



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106086089 B

(45)授权公告日 2019.10.29

(21)申请号 201610438016.X

(22)申请日 2016.06.17

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106086089 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(73)专利权人 浙江工业大学  
地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路  
18号

(72)发明人 应向贤 汪钊 孟淑敏 胡宝军  
程峰

(74)专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公  
司 33201  
代理人 黄美娟 李世玉

(51)Int.Cl.  
C12P 7/24(2006.01)

(56)对比文件

CN 105218335 A,2016.01.06,

CN 101186924 A,2008.05.28,

CN 101415831 B,2013.03.13,

应向贤等.老黄酶和甲酸脱氢酶催化柠檬  
醛不对称还原生成香茅醛的条件优化.《发酵科  
技通讯》.2016,第45卷(第2期),第70-74页.

Merckel F等.Effect of a  
microemulsion system on hapten-peptide  
reactivity studies:examples of  
hydroxycitronellal and citral,fragrance  
skin sensitizers,with glutathione.《Chem  
Res Toxicol》.2010,第23卷(第9期),第1433-  
1441页.

审查员 李捷

权利要求书2页 说明书8页  
序列表6页 附图6页

(54)发明名称

一种酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅  
醛光学纯度的方法

(57)摘要

本发明公开了一种酶法不对称还原柠檬醛  
提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,即氨基酸催化  
的柠檬醛顺反异构反应与酿酒酵母烯醇还原酶  
OYE1催化的柠檬醛不对称氢化反应相偶联,提高  
柠檬醛氢化产物(R)-香茅醛光学纯度的方法。所  
述酿酒酵母烯醇还原酶OYE1催化柠檬醛顺反异  
构体不对称氢化合成(R)-香茅醛时,其(R)-香茅  
醛源自反式柠檬醛,而(S)-香茅醛源自于顺式柠  
檬醛,并且对反式柠檬醛的催化速率要远高于顺  
式柠檬醛。通过偶联氨基酸催化的柠檬醛顺反异  
构反应,将部分顺式柠檬醛转化为反式柠檬醛,  
显著地提高了产物(R)-香茅醛的e.e.值;在10mL  
催化体系中,添加100mg/mL的甘氨酸,50mM柠檬  
醛经4h的催化反应后,(R)-香茅醛的e.e.值达  
65.4%,与不偶联顺反异构化反应时(R)-香茅醛  
的e.e.值(16.7%)相比,提高了48.7%。

1. 一种酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述方法为:以含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的工程菌发酵培养获得的湿菌体经超声破碎、分离纯化获得的纯酶为催化剂,以含博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的工程菌发酵培养获得的湿菌体经超声破碎、分离纯化获得的纯酶为偶联酶,以柠檬醛为底物,以仲辛醇为溶剂,以甲酸钠为辅底物,以 $\text{NAD}^+$ 为辅酶,添加氨基酸,以pH 6.0~9.5的缓冲液为反应介质构成转化体系,在30℃、200rpm条件下进行转化反应,反应完全后,获得(R)-香茅醛;所述酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示,所述博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示;所述氨基酸为下列之一:D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、D/L-缬氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-谷氨酰胺。

2. 如权利要求1所述酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述转化体系中,底物以1M底物仲辛醇溶液的形式加入,底物终浓度为50mM,催化剂用量为0.76U/mL,偶联酶用量为1.25U/mL, $\text{NAD}^+$ 终浓度为0.625mM,甲酸钠终浓度为250mM,氨基酸终浓度为100mg/mL。

3. 如权利要求1所述酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述氨基酸为甘氨酸。

4. 如权利要求1所述酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述缓冲液为pH 7.0、50mM的PIPES缓冲液。

5. 如权利要求1所述酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述催化剂按如下方法制备:(1)将含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的工程菌接种于含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,在37℃和200rpm条件下培养12h,作为种子液;然后按体积浓度1%接种量接种至含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,在37℃和200rpm条件下培养至 $\text{OD}_{600}$ 为0.6~0.8时,添加诱导剂IPTG至终浓度为0.2mM,在25℃和200rpm下继续培养10~12h,培养液离心,收集湿菌体;

(2)将步骤(1)湿菌体用pH 8.0、Tris-HCl缓冲液悬浮,在500W下超声破碎20min,工作2s,间歇6s,破碎液于4℃和10000rpm下离心10min,重复离心三次后得到上清粗酶液;采用Ni-NTA金属螯合亲和层析,取上清粗酶液上样至预平衡 $\text{Ni}^{2+}$ 柱中,再依次用含10mM咪唑、40mM咪唑、100mM咪唑、250mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白和目的蛋白,收集含有100mM咪唑的洗脱缓冲液的流出液,用50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液通过超滤浓缩脱盐,所得的脱盐酶液,即为酿酒酵母烯醇还原酶OYE1纯酶;所述洗脱缓冲液为含300mM氯化钠的pH 8.0、50mM的Tris-HCl缓冲液。

6. 如权利要求1所述酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,其特征在于所述偶联酶按如下方法制备:(1)将含博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的工程菌接种于含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃和200rpm条件下培养12h,作为种子液;然后按体积浓度1%接种量接种至含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃和200rpm条件下培养至 $\text{OD}_{600}$ 为0.6~0.8时,添加诱导剂IPTG至终浓度为0.2mM,在25℃和200rpm下继续培养10~12h,培养液离心,收集湿菌体;

(2)将步骤(1)湿菌体用pH 8.0、Tris-HCl缓冲液悬浮,在500W下超声破碎20min,工作2s,间歇6s,破碎液于4℃和10000rpm下离心10min,重复离心三次后得到上清粗酶液;采用Ni-NTA金属螯合亲和层析,取上清粗酶液上样至预平衡 $\text{Ni}^{2+}$ 柱中,再依次用含10mM咪唑、

40mM咪唑、100mM咪唑、250mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白和目的蛋白,收集含有100mM咪唑的洗脱缓冲液的流出液,用50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液通过超滤浓缩脱盐,所得的脱盐酶液,即为甲酸脱氢酶FDHCB纯酶;所述洗脱缓冲液为含300mM氯化钠的pH 8.0、50mM的Tris-HCl缓冲液。

## 一种酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种烯醇还原酶催化柠檬醛的不对称氢化合成(R)-香茅醛的方法,特别涉及一种通过柠檬醛的酶法不对称氢化与氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应相偶联从而提高氢化产物(R)-香茅醛光学纯度的方法。

### (二) 背景技术

[0002] 柠檬醛属于萜烯脂肪醛,分子式为 $C_{10}H_{16}O$ ,具有浓烈的柠檬香气,是一种具有广阔应用前景的香料。目前柠檬醛的工业生产主要是化学法,包括脱氢芳樟醇转位法以及异戊烯醇和异戊烯醛缩合重排合成法。无论是天然产物中提取的还是化学合成来源的柠檬醛均存在两种立体异构体:顺式柠檬醛(橙花醛)和反式柠檬醛(香叶醛)。氨基酸能催化柠檬醛的顺反异构化反应,以顺式柠檬醛或反式柠檬醛为底物,经氨基酸催化后异构化产物中顺式柠檬醛与反式柠檬醛的比例约为60:40,与商品柠檬醛中的顺反比例相近。柠檬醛是含有两个C=C键和一个C=O键的 $\alpha,\beta$ -不饱和醛,其顺反异构体的C=C键和C=O键的选择性加氢可得到多种具有重要用途的氢化产物。柠檬醛 $\alpha,\beta$ 位的C=C键不对称氢化可得到(R)-香茅醛,而(R)-香茅醛是L-薄荷醇的工业生产中的关键中间产物,其经Prins闭环反应形成异胡薄荷醇,异胡薄荷醇再经氢化反应得到L-薄荷醇;L-薄荷醇具有新鲜并带有刺激性甜味,还有强烈的清凉作用,工业价值巨大。

