thr	Leu	Gly	His	Glu	Gly
		50					55					60				
25	Ala	Gly	Val	Val	Ala	Glu	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ser	Glu
	65					70					75					80
	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Val	Tyr	Gly	Ala	Trp	Gly	Cys	Gly	Val	Cys	His
					85					90					95	
30	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ser	Arg	Ala	Gly	Glu	Leu
				100					105					110		
	Gly	Ile	Thr	Pro	Pro	Gly	Leu	Gly	Asn	Pro	Gly	Ala	Met	Ala	Glu	Tyr
35			115					120					125			
	Leu	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Arg	His	Leu	Val	Pro	Leu	Gly	Asp	Leu	Asp
		130					135					140				
40	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	His
	145					150					155					160
	Ala	Ile	Lys	Pro	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Val
					165					170					175	
45	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	His	Val	Gly	Ile	Gln	Leu	Leu	Arg
				180					185					190		
	His	Leu	Thr	Pro	Ser	Arg	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Val	Ser	Asp	Asp	Lys
50			195					200					205			
	Leu	Ala	Phe	Ala	Arg	Glu	Val	Gly	Ala	His	Glu	Val	Val	Leu	Ser	Asp
		210					215					220				
55	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Asn	Val	Arg	Lys	Ile	Thr	Gly	Asn	Asp	Gly	Ala

	225					230				235					240	
	Thr	Ala	Val	Phe	Asp 245	Phe	Val	Gly	Leu	Gln 250	Pro	Thr	Leu	Asp	Ile 255	Ala
5	Met	Gly	Val	Val 260	Gly	Thr	Met	Gly	Asp 265	Val	Val	Ile	Val	Gly 270	Ile	Gly
10	Asp	Met	Val 275	Ala	Thr	Ala	Lys	Val 280	Gly	Phe	Phe	Thr	Gln 285	Pro	Tyr	Glu
	Val	Ser 290	Val	Arg	Ala	Pro	Tyr 295	Trp	Gly	Ala	Arg	Asp 300	Glu	Leu	Ile	Glu
15	Val 305	Leu	Asp	Leu	Ala	Arg 310	Asp	Gly	Val	Leu	Glu 315	Val	Ala	Val	Glu	Arg 320
	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp 325	Gly	Val	Glu	Ala	Tyr 330	Arg	Arg	Leu	Ala	Ala 335	Asn
20	Asp	Leu	Arg	Gly 340	Arg	Ala	Val	Val	Val 345	Pro	Asp					
25	<210>	7														
	<211>	339														
	<212>	PRT														
	<213>	<i>Pichia trehalophila</i>														
30	<400>	7														
	Met 1	Cys	Thr	Ser	Gln 5	Ser	Gly	Tyr	Val	Tyr 10	His	Ser	Gly	Arg	Pro 15	Leu
35	Leu	Thr	Lys	Glu 20	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro 25	Glu	Pro	Lys	Gly	Ser 30	Glu	Ile
	Val	Leu	Lys 35	Val	Arg	Ala	Ala	Gly 40	Leu	Cys	Ser	Ser	Asp 45	Val	His	Val
40	Leu	Asn 50	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu 55	Thr	Tyr	Pro	Asn	Ser 60	Phe	Ala	Met	Gly
45	His 65	Glu	Ile	Ala	Gly 70	Glu	Ile	Tyr	Lys	Leu	Gly 75	Pro	Asn	Val	Asp	Ala 80
	Asp	Lys	Tyr	Ser	Ile 85	Gly	Asp	Gly	Tyr	Ala 90	Val	His	Gly	Leu	Asn 95	Ser
50	Cys	Gly	Asp	Cys 100	Ser	Phe	Cys	Lys	Val 105	Gly	Ser	Gln	Asn	Leu 110	Cys	Thr
	Asp	Asn	Asn 115	Ser	Thr	Trp	Tyr	Gly 120	Leu	Gly	Lys	Asn	Gly 125	Gly	Tyr	Glu
55	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Val	His	Asp	Leu	Ile	Lys	Ile	Pro	Glu

	130					135					140					
	Gly 145	Val	Ser	Phe	Ser	Glu 150	Ala	Ala	Val	Ala	Ser 155	Asp	Ala	Val	Leu	Thr 160
5	Pro	Tyr	His	Ala	Ile 165	Ser	Thr	Cys	Asn	Leu 170	Lys	Ala	Thr	Ser	Lys 175	Val
10	Leu	Val	Ile	Gly 180	Cys	Gly	Gly	Leu	Gly 185	Thr	Cys	Ala	Leu	Gln 190	Ile	Ile
	Lys	Leu	Tyr 195	Ser	Ala	Tyr	Val	Val 200	Cys	Val	Asp	Ser	Lys 205	Ala	Glu	Leu
15	Glu	Glu 210	Leu	Ala	Lys	Glu	Tyr 215	Gly	Ala	Asp	Glu	Phe 220	Tyr	Thr	Asp	Leu
20	Ser 225	Lys	Ser	Ser	Val	Pro 230	Lys	Met	Ser	Phe	Asp 235	Cys	Val	Phe	Asp	Phe 240
	Val	Ala	Ile	Gln	Pro 245	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser 250	Gln	Asn	Tyr	Val	Lys 255	Ser
25	Gly	Gly	Ile	Ile 260	Lys	Pro	Val	Gly	Leu 265	Gly	Ala	Pro	Ser	Leu 270	Thr	Phe
	Ser	Leu	Leu 275	Asp	Leu	Gly	Cys	Arg 280	Asp	Val	Lys	Ile	Ile 285	Gly	Ser	Phe
30	Trp	Gly 290	Thr	Gln	Ala	Glu	Gln 295	Lys	Asp	Cys	Met	Glu 300	Leu	Ile	Gln	Arg
35	Gly 305	Leu	Val	Lys	Pro	Leu 310	Ile	Thr	Ser	Phe	Thr 315	Phe	Asp	Glu	Phe	Pro 320
	Gln	Ala	Tyr	Glu	Leu 325	Leu	Ser	Thr	Gly	Lys 330	Ser	Lys	Gly	Arg	Leu 335	Val
40	Ile	Ser	Gln													
	<210>	8														
	<211>	254														
	<212>	PRT														
45	<213>	Candida nemodendra														
	<400>	8														
50	Met 1	Gly	Tyr	Asn	Leu 5	Ile	Asn	Lys	Val	Ala 10	Val	Val	Thr	Gly 15	Gly	Cys
	Ser	Gly	Ile	Gly 20	Leu	Ala	Val	Thr	Lys 25	Lys	Tyr	Leu	Glu	Leu 30	Gly	Ala
55	Lys	Val	Val	Ile	Gly	Asp	Val	Ser	Thr	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Glu	Val

