



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113969268 B

(45) 授权公告日 2024.05.17

(21) 申请号 202110475238.X

(22) 申请日 2021.04.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113969268 A

(43) 申请公布日 2022.01.25

(73) 专利权人 永农生物科学有限公司  
地址 312369 浙江省绍兴市杭州湾上虞经  
济技术开发区

专利权人 华东理工大学  
宁夏永农生物科学有限公司

(72) 发明人 王华磊 魏东芝 吴承骏 刘清海  
张舰 罗中华 张长雷

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所  
11410

专利代理师 赵萌

(51) Int.Cl.

C12N 9/06 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109609477 A, 2019.04.12

CN 1714146 A, 2005.12.28

WO 2006061137 A1, 2006.06.15

WO 2009099728 A1, 2009.08.13

WO 2015181119 A2, 2015.12.03

审查员 刘天

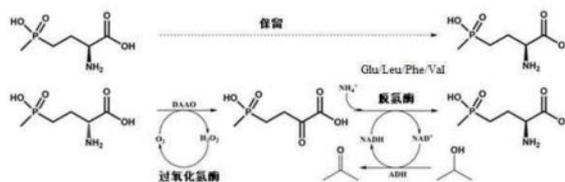
权利要求书2页 说明书12页  
序列表9页 附图2页

(54) 发明名称

Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体及其在制备L-草铵膦中的应用

(57) 摘要

本申请涉及Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体及其在制备L-草铵膦中的应用。所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的氨基酸序列包含对应于第91位和/或第168位的氨基酸残基的替换,所述第91位和第168位是参照SEQ ID NO.5限定的,并且所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO.5所示序列具有至少90%的同一性。



1. 一种Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体,其是由氨基酸序列如SEQ ID NO. 5所示的Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶的第91位的氨基酸残基突变为I和/或第168位的氨基酸残基突变为G得到的。

2. 核酸,其编码权利要求1所述的Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体。

3. 表达载体,其包含权利要求2所述的核酸。

4. 重组宿主细胞,其包含权利要求2所述的核酸或者权利要求3所述的表达载体。

5. 根据权利要求4所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、放线菌(*Actinomycetes*)、链霉菌(*Streptomyces*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的一种。

6. 权利要求1所述的Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体、权利要求2所述的核酸、权利要求3所述的表达载体或权利要求4-5任一项所述的重组宿主细胞在制备L-草铵膦中的用途。

7. 一种制备L-草铵膦的方法,其包括在酶催化体系的存在下使2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸发生转化反应生成L-草铵膦,其中所述酶催化体系包括用于将2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸转化为L-草铵膦的权利要求1所述的Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述酶催化体系还包含将D-草铵膦转化为2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸的D-氨基酸氧化酶。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述酶催化体系还包括过氧化氢酶。

10. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述酶催化体系还包括辅酶循环系统,所述辅酶循环系统选自以下中的至少一种:

(1) 甲酸脱氢酶辅酶循环系统:包括甲酸脱氢酶,甲酸盐和辅酶;

(2) 葡萄糖脱氢酶辅酶循环系统:包括葡萄糖脱氢酶,葡萄糖和辅酶;

(3) 醇脱氢酶辅酶循环系统:包括醇脱氢酶,异丙醇和辅酶。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述酶催化体系还包括辅酶循环系统,所述辅酶循环系统选自以下中的至少一种:

(1) 甲酸脱氢酶辅酶循环系统:包括甲酸脱氢酶,甲酸盐和辅酶;

(2) 葡萄糖脱氢酶辅酶循环系统:包括葡萄糖脱氢酶,葡萄糖和辅酶;

(3) 醇脱氢酶辅酶循环系统:包括醇脱氢酶,异丙醇和辅酶。

12. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述酶催化体系中的每种酶的形式各自独立地选自:游离酶和表达酶的重组宿主细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述表达酶的重组宿主细胞各自独立地选自:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、放线菌(*Actinomycetes*)、链霉菌(*Streptomyces*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

14. 根据权利要求10所述的方法,其中所述酶催化体系中的每种酶的形式各自独立地选自:游离酶和表达酶的重组宿主细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述表达酶的重组宿主细胞各自独立地选自:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、放线菌(*Actinomycetes*)、链霉菌(*Streptomyces*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