[0003] 从柠檬醛不对称氢化合成(R)-香茅醛是最直接的合成路径,然而柠檬醛的结构特点决定了该反应在化学合成上要兼顾化学选择性和立体选择性。因而,柠檬醛不对称氢化合成(R)-香茅醛在化学合成上仍具有较大的难度,事实上目前的(R)-香茅醛工业化生产并不是以柠檬醛而是以月桂烯为底物从而实现化学合成。日本高砂公司通过以月桂烯为底物合成(R)-香茅醛,(R)-香茅醛经闭环反应成L-胡异薄荷醇,再进一步加氢得到高纯度的L-薄荷醇。该化学法工业化合成L-薄荷醇已应用多年,但仍然存在催化剂昂贵、得率不高等问题。鉴于此,开发化学法的替代工艺具有重要的学术意义和较高的应用价值。

[0004] 与化学法加氢还原相比,生物酶法不对称合成具有条件温和、绿色环保、立体选择性高、工艺简单、副产物少等优点,是最被人寄予期望的化学法的替代者。生物酶法不对称氢化柠檬醛合成(R)-香茅醛的关键酶是烯醇还原酶。诸多研究表明,野生型的烯醇还原酶具有两个不足之处。一方面,烯醇还原酶的催化中心较小,适用于催化小分子底物,而合成的产物往往是大分子;另一方面,与化学法催化类似,同一烯醇还原酶催化顺反异构体的加氢,其产物的手性往往是互补的,因而若底物是顺反异构体混合物,其氢化反应产物的e.e.值往往很低。因此,为了实现酶法不对称氢化柠檬醛合成(R)-香茅醛,通过偶联氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应进而提高氢化产物(R)-香茅醛的光学纯度具有重要的研究意义和应用价值。

### (三) 发明内容

[0005] 本发明目的是利用能耐受高底物浓度的酿酒酵母烯醇还原酶OYE1作为生物催化

剂,直接通过柠檬醛的不对称氢化合成(R)-香茅醛,在不对称氢化体系中同时偶联氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应,从而提高(R)-香茅醛的e.e.值。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 本发明提供一种酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法,即氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应与酿酒酵母烯醇还原酶OYE1催化的柠檬醛不对称氢化反应相偶联,提高柠檬醛氢化产物(R)-香茅醛光学纯度的方法,具体所述方法为:以含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的工程菌发酵培养获得的湿菌体经超声破碎后分离纯化获得的纯酶为催化剂,以含博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的工程菌发酵培养获得的湿菌体经超声破碎后分离纯化获得的纯酶为偶联酶;以柠檬醛为底物,以仲辛醇为溶剂,底物溶于仲辛醇中;以甲酸钠为辅底物,以 $\text{NAD}^+$ 为辅酶;添加氨基酸,以pH 6.0~9.5的缓冲液为反应介质构成转化体系,在30℃、200rpm条件下反应3.5~10h,反应结束后,获得(R)-香茅醛,经气相色谱法分析,测定反应液中产物(R)-香茅醛的得率和e.e.值;所述酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示,所述博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示。

[0008] 所述转化体系中,底物用仲辛醇配制为1M底物溶液,所述底物以1M底物溶液的形式加入,底物终浓度为50mM(即底物溶液的用量以底物物质的量计,底物在转化体系中的终浓度为50mM),催化剂用量为0.76U/mL转化体系,偶联酶用量为1.25U/mL转化体系, $\text{NAD}^+$ 终浓度为0.625mM,甲酸钠终浓度为250mM,氨基酸终浓度为100mg/mL转化体系。

[0009] 进一步,所述的氨基酸包括D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、D/L-缬氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-赖氨酸和L-酪氨酸,更优选甘氨酸。

[0010] 进一步,所述缓冲液优选为pH 7.0、50mM的PIPES缓冲液。

[0011] 进一步,本发明所述催化剂按如下方法制备:(1)将含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的工程菌(E.coli BL21 (DE3)/pEASY-E1-oye1)接种至含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃培养12h,获得种子液,然后按体积浓度1%接种量接种至150mL含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,在相同条件下(37℃)培养至菌液浓度( $\text{OD}_{600}$ )约为0.6~0.8时,添加诱导剂IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷)至终浓度为0.2mM,在25℃和200rpm下诱导10~12h,获得诱导培养液,再将诱导培养液于4℃和10000rpm下离心10min,弃去上清液,收集湿菌体;(2)将步骤(1)湿菌体加入Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中,在500W下超声破碎20min,工作2s,间歇6s,破碎液于4℃和12000rpm下离心10min,重复离心三次后得到上清粗酶液;所述Tris-HCl缓冲液体积用量以湿菌体重量计为15mL/g。采用Ni-NTA金属螯合亲和层析,取上清粗酶液上样至预平衡 $\text{Ni}^{2+}$ 柱中,再依次用含10mM咪唑、40mM咪唑、100mM咪唑、250mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白和目的蛋白,收集含100mM咪唑的洗脱缓冲液的流出液,用50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液通过超滤浓缩脱盐,所得的脱盐酶液,即为酿酒酵母烯醇还原酶OYE1酶液;所述的超滤指的是流出液加入截留分子量10kDa的超滤管中,加入50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,在5000rpm下离心20分钟,然后收集截留的酶液,即为脱盐酶液;所述洗脱缓冲液为含300mM氯化钠的pH 8.0、50mM的Tris-HCl缓冲液。

[0012] 除了筛选基因重组菌的抗性平板中所用的抗生素是Kan外,所述偶联酶的表达和纯化流程与催化剂制备流程一致,具体所述偶联酶按如下方法制备:(1)将含博伊丁假丝酵

母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因的工程菌接种于含100 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C和200rpm条件下培养12h,作为种子液;然后按体积浓度1%接种量接种至含100 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C和200rpm条件下培养至OD<sub>600</sub>为0.6~0.8时,添加诱导剂IPTG至终浓度为0.2mM,在25 $^{\circ}$ C和200rpm下继续培养10~12h,培养液离心,收集湿菌;(2)将步骤(1)湿菌体用pH 8.0、Tris-HCl缓冲液悬浮,在500W下超声破碎20min,工作2s,间歇6s,破碎液于4 $^{\circ}$ C和10000rpm下离心10min,重复离心三次后得到上清粗酶液;采用Ni-NTA金属螯合亲和层析,取上清粗酶液上样至预平衡Ni<sup>2+</sup>柱中,再依次用含10mM咪唑、40mM咪唑、100mM咪唑、250mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白和目的蛋白,收集含有100mM咪唑的洗脱缓冲液的流出液,用50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液通过超滤浓缩脱盐,所得的脱盐酶液,即为甲酸脱氢酶FDHCB纯酶;所述洗脱缓冲液为含300mM氯化钠的pH 8.0、50mM的Tris-HCl缓冲液;所述的超滤指的是流出液加入截留分子量10kDa的超滤管中,加入50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,在5000rpm下离心20分钟,然后收集截留的酶液,即为脱盐酶液。

[0013] 本发明所述酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因源自购自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CICC 1002,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。所述博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB编码基因源自博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)ATCC32195,购自美国典型菌种保藏中心。

[0014] 本发明所述含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因的工程菌是由所述酿酒酵母烯醇还原酶OYE1编码基因构建的重组载体,重组载体再构建重组基因工程菌。优选所述的重组基因工程菌的构建包括如下步骤:以来源于酿酒酵母的基因组DNA为模板,经过PCR扩增得到酿酒酵母烯醇还原酶OYE1基因,然后克隆至表达载体pEASY-E1上,将所述重组载体转化至大肠杆菌BL21 (DE3)中,即可得到所述含酿酒酵母烯醇还原酶OYE1基因的重组基因工程菌E.coli BL21 (DE3)/pEASY-E1-oye1。类似的,我们构建了表达源自博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶FDHCB的基因工程菌E.coli BL21 (DE3)/pEASY-E1-fdhcb。