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

<210> 9

<211> 849

<212> DNA

45 <213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

<221> gene

<222> (1)..(849)

50

<400> 9

atgcctgcca ctctcgcct cgacaagaag gttgccatca tcaccggagg agcatccggg 60

atcggcctcg agtcggcctt cgtctttgcc ggagaaggcg cccacgtcgt cgtcgccgac 120

atcaacgtcg aagctgcaa ccgcgccgtc gagatcatca agaccagggt tcaggacgcc 180

55 cccaaggcga tcgccgtaa gtgcgacgtc tccaaggagg acgacatcaa gaacctcgtc 240

	gcgactgctg	tcgaaacttt	tggcaggctc	gatgtcatgt	tcaacaacgc	cggcatcatg	300
	caccccgagg	acgacaatgc	gctcaacacc	tcggagcgca	tctgggacct	gaccatgaac	360
	attaacgtca	agggagtctg	gtggggctgc	aagtacgcga	tcgacgccat	gcgcaagaac	420
	ccgggcgcca	gcaaggggag	catcatcaac	acggctctgt	tcgtcgccat	cctcggagcg	480
5	gcgacgcctc	agatcgcata	caccgcttcg	aagggtgccg	tcttggccat	gactcgcgag	540
	ctcgccatgg	ttcacgcgcg	cgaagggatc	cgaatcaact	cgctctgccc	cggtccgctc	600
	aagacagagc	tcctgatgaa	gttcctcgac	acgccggaga	agaaggagcg	ccggatgggt	660
	cacatcccga	tgggtcgctt	cggtgaggcg	gttgagcagg	ctcgcgcggc	cgcgcttctc	720
	gctagcgacg	acagcagctt	catcaccgga	actgacttca	aggtcgacgg	cggtatcagc	780
10	tcgtgctacg	tcacgccgga	ggcgagcag	gcctcgcgg	cgccgtccaa	cttggctccc	840
	aaggcgtag						849

<210> 10

<211> 765

15 <212> DNA

<213> *Pichia farinosa*

<220>

<221> gene

20 <222> (1)..(765)

<400> 10

	atggcctata	acttactaa	caaagtcgct	atcattacag	gaggaattc	cggtattggt	60
	ttagctacag	tcgagaaatt	cgctaagttg	ggtgctaaag	tcgtcatagg	agacattcaa	120
25	aaagaagaat	ataaagaagc	tgcttttaca	aatttgaaga	acaaaggaat	taatcttgat	180
	caattgacgt	atgtccacac	ggacgtcacc	gcaaattcgg	caaagagaa	ccttttaaag	240
	actgctataa	gctcctttgg	tggcgtgac	ttgtcgtag	caaactctgg	aatagcaaaa	300
	gatcaacggt	ctgaagagat	gacttatgaa	gattcaaga	aaataatcga	tgtcaactta	360
	aacgggtgtt	tttcttggga	taagctagca	attgattatt	ggttaaaaaa	taagaaaaag	420
30	ggctctattg	tcaacacggg	atctattctt	tcatttggtg	gtacccccgg	gttatcacat	480
	tattgtgctg	caaaggggtg	agtgaagtta	ttgacacaaa	ccttggctct	cgaacaggct	540
	aagaatggca	taagagtgaa	ttgtataaat	cctggttata	taagaacacc	tttattagag	600
	ttttgctca	aggacaagta	tgacgcttta	gtggatcttc	atccaatggg	tagattaggt	660
	gaacctgagg	aaatgccaa	tgccattgca	ttcctcgtct	ctgacgaagc	gagcttcata	720
35	actggtacta	ctctactcgt	tgatggagga	tatacagccc	agtaa		765

<210> 11

<211> 1011

40 <212> DNA

<213> *Pichia stipitis*

<220>

<221> gene

45 <222> (1)..(1011)