16. 根据权利要求12所述的方法,其中,以湿菌体重量计,所述重组宿主细胞的总添加量为1-200 g/L反应液。

17. 根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中,以湿菌体重量计,所述重组宿主细胞的总添加量为1-200 g/L反应液。

18. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述转化反应在pH为7-10的反应液中进行。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述反应液是pH为8-9的反应液。

20. 根据权利要求10所述的方法,其中所述转化反应在pH为7-10的反应液中进行。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中,所述反应液是pH为8-9的反应液。

22. 根据权利要求7或8所述的方法,其中在所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应中,反应开始时无机铵供体与底物的摩尔比为1:1-10:1。

23. 根据权利要求10所述的方法,其中在所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应中,反应开始时无机铵供体与底物的摩尔比为1:1-10:1。

24. 根据权利要求7或8所述的方法,所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应的反应温度为25-45℃,时间为6-24h。

25. 根据权利要求10所述的方法,所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应的反应温度为25-45℃,时间为6-24h。

26. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应在辅酶NADH的存在下进行。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中NADH与底物的摩尔比为1:10-1:5000。

28. 根据权利要求10所述的方法,其中所述Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体催化的还原胺化反应在辅酶NADH的存在下进行。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中NADH与底物的摩尔比为1:10-1:5000。

## Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体及其在制备L-草铵膦中的应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及生物技术领域;特别地,本申请涉及Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体在制备L-草铵膦中的用途,以及一种利用所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体制备L-草铵膦的方法。

### 背景技术

[0002] 草铵膦(又名双丙氨膦、草丁膦,商品名包括保试达、百速顿等,英文名为phosphinothricin(简称PPT),化学名为2-氨基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸)是德国赫斯特公司(现属于拜耳公司)在20世纪80年代开发的一种低毒、高效、非选择性触杀型有机磷除草剂。草铵膦作用于植株后可以抑制谷氨酰胺合成酶,从而中断植物体内谷氨酸的可逆反应,造成代谢紊乱,使植物堆积过量的氨而中毒,同时导致植物无法合成叶绿素从而光合作用受到抑制,导致植物死亡。草铵膦主要用于果园、马铃薯田、非耕地等,用于防治一年生和多年生的禾本科及双子叶杂草,如马唐、狗尾草、野小麦;多年生的禾本科杂草和莎草,如羊茅、鸭茅等。

[0003] 灭生性除草剂市场巨大。目前,世界三大除草剂分别为百草枯,草甘膦,草铵膦。在市场使用方面,草甘膦独占鳌头,但是由于其长期使用,使得大量杂草产生抗性,而草甘膦也趋于失效;百草枯由于其剧毒性,已被列入《鹿特丹公约》,全球越来越多国家禁用或限用,中国农业部已发布公告说明,百草枯在2014年7月1日停止生产,2016年7月1日禁止使用;而目前草铵膦产量虽小,却具有优异的除草性能和较小的药害副作用,因此,在未来一段时间内拥有巨大的市场潜力。

[0004] 草铵膦有两种光学异构体,分别为L-草铵膦和D-草铵膦,但只有L-型具有除草活性,且在土壤中易分解,对人类和动物的毒性较小,除草谱广,对环境的破坏力小。

[0005] 目前,市场上销售的草铵膦一般都是外消旋混合物。若草铵膦产品能以L-构型的纯光学异构体形式使用,可显著降低草铵膦的使用量,这对于提高原子经济性、降低使用成本、减轻环境压力具有重要意义。

[0006] 手性纯L-草铵膦的主要制备方法主要由三种:手性拆分法,化学合成法和生物催化法。

[0007] 手性拆分法需要使用价格昂贵的手性拆分剂(例如奎宁),拆分的步骤非常繁琐(例如需要经历成盐、诱导结晶、解盐等步骤),并且拆分的理论收率只有50%,这导致此路线的工业价值比较低。

[0008] 化学合成法包括不对称合成法和天然氨基酸手性源法等,其缺点包括需要用到昂贵的贵金属和配体或起始原料,或反应路线需要剧毒物质,或反应合成路线较长等。

[0009] 生物催化法生产草铵膦则具有立体选择性严格、反应条件温和、收率高等优点,是生产L-草铵膦的优势方法。主要包括以下两类:(1)以L-草铵膦的衍生物为底物,通过酶法直接水解获得,主要优点是转化率高,产物ee值较高,但需要昂贵且不易获得的手性原料为