[0015] 本发明所述的方法以酿酒酵母烯醇还原酶OYE1为催化剂,以NAD<sup>+</sup>为辅酶,催化底物柠檬醛不对称还原生成(R)-香茅醛;同时,以博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB为偶联酶,通过辅底物甲酸钠的脱氢将氧化型辅酶NAD<sup>+</sup>还原成NADH,从而实现辅酶循环。当酿酒酵母烯醇还原酶OYE1催化柠檬醛顺反异构体不对称氢化合成(R)-香茅醛时,其(R)-香茅醛源自反式柠檬醛,而(S)-香茅醛源自于顺式柠檬醛。此外,酿酒酵母烯醇还原酶OYE1对反式柠檬醛的催化速率要远高于顺式柠檬醛。当酿酒酵母烯醇还原酶OYE1催化柠檬醛不对称氢化反应时,反式柠檬醛优先被利用从而导致反应体系中顺反柠檬醛的比例发生改变,而氨基酸催化的顺反异构反应将部分顺式柠檬醛转化为反式柠檬醛从而维持顺反柠檬醛的平衡比例,因而柠檬醛不对称氢化反应与其顺反异构反应相偶联可以提高氢化产物(R)-香茅醛的光学纯度(图1)。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:本发明提供了一种氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应与酿酒酵母烯醇还原酶OYE1催化的柠檬醛不对称氢化反应相偶联,提高柠檬醛氢化产物(R)-香茅醛光学纯度的方法;所述方法将部分顺式柠檬醛经氨基酸催化的顺反异构反应转化为反式柠檬醛,显著地提高了产物(R)-香茅醛的e.e.值;在10mL催化体系中,添加100mg/mL的甘氨酸,50mM柠檬醛经4h的催化反应后,(R)-香茅醛的e.e.值为65.4%,与不偶联顺反异构化反应时(R)-香茅醛的e.e.值(16.7%)相比,提高了48.7%。

#### (四) 附图说明

[0017] 图1为柠檬醛不对称氢化反应与其顺反异构反应相偶联提高(R)-香茅醛光学纯度的反应示意图。

[0018] 图2为分离纯化后酿酒酵母烯醇还原酶OYE1和博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB的SDS-PAGE图,M-Protein marker;1-未诱导菌液;2-纯化后OYE2;3-纯化后FDHCB。

[0019] 图3为顺式、反式柠檬醛以及(S)-香茅醛、(R)-香茅醛标样气相色谱图。

[0020] 图4甲酸脱氢酶催化的辅酶循环与烯醇还原酶催化的柠檬醛不对称氢化反应相偶联的反应示意图。

[0021] 图5不同浓度柠檬醛的氢化反应进程;■:50mM底物;●:100mM底物;▲:150mM底物;▼:200mM底物。

[0022] 图6为20mM柠檬醛经不对称还原反应后的底物与产物气相色谱图;A,反应3.5h后底物柠檬醛与产物香茅醛的气相色谱图;B,反应10h后底物柠檬醛与产物香茅醛的气相色谱图。

[0023] 图7为偶联不同种类氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应对(R)-香茅醛光学纯度的影响;12种氨基酸分别为D-Met、DL-Val、Gly、L-Asp、L-Glu、L-Met、L-Ser、L-Lys、L-Pro、L-Thr和L-Tyr。

[0024] 图8为反应pH对甘氨酸催化柠檬醛顺反异构反应的影响;■:PIPES缓冲液;▲:Tris-HCl缓冲液。

[0025] 图9为偶联甘氨酸催化的顺反异构反应与柠檬醛不对称氢化反应生成(R)-香茅醛气相色谱图。

[0026] 图10在10mL催化体系中偶联甘氨酸催化的顺反异构反应对产物香茅醛得率和e.e.值的影响;■:未加甘氨酸时香茅醛得率;●:添加甘氨酸时香茅醛得率;□:未加甘氨酸时(R)-香茅醛e.e.值;○:添加甘氨酸时(R)-香茅醛e.e.值。

#### (五) 具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0028] 实施例1:酿酒酵母烯醇还原酶OYE1和源自博伊丁假丝酵母的甲酸脱氢酶FDHCB的表达和纯化

[0029] (1) 酿酒酵母烯醇还原酶OYE1大肠杆菌基因工程菌的构建及诱导表达

[0030] 酿酒酵母烯醇还原酶OYE1基因oye1以购自中国工业微生物菌种保藏管理中心的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CICC 1002基因组DNA为模板,利用设计的引物F1和R1进行PCR扩增,扩增体系见表1所示。

[0031] 表1PCR扩增反应体系

试剂	含量
ddH <sub>2</sub> O	补至 50 $\mu$ L
10 $\times$ TransTaq Buffer(含 Mg <sup>2+</sup> )	5 $\mu$ L
dNTPs(2.5 mM)	4 $\mu$ L
[0032] 酿酒酵母 CICC 1002 基因组 DNA 或质粒 pEASY-E1- <i>oye1</i>	<0.5 $\mu$ g
TransTaq(2.5 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
上游引物 F1 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
下游引物 R1 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L

[0033] 引物如下:F1,5'-ATGCCATTTGTTAAGGACTTTA-3';R1,5'-TTAATTTTTGTCCCAACCGA-3'。PCR反应进程为:94℃预变性5min;之后,以94℃变性30s,57℃复性30s,72℃保持1min为一个循环,重复这样循环35次;最后,72℃保持10min。PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并回收。纯化后的PCR产物与载体pEASY-E1相连,连接产物转入大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞中。利用菌落PCR方法检测并确定阳性克隆子,从阳性克隆子中提取质粒。经基因测序后,将所得基因的序列(氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示)与GenBank中对应的基因序列(基因号:AJU17243.1)进行比对分析,将含有正确片段的质粒命名为pEASY-E1-*oye1*。

[0034] 用质粒提取试剂盒从Trans1-T1菌体中提取重组质粒pEASY-E1-*oye1*,将其转入100 $\mu$ L E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,并涂布于含100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB抗性平板上,37℃培养箱中培养过夜。挑取阳性克隆子接种于50mL含100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,在37℃和200rpm条件下培养12h,作为种子液。然后按体积浓度1%接种量扩大培养接种至150mL含100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,在相同条件下培养至菌液浓度(OD<sub>600</sub>)约为0.6~0.8时,添加诱导剂IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷)至终浓度为0.2mM,在25℃和200rpm下继续培养10~12h过量表达目的蛋白,培养液离心,收集湿菌体。

[0035] (2) 酿酒酵母烯醇还原酶OYE1分离纯化

[0036] 将上述湿菌体按1g湿菌体加15mL Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)的比例加入适量Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液,在500W下超声破碎20min(工作2s,间歇6s)后,破碎液于4℃和10000rpm下离心10min,重复离心三次后得到上清粗酶液。

[0037] 按照Ni-NTA金属螯合亲和层析使用说明,取上清粗酶液上样至预平衡Ni<sup>2+</sup>柱中,再依次用含10mM咪唑、40mM咪唑、100mM咪唑、250mM咪唑的洗脱缓冲液(相应浓度的咪唑和300mM的氯化钠溶解在50mM的Tris-HCl缓冲液中,pH 8.0)洗脱杂蛋白和目的蛋白。目的蛋白经含有100mM咪唑的洗脱缓冲液洗脱后,用50mM、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液通过超滤浓缩脱盐,所得的脱盐酶液,即为酿酒酵母烯醇还原酶OYE1纯酶,酶活为0.72U/mg(采用实施例2方法测量),用作酶法催化的催化剂;所述的超滤条件指的是酶液加入截留分子量10kDa的超滤管中,在5000rpm下离心20分钟,然后收集截留的酶液。

[0038] 博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB纯酶的制备除了筛选基因重组菌的抗性平板中



所用的抗生素是卡纳霉素外,用作辅酶的博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB的表达和纯化流程与上述流程一致,以购自美国典型菌种保藏中心的博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*) ATCC32195为基因来源,制备获得博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB纯酶(氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示),酶活为2.2U/mg。

[0039] 粗酶液经Ni-NTA亲和层析分离纯化分别获得了纯度较高的目的酿酒酵母烯醇还原酶OYE1和博伊丁假丝酵母甲酸脱氢酶FDHCB,经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测均为单一条带。重组OYE1与FDHCB均为可溶性蛋白,其分子量大小表观分别为40.5和39.0kD,与理论相符,如图2所示。