<400> 11

	atgtctattc	ctgctacaca	atatggtttc	gtcttcacca	aaaaggacgg	tttaaaaatt	60
	cgcgagaaca	tgctgttct	cgaacccaag	gctgaccaag	tcttgcctaa	agtcgacgca	120
	gtaggattgt	gtcactctga	cctcatgcc	atctacgacg	gcttcgactt	tggtgacaat	180
50	tacgttatgg	gccacgaaat	cgccggcacc	attgtcaaga	agggagccat	ggtcgcactt	240
	tgggacctaa	acaccogtgt	tgccgtttt	ggfccaaact	cctgtggcca	ttgtcaactt	300
	tgctgctactg	gtttgaaaa	tgattgtatc	aatgtcgtca	acggctggtt	tggttaggtt	360
	aaaaacggag	gctaccagca	atatttgttg	gtgaaaagc	ctcgtaat	ggttgcattt	420
	ccagacaacg	tcgagctgtc	cgatgcagct	gccattaccg	acgctttgtt	gaccccctac	480
55	catgccatga	gattagctgg	tgtagatca	ggcacgaagc	tcttgcfaat	tggtgctgga	540

	ggattgggag	taaatggat	tcagattgct	aaagcatttg	gagctcaagt	caactgtatc	600
	gacaaaaagc	ccgaggctgt	agacgtcgct	aagagcctag	gcgcagatga	agtatattct	660
	gcacttcctg	aatcaaccag	tccgggaagt	ttcgatgtg	ctatcgacta	cgtttctact	720
	caaggcactt	tcgacacttg	tcaaaagtac	gtcagatctc	agggtaatat	tgttcccgtt	780
5	ggattggccg	ctccaagaat	ttcgttaac	ttgggagatt	tggcccttag	agaaattaat	840
	gtccttggtg	gcttctgggg	tacatcatcc	gactgaagg	aatgtttcga	ttgggtcagc	900
	aagggcaaag	tcaaacctaa	ggtgactgtt	gctccattga	agcaattgcc	tgaatacatt	960
	gtcaagttac	agaattcggc	ctacgaaggt	agagtcgtgt	tcaagccatg	a	1011

10 <210> 12
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> *Leuconostoc carnosum*

15 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(759)

	<400> 12						
20	atgacagatc	ggtaaagaa	taaagttgct	attatcactg	gtggtacact	tggtattggc	60
	ttagcaatgg	ctcaaaagtt	tgtagaagaa	ggcgctaaag	ttgtcattac	tgggcgctgt	120
	gctaattgtg	gtgcagaagc	gctaaagaca	attggtgatg	aatcagtagc	acgatttgtt	180
	caacatgatg	catctgatga	aaaaggctgg	attgatttat	ttgaaaatac	gattaaatgg	240
	tttggtcatg	tcgatacggg	tgtcaataat	gccggtgttg	caattgctaa	aaacattgaa	300
25	gagacaacat	atgaagactg	gaaatttttg	caatcaatca	actctgatgg	cgttttctta	360
	ggaactaagt	acggtatgca	atataatgaaa	aaccaagctg	gtggtgcctc	aattattaat	420
	atgcatctc	ttgaaggatt	tgftggtgat	cctaacttag	ctgctataa	tcattcaaaa	480
	ggtggtgtcc	gcattttgag	taagtcagct	gcactacatg	cagcattgaa	tgactataac	540
	ttacgtgtca	acacgattca	cccaggatat	atcaaaacac	cattggttga	tggtattgat	600
30	ggtgcagaag	aagcccaatc	acaaagaact	caaacaccta	tgggacatat	tggtgaacct	660
	aatgatattg	catatatggc	agtctattta	gctagtgaag	aatcaaaagt	tgcaacaggt	720
	gctgaattcg	ttgttgatgg	cggtctattg	gcacaataa			759

35 <210> 13
 <211> 1044
 <212> DNA
 <213> *Microbacterium* sp.

40 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1044)

	<400> 13						
45	atgaaggcac	tccagtacac	gaagatcgga	tcccaccccg	aagtcgtcga	gatcgagaag	60
	ccctcgccgg	gtcccgggca	ggtactgctc	aaagtcaccg	ccgccggcgt	ctgccactcg	120
	gacgagttcg	tgatgagcct	cagcgaggag	cagtacaccg	ctgccggcta	ccccctgccg	180
	ctcaccctcg	ggcacgaagg	cgccggcatc	gtcgaggagc	tcggcgaagg	tgtcgagcac	240
	ctgagcgtcg	gagacgccgt	cgccgtctac	ggcccctggg	gttgctggcg	ctgccgcaac	300
	tgccgcgagg	gcaaggagaa	ctactgcacg	aacgccccagg	cggaggggat	catgcctccc	360
50	ggtctcgggg	ctcccggctc	aatggcggag	tacatgatcg	tcgacagcgc	gcgacacctc	420
	gttccgctcg	gcgacctoga	cccgtgtag	aacgtttcct	tgacggatgc	cggcctgacc	480
	ccgtaccacg	cggtaagac	gtcactccg	aagctgggcg	ccggaacgac	ggcggctcgtg	540
	atcggcaccg	gggtctcgg	acacgtcgcg	attcagatcc	tgccggcggt	gtcggcccg	600
	accgtgatcg	cgttggacgt	caacgacgag	aaactcgcgc	tggccaagga	ggtcggcgcc	660
55	catcacaccg	tcatgagcga	cggcggcgcc	gtcgacgcga	ttcggcggt	caccgacggt	720

	ctgggcgca	acgccgtctt	cgacttcgtc	ggtgcggacc	cgacgatcgc	gacggcgata	780
	ggagcagccg	cgctcgacgc	agacatcacg	atcgtcggca	tcggcggcgg	aacggctcac	840
	gtcggtttcg	gcaccgtcgc	ttatgacgcg	gcgcttcgca	tcccgtattg	gggctcgcgc	900
	agcgaactga	tcgaggtgct	cgacctcgcg	cgctcagggc	agggtgggagt	cgagatccag	960
5	cgctactcac	tcgacgacgg	cccgaaggcg	tacgaggcgc	tcgcccgggg	cacggtccgc	1020
	ggccgcgccg	tcctcgtccc	ctga				1044

<210> 14

<211> 1044

10 <212> DNA

<213> *Gordona rubropertinctus*

<220>

<221> gene

15 <222> (1)..(1044)