前体；(2) 以外消旋草铵膦的前体为底物，通过酶的选择性拆分获得，主要优点为原料相对易得，催化剂活力高，但是理论收率只能达到50%，造成原料浪费。

[0010] 除了这两种传统的生物催化法，以D,L-草铵膦为原料的去消旋合成方法凸显了巨大的成本优势。由于市售的草铵膦为D,L-草铵膦，其工业化生产技术已十分成熟，去消旋合成方法直接以D,L-草铵膦为原料，简单易得，成本较低，能够较好对接现有草铵膦工业生产体系。

## 发明内容

[0011] 本申请基于Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的鉴定，这些突变体可用于改进L-草铵膦的生物酶法生产。

[0012] 在第一方面，本申请涉及具有Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶活性的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体，其中，当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时，所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的氨基酸序列包含对应于第91位和/或第168位的氨基酸残基的替换，所述第91位和第168位是参照SEQ ID NO.5限定的，并且所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO.5所示序列具有至少90%的同一性。

[0013] 在一些实施方式中，所述第91位的氨基酸残基的替换为V91I，即第91位的氨基酸残基由V替换为I。在一些实施方式中，所述第168位的氨基酸残基的替换为N168G，即第168位的氨基酸残基由N替换为G。

[0014] 在一些实施方式中，所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时包含V91I氨基酸替换，其中氨基酸的位置是参照SEQ ID NO.5限定的。在一些实施方式中，所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时包含N168G氨基酸替换，其中氨基酸的位置是参照SEQ ID NO.5限定的。在一些实施方式中，所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时包含V91I和N168G氨基酸替换，其中氨基酸的位置是参照SEQ ID NO.5限定的。

[0015] 包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列在本申请中可以被称为具有Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶活性的野生型酶。所述野生型酶的核苷酸序列可以为SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列。

[0016] 本申请所述的“Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体”具有Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶活性，即将谷氨酸/亮氨酸/苯丙氨酸/缬氨酸等结构类似氨基酸的 $\alpha$ -酮酸前体转化为L-氨基酸的活性，特别地，本申请所述的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶或其突变体具有将2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸(简称PPO)转化为L-草铵膦的活性。

[0017] “氨基酸的位置是参照SEQ ID NO.5限定的”是指Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体中的氨基酸在与SEQ ID NO.5的氨基酸序列进行比对时与特定氨基酸位置(例如第91位、第168位)对齐。

[0018] 与具有Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶活性的野生型酶相比，本申请的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体可以具有改进的活性，例如具有在将2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸转

化为L-草铵膦的催化反应中的更高的催化效率,以及任选地具有在生产L-草铵膦的生物催化法,特别是本申请所描述的生物催化法中使用的更佳稳定性等。

[0019] 本申请中所用的术语“催化效率”是指Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶允许其将2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸转化为L-草铵膦的性质。在一个实施方案中,与野生型或参照Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶相比,本申请的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的催化效率得以增强。优选地,本申请的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的催化效率是野生型或参照Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的催化效率的至少1.1、1.2或1.3倍。

[0020] 在一些实施方式中,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体来源于Delftia acidovorans。

[0021] 在一些实施方式中,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的核苷酸序列与SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体包含与野生型酶相比具有一个或几个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸替换、缺失和/或插入的氨基酸序列和/或与野生型酶相比具有一个或多个截短的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体当与包含SEQ ID NO.5所示序列的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列比对时的氨基酸替换为第91位和/或第168位的氨基酸残基的替换。

[0023] 在第二方面,本申请提供了包含编码上述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的序列的核酸或多核苷酸序列。所述核酸或多核苷酸序列可以是经分离的。

[0024] 术语“核酸”或“多核苷酸”旨在指包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)和RNA分子(例如mRNA)以及使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0025] 在第一方面中描述的特征、定义和优选项同样适用于第二方面。

[0026] 在第三方面,本申请提供了包含上述核酸或多核苷酸序列的表达载体。所述表达载体可以包含与能够指导上述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体在合适表达宿主中表达的一种或更多种控制序列可操作的连接。

[0027] 术语“可操作的连接”是指处于功能关系的多核苷酸元件(或编码序列或核酸序列)的连接。当核酸序列被置于与另一核酸序列的功能关系中时,其是“可操作的连接”的。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则其与编码序列可操作的连接。在一些实施方式中,所述控制序列可以包括启动子、增强子、终止子等。