[0040] 实施例2:酿酒酵母烯醇还原酶OYE1的酶活力测定

[0041] 标准酶活力测定体系(2mL)分别含0.4mM NADH、100 $\mu$ g/mL酿酒酵母烯醇还原酶OYE1、20mM柠檬醛(柠檬醛仲用辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中终浓度为20mM),以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)为反应介质;所述浓度均指在测定体系中的终浓度。反应在30 $^{\circ}$ C下进行,NADH最后加入,通过检测反应体系在340nm处每分钟的吸光值变化来确定酶活(NADH的摩尔系数 $\epsilon_{340}=6.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。活力单位(U)定义为每分钟消耗1 $\mu$ mol NADH所需的酶量。

[0042] 实施例3:酿酒酵母烯醇还原酶OYE1的催化性质表征

[0043] 标准的催化体系总体积10mL,分别包括20mM柠檬醛(柠檬醛仲用辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中终浓度为20mM)、0.25mM  $\text{NAD}^+$ 、100mM甲酸钠、0.3U/mL OYE1、0.5U/mL FDHCB,以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)为反应介质。不对称还原反应的条件优化在转速为200rpm水浴摇床上进行。反应液用乙酸乙酯萃取,所获得的有机相经无水硫酸钠干燥后,利用气相色谱法定量测定底物柠檬醛和产物(R)-香茅醛。

[0044] 底物柠檬醛和产物(R)-香茅醛的气相色谱(Agilent 6890N)检测条件如下:手性柱BGB-174,30m $\times$ 250 $\mu$ m $\times$ 0.25 $\mu$ m;检测器:FID,250 $^{\circ}$ C;载气: $\text{N}_2$ ,33mL/min;空气流量:300mL/min;氢气流量,30mL/min;分流比:1:30;进样量:1 $\mu$ L;进样口温度:250 $^{\circ}$ C。柱温条件:40 $^{\circ}$ C保持1min,4 $^{\circ}$ C/min升温至120 $^{\circ}$ C,保持1min,20 $^{\circ}$ C/min升温至180 $^{\circ}$ C,保持3min。如图3所示,在上述色谱条件下,(Z)-柠檬醛、(E)-柠檬醛、(S)-香茅醛、(R)-香茅醛出峰时间分别为24.90min、25.49min、22.55min和22.61min。

[0045] 实施例4:偶联辅酶循环系统的柠檬醛氢化合成香茅醛的反应进程

[0046] 以源自酿酒酵母的重组烯醇还原酶OYE1作为催化剂,以源自博伊丁假丝酵母的重组甲酸脱氢酶FDHCB作为辅酶循环驱动力,构建酶法不对称还原柠檬醛生成香茅醛的催化体系(图4)。

[0047] 标准催化体系(1mL)如下:0.3U/mL OYE1、0.1U/mL FDHCB、20mM柠檬醛(柠檬醛仲用辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为20mM)、0.5mM  $\text{NAD}^+$ 、100mM甲酸钠,以50mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)为反应介质。维持体系当中的纯酶OYE1的加入量(0.3U/mL)不变,通过改变其他各组分的添加量以及反应的条件,对标准体系进行优化,最终确定最优的催化体系。优化过程中考察的因素包括:反应温度(25~50 $^{\circ}$ C)、反应pH(6.0~9.0)、FDHCB添加量(0.05~0.5U/mL)、甲酸钠浓度(10~200mM)、 $\text{NAD}^+$ 浓度(0.05~1.0mM)、柠檬醛浓度(20~50mM)。优化后的催化体系(1mL)

为:20mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为20mM)、0.3U/mL OYE1纯酶(实施例1制备)、0.5U/mL FDHCB纯酶(实施例1制备)、0.25mM  $\text{NAD}^+$ 、100mM甲酸钠,以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)反应介质;反应温度为30℃,不对称还原反应在200rpm的水浴摇床中进行。反应过程中未检测到作为副产物的醇或酯,有效地避免了副产物的产生。烯醇还原酶催化的不对称还原反应往往适用底物浓度较低(<10mM)。当适用底物浓度提高至50mM和100mM时,催化体系的其它组分浓度同比例增加(缓冲液浓度不变),成功地提高了柠檬醛不对称氢化反应中的适用底物浓度。当底物浓度为50mM时,优选的催化体系(10mL)如下:0.76U/mL OYE1、1.25U/mL FDHCB、50mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为50mM)、0.625mM  $\text{NAD}^+$ 、250mM甲酸钠,以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)反应介质。在30℃和200rpm反应条件下反应3h后,香茅醛的得率达94%;反应延长至8h,得率为98.3%。当适用底物浓度提高至100mM,优选的催化体系(10mL)如下:1.5U/mL OYE1、2.5U/mL FDHCB、100mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为100mM)、1.25mM  $\text{NAD}^+$ 、500mM甲酸钠、以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)为反应介质。在30℃和200rpm反应条件下反应8h后,香茅醛得率为97.8%,如图5所示。

[0048] 实施例5:顺反柠檬醛与(R/S)-香茅醛的对应关系

[0049] 在1mL反应体系中,分别含20mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为20mM)、0.3U/mL OYE1纯酶(实施例1制备)、0.5U/mL FDHCB纯酶(实施例1制备)、0.25mM  $\text{NAD}^+$ 、100mM甲酸钠,以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)反应介质。在30℃、200rpm下反应1.5h后,反应的得率为51.2%,产物(R)-香茅醛的e.e.值为48.5%,如图6中A所示。当反应4h后,反应的得率为91.5%,产物(R)-香茅醛的e.e.值降低为16.1%,如图6中B所示。

[0050] 经观察反应过程,(1)酿酒酵母烯醇还原酶OYE1对反式柠檬醛的催化速率要高于对顺式柠檬醛的催化速率;(2)生成的(S)-香茅醛和剩余顺式柠檬醛的摩尔数之和约等于起始顺式柠檬醛的摩尔数,与此类似的,生成的(R)-香茅醛和剩余反式柠檬醛的摩尔数之和约等于起始反式柠檬醛的摩尔数;上百次不同条件的催化反应均验证了这一事实,因而推断(R)-香茅醛是源自反式柠檬醛的不对称氢化,而(S)-香茅醛是源自顺式柠檬醛的不对称氢化,并且顺反柠檬醛与(S/R)-香茅醛的对应关系是严格存在的。

[0051] 实施例6:偶联不同氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应对(R)-香茅醛光学纯度的影响

[0052] 氨基酸可以催化顺式和反式柠檬醛之间的异构化反应,当顺反异构反应达到平衡时顺式柠檬醛与反式柠檬醛的比例约为60:40。考察了12种氨基酸对柠檬醛不对称氢化反应中(R)-香茅醛光学纯度的影响。在1mL反应体系中,分别含50mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为50mM)、0.76U/mL OYE1纯酶(实施例1方法制备)、1.25U/mL FDHCB纯酶(实施例1方法制备)、0.625mM  $\text{NAD}^+$ 、250mM甲酸钠、100mg/mL氨基酸(分别为D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、D/L-缬氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-赖氨酸和L-酪氨酸),以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)为反应介质。在30℃和200rpm反应条件下反应

4h,结果如图7所示。L-天冬氨酸、L-谷氨酸以及L-赖氨酸等3种氨基酸催化顺反异构反应时几乎没有香茅醛生成,而当酪氨酸催化顺反异构反应时(R)-香茅醛的e.e.值只有17%左右,与未添加氨基酸的对照组的结果(e.e.值为16.7%)相近。其余的氨基酸催化顺反异构反应均能有效提高(R)-香茅醛的e.e.值,其e.e.值均在50%以上。在所考察的12种氨基酸中,以甘氨酸为催化剂催化顺反异构反应时(R)-香茅醛的光学纯度最高,其e.e.值达57.6%。因此,选择甘氨酸作为催化剂催化柠檬醛的顺反异构反应,并进一步考察了pH值对甘氨酸催化柠檬醛顺反异构的影响,最终的结果如图8所示。在所考察的pH范围(6.0~9.5)内,(R)-香茅醛的e.e.值均维持在较高水平。考虑到pH对不对称氢化反应的影响,选择反应介质为pH 7.0、(50mM、PIPES缓冲液)。