	<400> 14						
	atgaaggcca	tcagatcat	ccagccggggc	aaaccgccgg	agctgcgca	ggtcgagaaa	60
	cccacgccgc	gtcccgggca	ggtgttgctg	aaggtgacgg	cagccggcgc	ctgccattcg	120
20	gacgacttcg	tcctcaacct	gcccgaggaa	ggattcccct	atcccctgcc	gatgacgctc	180
	ggccacgaag	gggcccggct	ggtcgccgag	gtcggtagcg	gcgtcaccgg	catctccgag	240
	ggcacctcgg	tggccgtgta	cggagcctgg	ggttgcggcg	tctgtcactt	ctgcgcccgc	300
	ggcctggaga	actactgcag	ccgagccggc	gaactcggca	tcaccccacc	gggtctcggc	360
	aaccggggcg	cgatggccga	gtacctgctc	gtggacgacg	cacggcatct	ggtgcccgtc	420
25	ggtgacctcg	accgggtggc	tgcagtcca	ctcaccgatg	ccggcctcac	gccctaccac	480
	gcatcaaac	cctcgtctcc	gaagctggtc	ggcggcacca	cggcagtggg	catcggagcc	540
	ggtggtctcg	ggcatgtcgg	gatccaactg	cttcgccacc	tgaccccgtc	ccgggtgatc	600
	gctctcgacg	tgagcgacga	caagctcgcg	ttcgcgcgcg	aggtcggggc	tcacgaggtg	660
	gtgctctccg	acgccgatgc	cgctcgcaac	gtccgcaaga	tcaccggcaa	cgatggtgcg	720
30	accgccgtct	tcgacttcgt	cgggctgcaa	cccacgctcg	acatcgcgat	gggcgtcgtc	780
	gggacctggt	gtgacgtggt	gatcgtgggc	atcggtgaca	tggtcgccac	ggcgaaggtc	840
	ggcttctca	cccagcccta	cgaggtgtcg	gtacgcgcgc	cgtactgggg	ggcgcgcgac	900
	gaactcatcg	aggtgctgga	tctcgacgcg	gatgggggtc	tcgaggtggc	ggtcgaacga	960
	ttctcactcg	atgacggcgt	cgagggcctac	cggcgactgg	ccgccaatga	ccttcgaggg	1020
35	cgagcagtcg	tggtgctcga	ctga				1044

<210> 15

<211> 1020

<212> DNA

40 <213> *Pichia trehalophila*

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1020)

	<400> 15						
	atgtgtactt	ctcaatctgg	ctacgtttat	cattctggta	gaccactttt	aactaaagaa	60
	gaacttcaa	ttcccgaacc	aaaaggctct	gaaattgttc	taaaagttcg	tgcagctggt	120
	ttatgttcat	cagatgttca	tgttctaaac	agcagtttac	cattgactta	cccaaacagt	180
50	tttgctatgg	gtcatgaaat	tgccggtgaa	attataagc	ttggtccaaa	cgttgacgct	240
	gataaatatt	caattggaga	tggatatgca	gttcatggtt	tgaactcctg	ttggtattgt	300
	tccttctgta	aggttggtag	tcaaaacctg	tgtaccgata	acaattcaac	ttggtacggt	360
	ttaggtaaga	atggtggtta	tgaacagtac	gttttagtta	aaagtgttca	tgacttaatt	420
	aaaattccag	aaggtgttag	ttctcagag	gccgcagttg	cttcagatgc	tgtttaact	480
55	ccatatcatg	ctatcagcac	ctgtaactgt	aaggcaactt	ccaaagtttt	agtattggt	540

	tgtggtgggt	taggtacctg	tgctttacaa	atcatcaaat	tgtacagtc	atatgtgtc	600
	tgtgttgact	ccaaaagcaga	attagaagaa	cttgctaaag	aatatggcgc	tgatgaattc	660
	tacaccgatt	tatcaaaatc	cagcgttccc	aaaatgcat	ttgattgtg	ttttgatttt	720
	gttgccattc	agccaacttt	caccatttct	caaaattacg	tcaagagcgg	tggtatcatc	780
5	aaacctgttg	gcttaggtgc	tcctagctta	acatttagtt	tattggactt	agggtgtaga	840
	gacgttaaga	tcattggctc	tttctggggt	acacaagctg	aacaaaaaga	ctgtatggaa	900
	ctaaftcaaa	gaggtttagt	caagccatta	attacaagtt	tcacttttga	tgaatttcct	960
	caagcttatg	aattgtgtgc	gactgggaaa	tccaagggta	gattggttat	cagtcaatag	1020

10 <210> 16
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Candida nemodendra

15 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(765)

	<400> 16						
20	atgggttaca	acttaatcaa	caaagttgca	gtcgtcacag	gaggctgctc	cggaattggt	60
	ctcgcagtga	ccaaaaaata	tcttgaactg	ggagcaaaaag	tggtcatagg	agatgtatcc	120
	actaaagaga	agttaacga	ggtatcctcg	gaactcaaag	ttgcaggcct	aaatgtaaac	180
	aatttaaac	ttgttcagc	agacagtagc	aaagaagacg	acaacaaacg	tttagttgac	240
	gaagcaatca	agaactttgg	tggtcttgat	attgtgtgtg	ctaagccgg	tatcggtagc	300
25	atgattccat	tccatgaaat	gacattgaa	gcatggagaa	agtactcgc	agtaaacctt	360
	gatggtgtgt	tcttgctaga	cagattcgca	attgattact	ggttaaagaa	tagcaaacct	420
	ggtgttatcg	tcaacatggg	ttcaatccac	tcttctgctg	ctgctccagg	attagcatat	480
	tactctgctt	ccaagggagg	tgtaaaacta	ttgaccgaag	ctctgctct	agagtactcg	540
	tccaagggta	ttagagtaaa	ttctgtgaat	cctgcatata	ttcaaacc	attgctagaa	600
30	ttccttccag	aagacaaaat	gaatgccttg	aaggcgggtg	accctattgg	ccgtttaggt	660
	aaaccagaag	aagtagccaa	tgctgtcgca	ttcctcagtt	ccgatgaagc	aaccttcata	720
	catggtactt	ctcttctagt	tgatggaggt	tacaccgctc	aataa		765