[0028] 表达载体可以是可方便地进行重组DNA程序并且可引起Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的多核苷酸表达的任何载体(例如质粒或病毒)。表达载体的选择通常取决于载体与待引入所述载体的细胞的相容性。所述表达载体可以作为染色体外实体而存在、其复制独立于染色体复制的载体,例如,质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。或者,表达载体可以是当被引入宿主细胞时整合至基因组中并与其已整合至其中的染色体一起复制的载体。

[0029] 可将多于一个拷贝(例如2个、3个或4个)的本申请的表达载体插入宿主细胞中以

增加由包含在表达载体内的核酸序列编码的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体的产生(过表达)。

[0030] 在一些实施方式中,本申请的表达载体还可以包含编码甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或醇脱氢酶的核酸序列,以实现这些脱氢酶与突变体的表达,优选与L-氨基酸脱氢酶突变体的共表达。

[0031] 在第一和第二方面中描述的特征、定义和优选项同样适用于第三方面。

[0032] 在第四方面,本申请提供了一种重组宿主细胞,其包含本申请所述的核酸或者本申请所述的表达载体。

[0033] 在一些实施方式中,所述重组宿主细胞可以是原核或真核细胞。在一些实施方式中,所述宿主细胞属于酵母属(*Saccharomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、腐质霉属(*Humicola*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)、酒香酵母属(*Brettanomyces*)、管囊酵母属(*Pachysolen*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、放线菌属(*Actinomycetes*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)或埃希氏杆菌属(*Escherichia*);优选地属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的一种。

[0034] 可以通过常规转化或转染技术将本申请的表达载体引入原核或真核细胞中。在本文中使用时,术语“转化”和“转染”旨在指用于将外来核酸(例如DNA)引入本领域技术人员公知的宿主细胞中的多种本领域公认的技术。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可见于 Sambrook等(*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,第2版.Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989), Davis等,*Basic Methods in Molecular Biology*(1986)和其他实验室手册。

[0035] 在一些实施方式中,所述重组宿主细胞是共表达(a)具有2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸活性的L-氨基酸脱氢酶和(b)选自甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或醇脱氢酶的脱氢酶的宿主细胞。

[0036] 在第一、第二、第三方面中描述的特征、定义和优选项同样适用于第四方面。

[0037] 在第五方面,本申请提供了本申请所述的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体、核酸、表达载体或重组宿主细胞在制备L-草铵膦中的用途。

[0038] 在第一、第二、第三、第四方面中描述的特征、定义和优选项同样适用于第五方面。

[0039] 在第六方面,本申请提供了一种制备L-草铵膦的方法,其包括在酶催化体系的存在下使D-草铵膦发生转化反应生成L-草铵膦,其中所述酶催化体系包括用于将2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸转化为L-草铵膦的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体。

[0040] 在一些实施方式中,所述D-草铵膦最初存在于D-和L-草铵膦或其盐的外消旋混合物中。外消旋的草铵膦起始原料可以以多种形式提供。可使用外消旋草铵膦的各种盐,诸如铵盐和盐酸盐,或两性离子。

[0041] 在一些实施方式中,所述酶催化体系还包含用于将D,L-草铵膦中的D-草铵膦转化为2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸的D-氨基酸氧化酶。D-氨基酸氧化酶可以为本领域

已知的任何具有D-氨基酸氧化酶活性的酶或其变体。例如,CN107502647B、CN111019916B、CN111321193B中描述的D-氨基酸氧化酶。

[0042] 在一些实施方式中,所述酶催化体系中还包括过氧化氢酶。所述过氧化氢酶用于去除副产物过氧化氢,因为过氧化氢积累会对酶催化剂有毒害作用。过氧化氢酶可以为本领域已知的任何具有过氧化氢酶活性的酶,例如购自宁夏夏盛实业集团有限公司,商品编号为CAT-400的过氧化氢酶。

[0043] 在一些实施方式中,所述酶催化体系还包括辅酶循环系统,所述辅酶循环系统选自以下中的至少一种:

[0044] (1) 甲酸脱氢酶辅酶循环系统:包括甲酸脱氢酶,甲酸盐和辅酶;