[0053] 实施例7:通过偶联甘氨酸催化的顺反异构反应提高不对称氢化合成(R)-香茅醛光学纯度

[0054] 与甘氨酸催化的顺反异构反应相偶联,在不对称氢化的同时使顺式柠檬醛异构化为反式柠檬醛。在10mL反应体系,分别含50mM柠檬醛(柠檬醛用仲辛醇配制为1M底物溶液的形式加入,底物溶液加入量以柠檬醛的量计,反应体系中柠檬醛终浓度为50mM)、0.76U/mL OYE1纯酶(实施例1方法制备)、1.25U/mL FDHCB纯酶(实施例1方法制备)、0.625mM  $\text{NAD}^+$ 、250mM甲酸钠、100mg/mL甘氨酸以50mM PIPES缓冲液(pH 7.0)为反应介质。在30°C、200rpm下反应3h后,反应的得率为83.9%,产物(R)-香茅醛的e.e.值为67.7%,该反应的底物与产物的气相色谱图如图9所示。与没有偶联顺反异构反应的体系(图6中B)相比,在高产物得率的情况下,偶联顺反异构反应显著地提高了产物(R)-香茅醛的e.e.值,该结果表明一部分顺式柠檬醛经顺反异构反应成为反式柠檬醛,进而不对称氢化为(R)-香茅醛。甘氨酸催化的顺反异构反应偶联柠檬醛不对称氢化反应的反应进程如图10所示,在反应4h后,反应体系中香茅醛得率几乎达到100%,(R)-香茅醛e.e.值为65.4%,比不偶联甘氨酸催化的顺反异构反应时(R)-香茅醛e.e.值(16.7%)提高了48.7%。

## SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学  
 <120> 一种酶法不对称还原柠檬醛提高(R)-香茅醛光学纯度的方法  
 <130>  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1203  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 1  
 atgccatttg ttaaggactt taagccacaa gcttfgagt acaccaactt attcaaacca 60  
 atcaaaattg gtaacaatga acttctgcac cgtgctgtca ttctccatt gactagaatg 120  
 agagcccaac atccaggtaa tattcacaac agagactggg ccgtgaata ctactctcaa 180  
 cgtgctcaaa gaccaggaac ctgattatc actgagggta ccttccctc tccacaatct 240  
 gggggftacg acaatgctcc aggtatctgg tccgaagaac aaattaaaga atggaccaag 300  
 [0001] attttcaagg ctattcatga gaagaaatcg ttcgatggg tccaattatg ggttctaggt 360  
 tgggctgctt tcccagacac ccttctagg gatggttgc gttacgactc cgcttctgac 420  
 aacgtgtata tgaatgcaga acaagaagaa aaggctaaga aggtaacaa cccacaacac 480  
 agtataacaa aggatgaaat taagcaatac gtcaaagaat acgtccaagc tgccaaaaac 540  
 tccattgctg ctgggtccga tgggtttgaa atccacagcg ctaacggta cttgttgaac 600  
 cagttctgg acccacactc caataacaga accgatgagt atggtggatc catcgaaaac 660  
 agagcccgtt tcacctgga agtggttgat gcagttgtcg atgctattgg tcctgaaaaa 720  
 gtcggttga gattgtctcc atatggtgic ttaacagta tgtctggtgg tgctgaaacc 780  
 ggtattgttg ctcaatatgc ttatgtctta ggtgaactag aaagaagagc taaagctggc 840  
 aagcgtttgg ctttctcca tctagttaa cctcgtgtca ccaaccatt ttaactgaa 900  
 ggtgaagggt aatacaatgg aggtagcaac gaattgctt attctatctg gaagggccca 960  
 attattagag ctgtaactt tgctctgccc ccagaagttg tcagagaaga ggtgaaggat 1020  
 cctagaacat tgatcggtta cggtagattt ttatctcta atccagattt ggtgatcgt 1080  
 ttgaaaaag ggttaccatt aaacaaatg gacagagaca ctttctaaa aatgtcagct 1140  
 gagggataca ttgactacc tacgtacgaa gaagctctaa aactcgggtg ggacaaaaat 1200

taa	1203
<210> 2	
<211> 400	
<212> PRT	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 2	
Met Pro Phe Val Lys Asp Phe Lys Pro Gln Ala Leu Ser Asp Thr Asn	
1 5 10 15	
Leu Phe Lys Pro Ile Lys Ile Gly Asn Asn Glu Leu Leu His Arg Ala	
20 25 30	
Val Ile Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Gln His Pro Gly Asn Ile	
35 40 45	
Pro Asn Arg Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Ser Gln Arg Ala Gln Arg	
50 55 60	
Pro Gly Thr Leu Ile Ile Thr Glu Gly Thr Phe Pro Ser Pro Gln Ser	
65 70 75 80	
[0002]	
Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Ile Trp Ser Glu Glu Gln Ile Lys	
85 90 95	
Glu Trp Thr Lys Ile Phe Lys Ala Ile His Glu Lys Lys Ser Phe Ala	
100 105 110	
Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Trp Ala Ala Phe Pro Asp Thr Leu	
115 120 125	
Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Ser Ala Ser Asp Asn Val Tyr Met	
130 135 140	
Asn Ala Glu Gln Glu Glu Lys Ala Lys Lys Ala Asn Asn Pro Gln His	
145 150 155 160	
Ser Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Val Lys Glu Tyr Val Gln	
165 170 175	
Ala Ala Lys Asn Ser Ile Ala Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile His	
180 185 190	

	Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln Phe Leu Asp Pro His Ser Asn	
	195 200 205	
	Asn Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Ile Glu Asn Arg Ala Arg Phe	
	210 215 220	
	Thr Leu Glu Val Val Asp Ala Val Val Asp Ala Ile Gly Pro Glu Lys	240
	225 230 235	
	Val Gly Leu Arg Leu Ser Pro Tyr Gly Val Phe Asn Ser Met Ser Gly	255
	245 250	
	Gly Ala Glu Thr Gly Ile Val Ala Gln Tyr Ala Tyr Val Leu Gly Glu	
	260 265 270	
	Leu Glu Arg Arg Ala Lys Ala Gly Lys Arg Leu Ala Phe Val His Leu	
	275 280 285	
	Val Glu Pro Arg Val Thr Asn Pro Phe Leu Thr Glu Gly Glu Gly Glu	
	290 295 300	
[0003]	Tyr Asn Gly Gly Ser Asn Glu Phe Ala Tyr Ser Ile Trp Lys Gly Pro	320
	305 310 315	
	Ile Ile Arg Ala Gly Asn Phe Ala Leu Arg Pro Glu Val Val Arg Glu	335
	325 330	
	Glu Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Phe Phe Ile	
	340 345 350	
	Ser Asn Pro Asp Leu Val Asp Arg Leu Glu Lys Gly Leu Pro Leu Asn	
	355 360 365	
	Lys Tyr Asp Arg Asp Thr Phe Tyr Lys Met Ser Ala Glu Gly Tyr Ile	
	370 375 380	
	Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Trp Asp Lys Asn	400
	385 390 395	
	<210> 3	
	<211> 1095	
	<212> DNA	
	<213> Candida boidinii	
	<400> 3	