35 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rhodotorula mucilaginosa

40 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(9)

<400> 17

45 Met Pro Ala Thr Leu Arg Leu Asp Lys
 1 5

50 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Rhodotorula mucilaginosa

55 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(13)

<400> 18

Gln Ala Leu Ala Ala Pro Ser Asn Leu Ala Pro Lys Ala
1 5 10

5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<400> 19

15

Val Glu Ile Ile Lys Thr Gln Val Gln Asp
1 5 10

<210> 20

20

<211> 14

<212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

25

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<400> 20

30

Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Ala Ser Gly Ile Gly Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 8

35

<212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

<221> PEPTIDE

40

<222> (1)..(8)

<400> 21

45

Ser Cys Tyr Val Thr Pro Glu Gly
1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

50

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

55

<400> 22

Thr Asp Phe Lys Val Asp Gly Gly
1 5

5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Rhodotorula mucilaginosa

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

15

<400> 23

Val Met Phe Asn Asn Ala Gly Ile Met His
1 5 10

20

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Rhodotorula mucilaginosa

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<400> 24

30

Val His Ala Arg Glu Gly Ile Arg Ile Asn
1 5 10

35

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Pichia farinosa

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<400> 25

45

Met Ala Tyr Asn Phe Thr Asn Lys Val Ala
1 5 10

50

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Pichia farinosa

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(12)

<400> 26

Thr Thr Leu Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
1 5 10

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Pichia farinose

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

15

<400> 27

Glu Tyr Lys Glu Ala Ala Phe Thr Asn
1 5

20

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Pichia farinosa

25

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(16)

<400> 28

30

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

35

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Pichia farinosa

<220>

40

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<400> 29

45

Asp Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Ser
1 5

<210> 30

<211> 9

50

<212> PRT

<213> Pichia farinosa

<220>

55

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<400> 30

His Tyr Cys Ala Ser Lys Gly Gly Val
1 5

5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Pichia farinose

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)

15 <400> 31

Asn Cys Ile Asn Pro Gly Tyr Ile
1 5

20

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia farinosa

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 32

30

Leu His Pro Met Gly Arg Leu Gly Glu
1 5

35

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)

<400> 33

45 Met Ser Ile Pro Ala Thr Gln Tyr Gly Phe Val
1 5 10

50

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)

<400> 34

Ser Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Lys Pro
1 5 10

5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

15

<400> 35

Cys His Ser Asp Leu His Ala Ile Tyr
1 5

20

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 36

30

Gly Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val Glu
1 5

35

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 37

45

Thr Phe Asp Thr Cys Gln Lys Tyr Val
1 5

50

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)

<400> 38

Leu Leu Thr Pro Tyr His Ala Met
1 5

5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

15 <400> 39

Leu Val Ser Lys Gly Lys Val Lys Pro
1 5

20

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 40

30

Gly Ala Gly Gly Leu Gly Val Asn Gly
1 5

35

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<400> 41

45

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

50

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)

<400> 42

Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr Ser
1 5

5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Leuconostoc carnosum

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

15 <400> 43

Met Thr Asp Arg Leu Lys Asn Lys Val Ala
1 5 10

20

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Leuconostoc carnosum

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(12)

<400> 44

30

Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Leu Ala Gln
1 5 10

35

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Leuconostoc carnosum

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 45

45

Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asn
1 5

50

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Leuconostoc carnosum

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)

<400> 46

Gly Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser
1 5

5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)

15 <400> 47

Thr Gln Thr Pro Met Gly His Ile
1 5

20

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<400> 48

30

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

35

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> *Microbacterium* sp.

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)

<400> 49

45

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

50

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> *Microbacterium* sp.

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(14)

<400> 50

Leu Ala Ala Gly Thr Val Arg Gly Arg Ala Val Ile Val Pro
1 5 10

5

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

10

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(12)

15

<400> 51

Cys His Ser Asp Glu Phe Val Met Ser Leu Ser Glu
1 5 10

20

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

25

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<400> 52

30

Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Arg Cys
1 5 10

35

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

40

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(13)

<400> 53

45

Val Ser Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His Ala
1 5 10

50

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

55

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(12)

<400> 54

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

5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Microbacterium sp.