[0045] (2) 葡萄糖脱氢酶辅酶循环系统:包括葡萄糖脱氢酶,葡萄糖和辅酶;

[0046] (3) 醇脱氢酶辅酶循环系统:包括醇脱氢酶,异丙醇和辅酶。

[0047] 在一些优选的实施方式中,所述辅酶是NADH。

[0048] 本申请所述的甲酸脱氢酶(FDH)可以为本领域已知的任何具有甲酸脱氢酶活性的酶或酶变体。在一些实施方式中,所述甲酸脱氢酶来源于*Lactobacillus buchneri*。在一些实施方式中,所述甲酸脱氢酶的氨基酸序列与SEQ ID No.2所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,所述甲酸脱氢酶的核苷酸序列与SEQ ID No.7所示的核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0049] 本申请所述的葡萄糖脱氢酶(GDH)可以为本领域已知的任何具有葡萄糖脱氢酶活性的酶或酶变体。在一些实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶来源于*Exiguobacterium sibiricum*。在一些实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶的氨基酸序列与SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶的核苷酸序列与SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0050] 本申请所述的醇脱氢酶(ADH)可以为本领域已知的任何具有醇脱氢酶活性的酶或酶变体。在一些实施方式中,所述醇脱氢酶来源于*Lactobacillus brevis*。在一些实施方式中,所述醇脱氢酶的氨基酸序列与SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,所述醇脱氢酶的核苷酸序列与SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0051] 本申请所述的酶(例如Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体、D-氨基酸氧化酶、过氧化氢酶、甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或醇脱氢酶)的形式可以为纯化的酶;部分纯化的酶;无细胞提取物或粗细胞提取物;液体、粉末或固定形式;含有酶的可透化处理的细胞、完整细胞或完整发酵液或其他任何合适形式。在一些实施方式中,所述酶催化体系中的每种酶的形式各自独立地选自:游离酶和表达酶的重组宿主细胞。

[0052] 在一些实施方式中,其中所述表达酶的重组宿主细胞各自独立地选自:酵母属(*Saccharomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、腐质霉属(*Humicola*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)、酒香酵母属(*Brettanomyces*)、

管囊酵母属 (*Pachysolen*)、耶氏酵母属 (*Yarrowia*)、放线菌属 (*Actinomycetes*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 或埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)；例如选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*)、东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

[0053] 在一些实施方式中,所述转化反应在反应液中进行。优选的,所述反应液的pH为7-10,优选pH为8-9的反应液。在pH为7-10的反应液中,优选在pH为8-9的反应液中进行反应时可以获得更优的反应效率。

[0054] 本申请所述的方法可以包括:发生由D-氨基酸氧化酶催化的氧化反应的步骤a) 和发生由Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体催化的还原胺化反应的步骤b)。

[0055] 在一些实施方式中,步骤a) 的氧化反应的温度为25-45℃,例如30-45℃,35-45℃等;时间为6-24小时,例如6-12小时,12-24小时,例如6小时、12小时等。

[0056] 在步骤b) 中,步骤a) 中产生的PPO被L-氨基酸脱氢酶催化还原为L-草铵膦,从而实现D,L-草铵膦的原位去消旋化,得到ee值大于99%的L-草铵膦。在一些实施方式中,步骤b) 的反应体系中还包括辅酶NADH。在一些实施方式中,NADH与底物的摩尔比为1:10-1:5000。在一些实施方式中,以摩尔浓度计,NADH的添加量为0.1-2mM;更优选为0.5mM。

[0057] 在一些实施方式中,步骤b) 的还原胺化反应的温度为25-45℃,例如30-45℃,35-45℃等;时间为6-24小时,例如6-12小时,12-24小时,例如6小时、12小时等。

[0058] 在一些实施方式中,在步骤b) 中,反应开始时无机铵供体与底物的摩尔比为1:1-10:1。

[0059] 在一些实施方式中,在步骤b) 中,无机铵供体可以为磷酸铵、氯化铵、硫酸铵、甲酸铵、乙酸铵、氨水;优选地,无机铵供体可以为磷酸铵、甲酸铵、氨水;更优选,无机铵供体可以为氨水。