atgaagatcg ttttagctt atatgatgct ggtaaacacg ctgccgatga agaaaaatta	60
tacgggtgta ctgaaaacaa attaggtatt gcccaattgt tgaagatca aggacatgaa	120
ttaatcacca cgtctgataa agaaggcgga aacagtgtgt tggatcaaca tataccagat	180
gccgatatta tcattacaac tcctttccat cctgcttata tctaagga aagaatcgac	240
aaggctaaaa aattgaaatt agttgtgtc gctggtgctg gtctgatca tattgattg	300
gattatata accaaaccgg taagaaaac tccgtttgg aagttaccgg ttctaattt	360
gtctctgttg cagaacacgt tgtcatgacc atgctgtct tggtagaaa tttgtcca	420
gctcacgaac aatcattaa ccacattgg gaggtgctg ctatcgtaa ggatgcttac	480
gatatgaag gtaaaactat cgccaccatt ggtgccgga gaattgta cagagtctg	540
gaaagattag tccattcaa tctaagaa ttattact acgattata agctttacca	600
aaagatgctg aagaaaaagt tgggtctaga agggttgaaa atattgaaga attggtgcc	660
caagctgata tagttacagt taatgtcca ttacagctg gtacaaaagg ttaattaa	720
aaggaattat tgtctaaatt caagaaagt gcttggtag tcaatactgc aagagggtcc	780
atgtgttg ccgaagatgt tctgcagct ttagaatctg gtcaattaag aggttatgt	840
[0004] ggtgatgtt ggtccaca accagctcca aaagatcacc catggagaga tatgagaac	900
aaatattgtg ctggtaacgc catgactcct cactactctg gtactacttt agatgctcaa	960
actagatag ctcaaggtac taaaaatc ttggagtc tcttactgg taagttgat	1020
tacagaccac aagatcat ctattaac ggtgaatag ttaccaagc ttacgtaaa	1080
cacgataaga aataa	1095

<210> 4  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Candida boidinii

<400> 4  
 Met Lys Ile Val Leu Val Leu Tyr Asp Ala Gly Lys His Ala Ala Asp  
 1                    5                    10                    15

Glu Glu Lys Leu Tyr Gly Cys Thr Glu Asn Lys Leu Gly Ile Ala Asn  
 20                    25                    30

Trp Leu Lys Asp Gln Gly His Glu Leu Ile Thr Thr Ser Asp Lys Glu  
 35                    40                    45

	Gly Gly Asn Ser Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp Ala Asp Ile Ile	
	50 55 60	
	Ile Thr Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Ile Thr Lys Glu Arg Ile Asp	
	65 70 75 80	
	Lys Ala Lys Lys Leu Lys Leu Val Val Val Ala Gly Val Gly Ser Asp	
	85 90 95	
	His Ile Asp Leu Asp Tyr Ile Asn Gln Thr Gly Lys Lys Ile Ser Val	
	100 105 110	
	Leu Glu Val Thr Gly Ser Asn Val Val Ser Val Ala Glu His Val Val	
	115 120 125	
	Met Thr Met Leu Val Leu Val Arg Asn Phe Val Pro Ala His Glu Gln	
	130 135 140	
	Ile Ile Asn His Asp Trp Glu Val Ala Ala Ile Ala Lys Asp Ala Tyr	
	145 150 155 160	
[0005]	Asp Ile Glu Gly Lys Thr Ile Ala Thr Ile Gly Ala Gly Arg Ile Gly	
	165 170 175	
	Tyr Arg Val Leu Glu Arg Leu Val Pro Phe Asn Pro Lys Glu Leu Leu	
	180 185 190	
	Tyr Tyr Asp Tyr Gln Ala Leu Pro Lys Asp Ala Glu Glu Lys Val Gly	
	195 200 205	
	Ala Arg Arg Val Glu Asn Ile Glu Glu Leu Val Ala Gln Ala Asp Ile	
	210 215 220	
	Val Thr Val Asn Ala Pro Leu His Ala Gly Thr Lys Gly Leu Ile Asn	
	225 230 235 240	
	Lys Glu Leu Leu Ser Lys Phe Lys Lys Gly Ala Trp Leu Val Asn Thr	
	245 250 255	
	Ala Arg Gly Ala Ile Cys Val Ala Glu Asp Val Ala Ala Ala Leu Glu	
	260 265 270	
	Ser Gly Gln Leu Arg Gly Tyr Gly Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro	
	275 280 285	



Ala Pro Lys Asp His Pro Trp Arg Asp Met Arg Asn Lys Tyr Gly Ala  
 290 295 300

Gly Asn Ala Met Thr Pro His Tyr Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ala Gln  
 305 310 315 320

[0006] Thr Arg Tyr Ala Gln Gly Thr Lys Asn Ile Leu Glu Ser Phe Phe Thr  
 325 330 335