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

15

<400> 55

Asp Phe Val Gly Ala Asp Pro Thr Ile
1 5

20

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

25

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<400> 56

30

Met Lys Ala Ile Gln Ile Ile Gln
1 5

35

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

<220>

40

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<400> 57

45

Asp Leu Arg Gly Arg Ala Val Val Val Pro
1 5 10

<210> 58

<211> 9

50

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

<220>

55

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<400> 58

Thr Ala Ala Gly Ala Cys His Ser Asp
1 5

5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

15

<400> 59

Thr Pro Tyr His Ala Ile Lys Pro Ser Leu Pro
1 5 10

20

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

25

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<400> 60

30

Asp Phe Val Gly Leu Gln Pro Thr
1 5

35

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

<220>

40

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<400> 61

45

Val Tyr Gly Ala Trp Gly Cys Gly
1 5

<210> 62

<211> 8

50

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

<220>

55

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<400> 62

Asp Asp Ala Arg His Leu Val Pro
1 5

5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

15

<400> 63

Met Thr Leu Gly His Glu Gly Ala
1 5

20

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

25

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<400> 64

30

Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Leu Leu Arg His Leu
1 5 10

35

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

40

<223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

45

<400> 65

caggaaacag ctatgacc

18

50

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

55

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<400> 66

5 Val Ala Thr Ala Val Glu Thr Phe Gly Arg
1 5 10

<210> 67

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Rhodotorula mucilaginosa

<220>

<221> PEPTIDE

15 <222> (1)..(9)

<400> 67

20 Phe Gly Glu Ala Val Glu Gln Ala Arg
1 5

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<400> 68

35 ccraaytcva cvgcvgtsgc

20

<210> 69

<211> 20

40 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

50 <400> 69

gcctgytcga cvgcytcrc

20

<210> 70

<211> 22

55 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

10

<400> 70

ctccgaggtg ttgagcgcac tg

22

<210> 71

<211> 25

15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

25

<400> 71

gacgaggttc ttgatgtcgt cctcc

25

<210> 72

<211> 12

30

<212> PRT

<213> Pichia farinosa

<220>

<221> PEPTIDE

35

<222> (1)..(12)

<400> 72

Leu Leu Thr Gln Thr Leu Ala Leu Glu Gln Ala Lys

40

1

5

10

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

45

<213> Pichia farinosa

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

50

<400> 73

Tyr Asn Phe Thr Asn Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Ile

55

1

5

10

<210> 74
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> synthetic construct

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g, or t

20

<400> 74
 ygytcyaan gcyaadgtyt g

21

<210> 75
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> synthetic construct

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n is a, c, g, or t

40

<400> 75
 chaayaargt ngchathaty achgg

25

<210> 76
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> synthetic construct

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

55

<400> 76
 caacgttctg aagagatgac ttatg

25

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

10

<400> 77
 ggtggagtga agttattgac

20

15

<210> 78
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)

25

<400> 78
 gccattctta gcctgttcga gag

23

30

<210> 79
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

40

<400> 79
 gtcattctctt cagaacgttg atctt

25

45

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Pichia stipitis

50

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(7)

55

<400> 80

Ala Asp Gln Val Leu Leu Lys
1 5

5 <210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Pichia stipitis

10 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(11)

<400> 81

15 Ile Ser Phe Asn Leu Gly Asp Leu Ala Leu Arg
1 5 10

20 <210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> synthetic construct

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a, c, g, or t

35 <400> 82
gcygaycarg tnttrtraa r

21

40 <210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic construct

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)

50 <400> 83
ctyaargcya artcdccyaa r

21

55 <210> 84
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

10

<400> 84

ctaccatgcc atgagattag

20

<210> 85

<211> 20

15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

25

<400> 85

gctgtagacg tcgctaagag

20

<210> 86

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

40

<400> 86

gattctcaag gctaagtcac

20

<210> 87

<211> 20

45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

55

<400> 87

gatctaacac cagctaact

20

<210> 88

<211> 22

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<400> 88

15 ccaaaggagc ttatagcagt ct

22

<210> 89

<211> 29

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<400> 89

30 gggaaattcc atatgcctgc cactctccg

29

<210> 90

<211> 33

<212> DNA

35 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<400> 90

45 cggcaagctt attacgcctt gggagccaag ttg

33

<210> 91

<211> 32

<212> DNA

50 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

55 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<400> 91

5 ggaaattcca tatggcctat aactcacta ac

32

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<400> 92

20 cactgcatgc tgatggccta taactcact aac

33

<210> 93

<211> 30

<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<400> 93

35 cgcaagctta ttactgggct gtatcctc

30

<210> 94

<211> 33

<212> DNA

40 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

45 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<400> 94

50 ggaaattcca tatgatgtct attcctgcta cac

33

<210> 95

<211> 31

<212> DNA

55 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<400> 95

cactgcatgc gaatgtctat tctgtctaca c

31

10

<210> 96

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

15

<220>

<223> synthetic construct

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<400> 96

cccaagctta tcatggttg aacacgactc tac

33

25

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Leuconostoc carnosum

30

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

35

<400> 97

Ile	Glu	Glu	Thr	Thr	Tyr	Glu	Asp	Trp	Lys
1				5					10

40

<210> 98

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220>

<223> synthetic construct

<220>

50 <221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

55

<223> n is a, c, g, or t

<400> 98
gacagawmgw ttnaarggwa argthgc

27

<210> 99
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

5

<220>
<223> synthetic construct

10

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)

15

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a, c, g, or t

20

<400> 99
gcbgtrtawc cncrctdac dacraaytc

29

<210> 100
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

25

<220>
<223> synthetic construct

30

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)

35

<400> 100
ctaagccaat accaagtga cca

23

<210> 101
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

40

<220>
<223> synthetic construct

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)

50

<400> 101
gaacaaatcg tgctactgat tcatcac

27

<210> 102
<211> 25

55

<212> DNA
<213> Artificial

<220>

5 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

10

<400> 102

gaagaagccc aatcacaag aactc

25

<210> 103

15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20

<223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

25

<400> 103

ggcagtctat ttagctagtg aag

23

<210> 104

30

<211> 14

<212> PRT

<213> Microbacterium sp.

<220>

35

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<400> 104

40

Met Lys Ala Leu Gln Tyr Thr Lys Ile Gly Ser His Pro Glu
1 5 10

<210> 105

45

<211> 11

<212> PRT

<213> Microbacterium sp.

<220>

50

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<400> 105

55

Ala Tyr Glu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Val Val
1 5 10

<210> 106
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> synthetic construct

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 <400> 106
 ctscartaca cvaagatcgg 20
 15
 <210> 107
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> synthetic construct

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 <400> 107
 gcbgcsagbg cytcrtabgc 20
 30
 <210> 108
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> synthetic construct

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 <400> 108
 tcctcgctga ggctcatcac 20
 45
 <210> 109
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> synthetic construct

 <220>
 55 <221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<400> 109

gcttctcgat ctgcagcact tc

22

5

<210> 110

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> synthetic construct

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<400> 110

gcgcagcgaac ctgatcgag

19

20

<210> 111

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> synthetic construct

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<400> 111

gatccagcgc tactcactcg ac

22

35

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

40

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

45

<400> 112

Met Lys Ala Ile Gln Ile Ile Gln Pro Gly

1

5

10

50

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> Gordona rubropertinctus

55

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(13)

<400> 113

5

Val Gly Phe Phe Thr Gln Pro Tyr Glu Val Ser Val Arg
1 5 10

<210> 114

10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15

<223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(26)

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

25

<400> 114

atgaargcna tycaratyat ycarcc

26

<210> 115

30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

35

<223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

50

<400> 115

cytcrtangg ytgngtraar aa

22

<210> 116

55

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>

5 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

10

<400> 116

gaggacgaag tcgtccgaat g

21

<210> 117

15

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

20 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

25

<400> 117

gccgtcacct tcagcaacac c

21

<210> 118

30

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

35 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

40

<400> 118

ctcgacgtga gcgacgacaa g

21

<210> 119

45

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

50 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

55

<400> 119
 gcaagatcac cggcaacgat g 21

5 <210> 120
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(37)

15 <400> 120
 catatggcta gcatgacaga tcggtaaag aataaag 37

20 <210> 121
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)

30 <400> 121
 gcgcggatcc atgacagatc ggttaaagaa taaag 35

35 <210> 122
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

45 <400> 122
 cccaagcttc ttattgtgcc aaatagccg 29

50 <210> 123
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

5 <400> 123
ggaaattcca tatgaaggca ctccagtaca c

31

<210> 124

<211> 32

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

20 <400> 124
cactgcatgc tgatgaaggc actccagtac ac

32

<210> 125

<211> 28

25 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

35 <400> 125
ccaagctta acgtcagggg acgatgac

28

<210> 126

<211> 33

40 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

50 <400> 126
cactgcatgc gaatgaaggc cattcagatc atc

33

<210> 127

<211> 33

55 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

10

<400> 127

cccaagctta ttagtcaggc accacgactg ctc

33

<210> 128

<211> 18

15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

25

<400> 128

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 129

<211> 336

30

<212> PRT

<213> Lodderomyces elongisporus

<400> 129

35

Met Ser Ile Pro Thr Thr Gln Tyr Gly Phe Val Tyr Asn Lys Ser Ser
1 5 10 15

Gly Leu Thr Leu Asn Lys Ser Ile Pro Val Ala Ser Ala Gly Val Gly
20 25 30

40

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

45

His Val Ile Tyr Glu Gly Leu Asp Cys Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly
50 55 60

His Glu Ile Ala Gly Thr Val Val Asp Val Gly Pro Glu Val Asp Arg
65 70 75 80

50

Trp Asn Val Gly Asp Arg Val Ala Ala Val Gly Pro Asn Gly Cys Gly
85 90 95

Gly Cys Arg Ala Cys Arg Asp Gly Ile Glu Asn Val Cys Lys His Ser
100 105 110

55

	Phe	Gly	Asn 115	Trp	Tyr	Gly	Leu	Gly 120	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr 125	Gln	Gln	Tyr
5	Leu	Leu 130	Val	Gln	Lys	Pro	Arg 135	Asn	Leu	Val	Lys	Ile 140	Pro	Asp	Asn	Val
	Pro	Ser	Asp	Val	Ala	Ala 150	Ala	Ser	Thr	Asp	Ala 155	Val	Leu	Thr	Pro	Tyr 160
10	His	Ala	Ile	Lys	Met 165	Ala	Gly	Val	Gly	Pro 170	Thr	Ser	Lys	Val	Leu 175	Ile
	Val	Gly	Ala	Gly 180	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn 185	Ala	Val	Gln	Val	Ala 190	Lys	Ala
15	Phe	Gly	Ala 195	His	Val	Thr	Ile	Leu 200	Asp	Lys	Lys	Glu	Arg 205	Ala	Arg	Ala
20	Glu	Ala 210	Val	Lys	Phe	Gly	Ala 215	Asp	Val	Ala	Tyr	Glu 220	Ser	Leu	Pro	Leu
	Ser	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser 230	Phe	Asp	Ala	Cys	Leu 235	Asp	Phe	Val	Ser	Val 240
25	Gln	Ala	Thr	Phe	Gly 245	Ile	Cys	Gln	Lys	Phe 250	Cys	Ala	Pro	Lys	Gly 255	Cys
	Ile	Ile	Pro	Ala 260	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro 265	Lys	Leu	Thr	Leu	Asp 270	Leu	Ala
30	Asp	Leu	Asp 275	Leu	Arg	Glu	Ile	Arg 280	Ile	Leu	Gly	Thr	Phe 285	Trp	Gly	Thr
35	Ala	Thr 290	Asp	Leu	Glu	Glu	Val 295	Phe	Asp	Leu	Val	Gly 300	Lys	Gly	Leu	Val
	Lys	Pro	Met	Val	Arg	Ala 310	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu 315	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ile 320
40	Glu	Lys	Leu	Arg	Lys 325	Asn	Glu	Tyr	Glu	Gly 330	Arg	Ile	Val	Phe	Asn 335	Pro