Gly Lys Phe Asp Tyr Arg Pro Gln Asp Ile Ile Leu Leu Asn Gly Glu  
 340 345 350

Tyr Val Thr Lys Ala Tyr Gly Lys His Asp Lys Lys  
 355 360

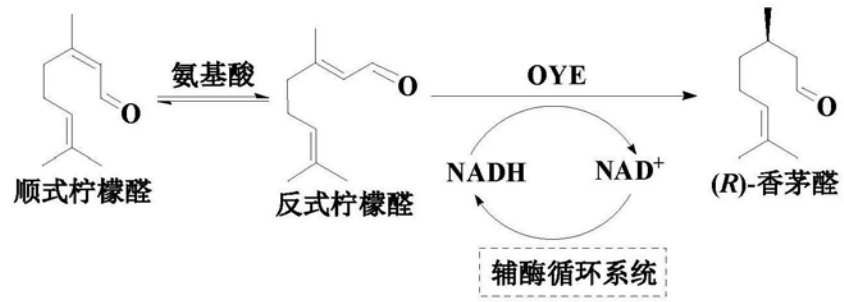


图1

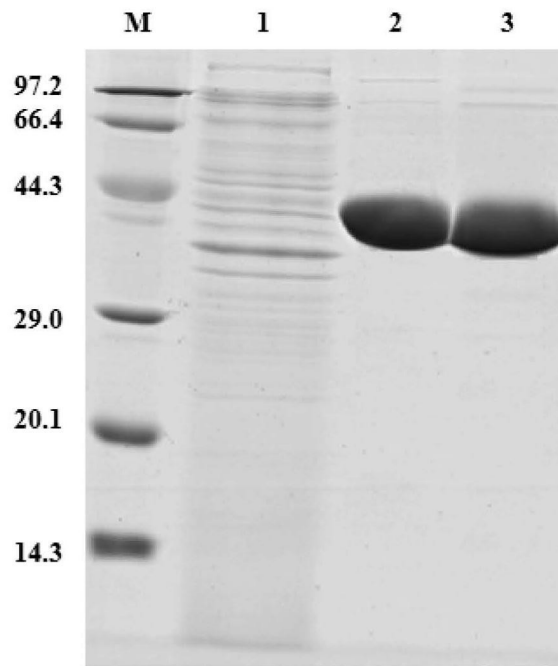


图2

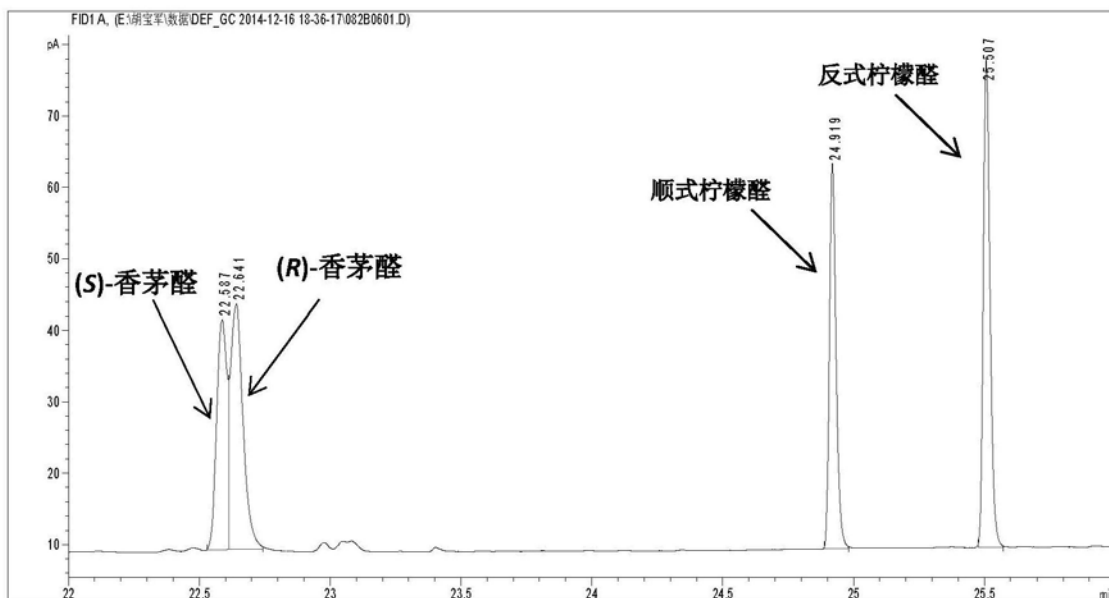


图3

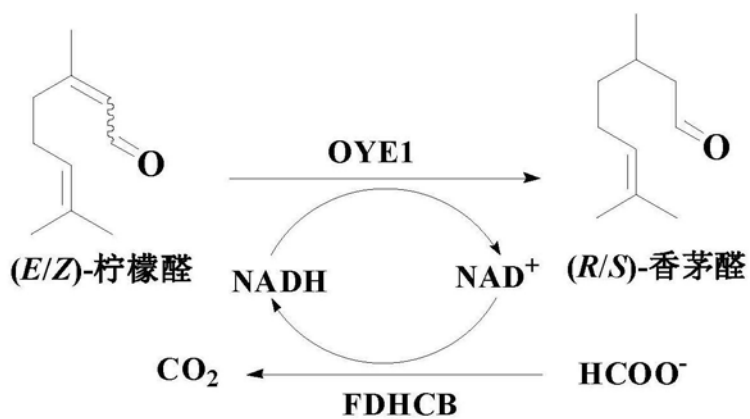


图4

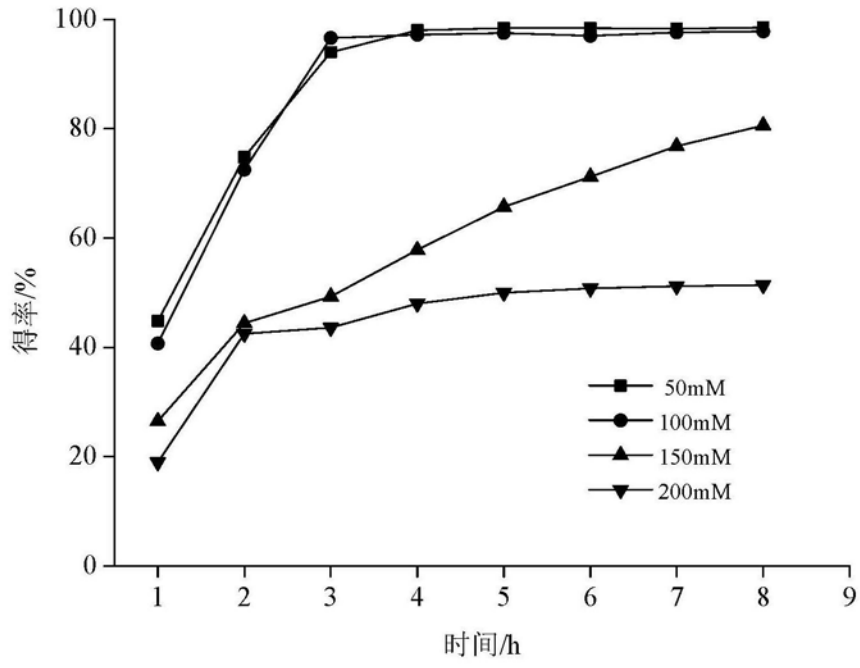
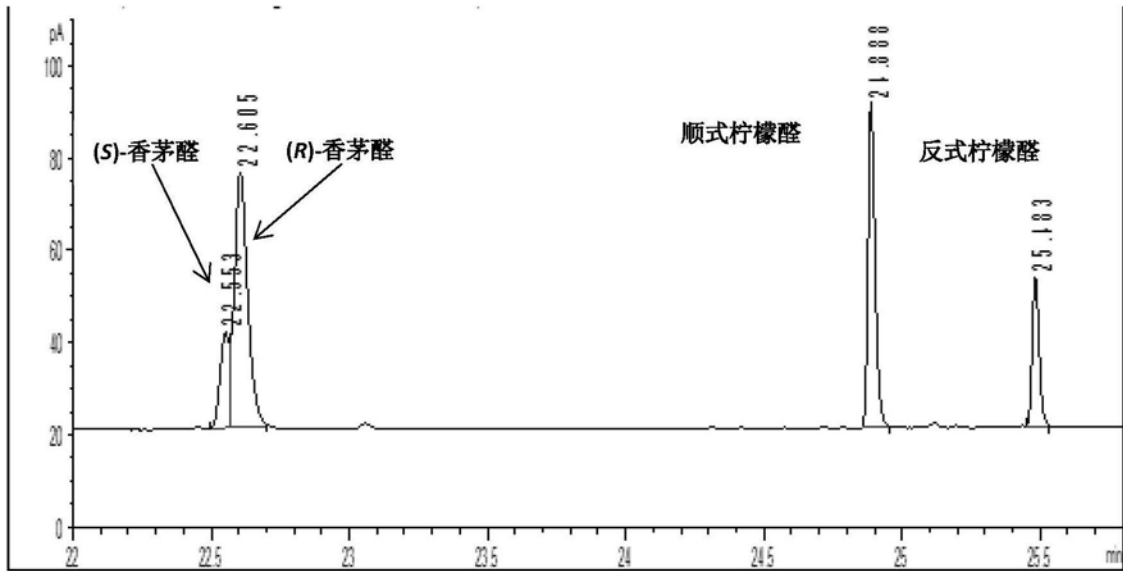
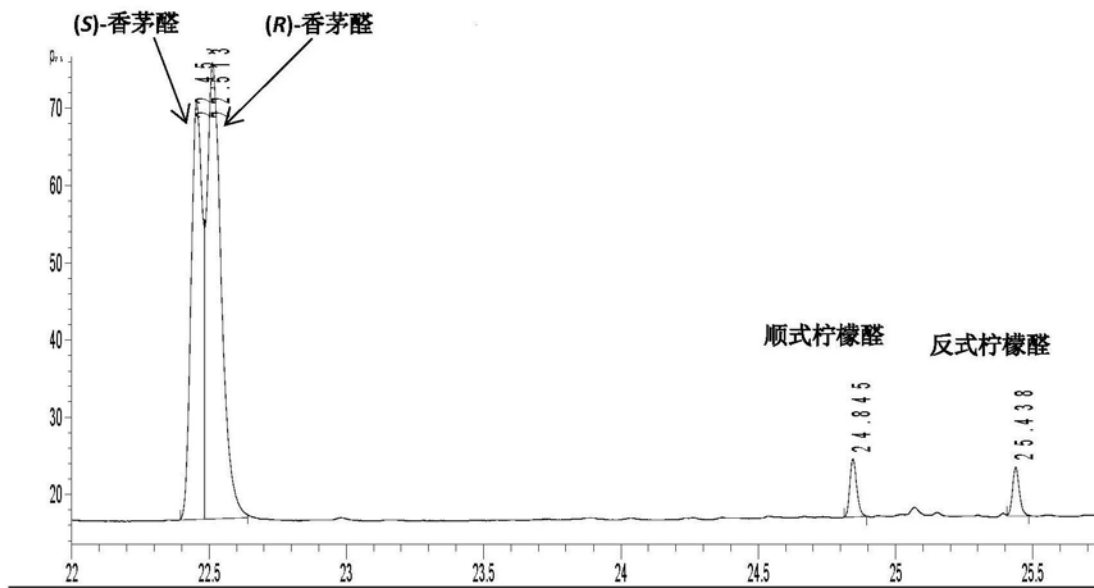


图5



A



B

图6

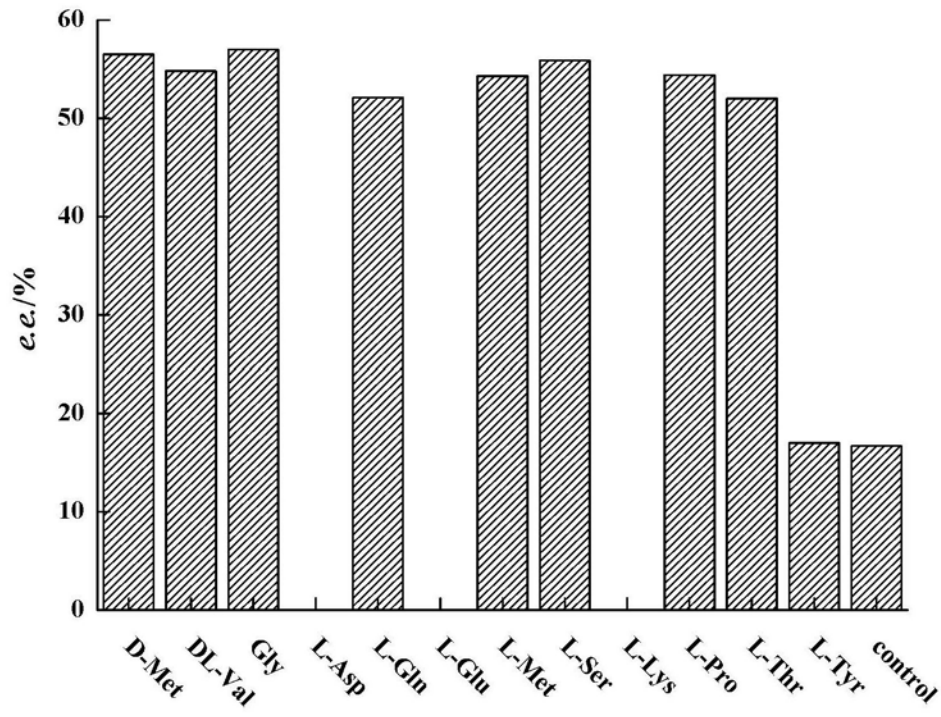


图7

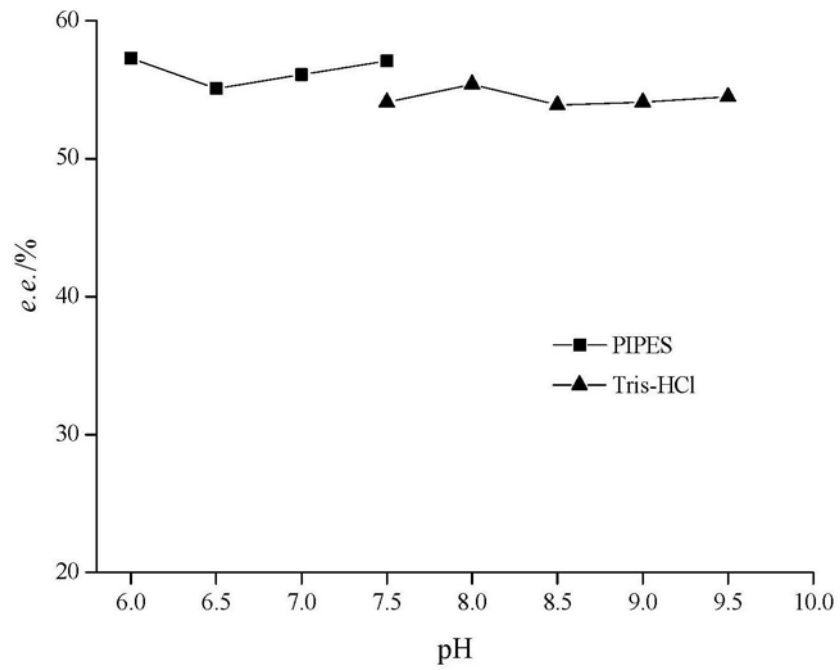


图8

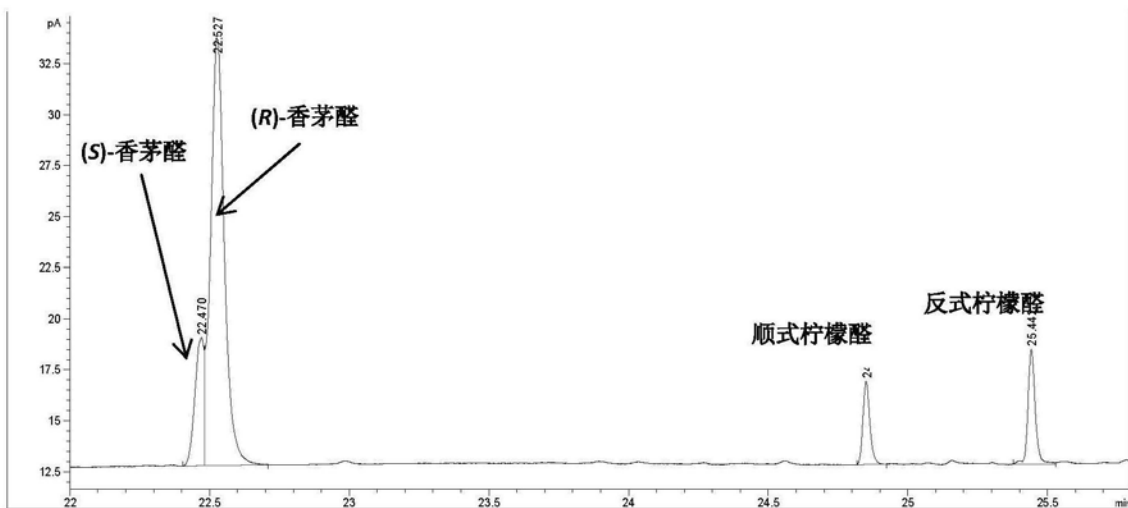


图9

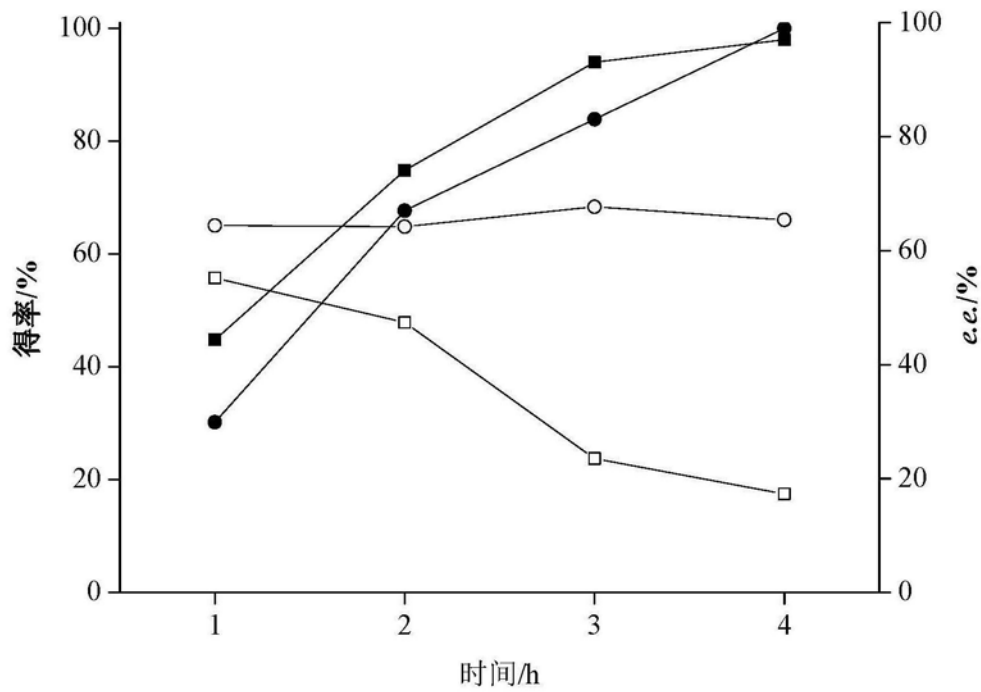


图10