<210> 130

<211> 1012

45 <212> DNA

<213> *Lodderomyces elongisporus*

<220>

<221> gene

50 <222> (1)..(1011)

<400> 130

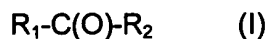
	atgcaattc	caactacca	atatggttt	gtttacaata	agtcgtctgg	ctaacattg	60
	aacaagagta	tacctgtgc	ctcggcaggt	gtgggtcaat	tgcttatgaa	ggttgactct	120
55	gttggattgt	gccactcgga	cctccatgtg	atttacgaag	gtttgattg	tggtgataac	180

	tatgtcatgg	gccatgagat	tgccggtacc	gtggttgatg	ttggtccaga	ggttgataga	240
	tggaatggtg	gtgatagagt	tgccgctgtg	ggccaaatg	ggtgtggtgg	ttgcagagcc	300
	tgtcgcgacg	gaattgaaaa	tgatgtaaa	cactctttg	gtaattggta	tgcttgggc	360
	tcagatggcg	gataccaaca	atatttgctt	gtgcaaaaac	cacgcaattt	ggtaagatt	420
5	cctgacaatg	ttccttcgga	tgtagctgca	gcctcgactg	acgctgtatt	gacaccatac	480
	cacgcaatca	agatggctgg	tgtggggcca	acatcaaagg	tgctcattgt	tggcgctggt	540
	ggcttgggct	gcaatgccgt	gcaagttgcc	aaggcattg	gtgctcatgt	cactattttg	600
	gacaagaagg	aacgcgcgcg	cgctgaagct	gtcaagttg	gtgccgacgt	tgctatgag	660
	agcttaccac	tgagcaccga	gccaggctca	ttgatgcat	gtttgattt	tgtttctgtg	720
10	caagcaacgt	ttggcatttg	ccaaaagttt	tgtgcaccaa	aaggttgcat	catccccgcg	780
	gggctcggtg	caccaaagtt	gacgctgat	ttggcagatt	tggatttgcg	cgaaattcgt	840
	atfttgggta	ctftttgggg	aaccgcgacc	gatttggagg	aggtgttga	ctggttggga	900
	aagggacttg	ttaagcccat	ggtgcgtgca	gccaagttgg	aggaattgcc	agactatatt	960
	gaaaagtga	gaaagaatga	atatgaaggt	agaattgtct	ttaatccata	ag	1012

15

Patentansprüche:

1. Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines Co-Faktors reduziert wird, *dadurch gekennzeichnet*, daß
- eine Oxidoreduktase eingesetzt wird, die eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher
- (a) mindestens 70% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 6 und SEQ ID No 8, oder
 - (b) mindestens 55% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2, oder
 - (c) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3, oder
 - (d) mindestens 75% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4, oder
 - (e) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5, oder
 - (f) mindestens 50% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7, oder
 - (g) mindestens 72% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129.
2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Ketoverbindung die allgemeine Formel I



aufweist, in der R1 für einen der Reste

- 1) $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigtkettig ist,
 - 2) $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und insbesondere bis zu vier Doppelbindungen enthält,
 - 3) $-(C_2-C_{20})$ -Alkinyl, worin Alkinyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und insbesondere bis zu vier Dreifachbindungen enthält,
 - 4) $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
 - 5) $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
 - 6) $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, $-NO_2$ und/oder $-NH_2$ substituiert ist, oder
 - 7) $-(C_3-C_7)$ -Cycloalkyl,
- steht, wobei die oben unter 1) bis 7) genannten Reste unsubstituiert sind oder unabhängig

55

voneinander ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, -NO₂ und/oder -NH₂ substituiert sind,

und R₂ für einen der Reste

8) -(C₁-C₆)-Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigtkettig ist,

9) -(C₂-C₆)-Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und insbesondere bis zu drei Doppelbindungen enthält,

10) -(C₂-C₆)-Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigtkettig ist und insbesondere zwei Dreifachbindungen enthält, oder

11) -(C₁-C₁₀)-Alkyl--C(O)-O-(C₁-C₆)-Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigtkettig ist und unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, -NO₂ und/oder -NH₂ substituiert ist,

steht, wobei die oben unter 8) bis 11) genannten Reste unsubstituiert sind oder unabhängig voneinander ein-, zwei- oder dreifach durch -OH, Halogen, -NO₂ und/oder -NH₂ substituiert sind,

stehen.

3. Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion einer Ketoverbindung zur entsprechenden chiralen Hydroxyverbindung, wobei die Ketoverbindung in Gegenwart eines Co-Faktors mit einer Oxidoreduktase reduziert wird,

dadurch gekennzeichnet, daß

eine Oxidoreduktase eingesetzt wird, für welche

(a) eine Nukleinsäuresequenz aus der Gruppe SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 und SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 130 codiert, oder für welche

(b) eine Nukleinsäuresequenz codiert, deren komplementärer Strang mit einer der in (a) genannten Nukleinsäuresequenzen unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert.

4. Oxidoreduktase zur Verwendung in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz aufweist, bei welcher*

(a) mindestens 70% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID No 1, SEQ ID No 6 und SEQ ID No 8, oder

(b) mindestens 55% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 2, oder

(c) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 3, oder

(d) mindestens 75% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 4, oder

(e) mindestens 65% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5, oder

(f) mindestens 50% der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 7, oder

(g) mindestens 72 % der Aminosäuren identisch sind mit den Aminosäuren der Aminosäuresequenz SEQ ID No 129.

Keine Zeichnung