[0060] 本申请所述的方法可以在一个或更多个反应容器中进行。优选地,本申请所述的方法在一个反应容器中进行(即“一锅两步法”)。

[0061] 在一些优选的实施方式中,步骤a) 中使用的D-氨基酸氧化酶由第一重组微生物表达。因此,步骤a) 可以包括:在第一重组微生物和氧气的存在下,使D-草铵膦发生氧化反应得到2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸。利用所述第一重组微生物能够赋予本申请方法更高的催化效率。可以利用本领域已知的任何方法构建所述第一重组微生物。例如,所述第一重组微生物可以如下构建:构建包含所述D-氨基酸氧化酶基因的重组表达载体,将所述重组表达载体转化至微生物,对获得的重组微生物进行诱导培养,分离培养液得到含有D-氨基酸氧化酶基因的第一重组微生物。优选地,按照10000rpm离心10min后的菌体湿重计,所述第一重组微生物的添加量为1g/L-200g/L反应液;更优选地,10g/L-100g/L反应液;最优选地,为30g/L反应液。

[0062] 在一些优选的实施方式中,步骤b) 中使用的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体和用于辅酶循环的酶由第二重组微生物共表达。因此,步骤b) 可以包括:在共表达Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体和用于辅酶循环的酶(例如甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或醇脱氢酶)的第二重组微生物和无机铵盐的存在下,使步骤a) 获得的2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸发生还原胺化反应得到L-草铵膦。利用所述第二重组微生物能够赋予本申请方法更高的催

化效率。可以利用本领域已知的任何方法构建所述第二重组微生物。例如,所述第二重组微生物可以如下构建:构建含所述Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体和用于辅酶循环的酶的基因的重组表达载体,将所述重组表达载体转化至微生物,对获得的重组微生物进行诱导培养,分离培养液得到含有Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体和用于辅酶循环的酶的基因的第二重组微生物。优选地,按照10000rpm离心10min后的菌体湿重计,所述第二重组微生物的添加量为1g/L-200g/L反应液;更优选地,3g/L-100g/L反应液;最优选地,为30g/L反应液。

[0063] 所述第一和第二重组微生物可以是任何适用于酶表达的工程菌。在一些实施方式中,所述第一和第二重组微生物各自独立地属于以下属中的一种:酵母属(*Saccharomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、腐质霉属(*Humicola*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)、酒香酵母属(*Brettanomyces*)、管囊酵母属(*Pachysolen*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、放线菌属(*Actinomycetes*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)或埃希氏杆菌属(*Escherichia*)。在一些优选的实施方式中,所述第一和第二重组微生物各自独立地选自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。在一些更优选的实施方式中,所述第一和第二重组微生物均是大肠杆菌。

[0064] 本申请方法的产率可以通过本领域已知的任何方法测量。例如,可以通过手性HPLC来测量所获得的草铵膦产物中两个构型含量。在一些实施方式中,获得的L-草铵膦产物的对映体过量(e.e.)至少为99%(相对于D-草铵膦,下同)。在一些实施方式中,获得的L-草铵膦产物的收率至少为95%、96%或97%。

[0065] 本发明大写英文字母代表如本领域技术人员熟知的氨基酸,根据本申请,在此代表的是相应的氨基酸残基。

[0066] 本发明中的实验方法如无特别说明均为常规方法,基因克隆操作具体可参见J.萨姆布鲁克等编的《分子克隆实验指南》。

[0067] 对序列表的描述:

[0068] SEQ ID NO.1是来源于*Microbotryumintermedium*的注释为D-氨基酸氧化酶(DAAO)的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO.2是来源于*Lactobacillus buchneri*的注释为甲酸脱氢酶(FDH)的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO.3是来源于*Exiguobacterium sibiricum*的注释为葡萄糖脱氢酶(GDH)的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO.4是来源于*Lactobacillus brevis*的注释为醇脱氢酶(ADH)的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO.5是来源于*Delftia acidovorans*注释为Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO.6是来源于*Microbotryumintermedium*的注释为D-氨基酸氧化酶(DAAO)的核苷酸序列。

[0074] SEQ ID NO.7是来源于*Lactobacillus buchneri*的注释为甲酸脱氢酶 (FDH) 的核苷酸序列。

[0075] SEQ ID NO.8是来源于*Exiguobacterium sibiricum*的注释为葡萄糖脱氢酶 (GDH) 的核苷酸序列。

[0076] SEQ ID NO.9是来源于*Lactobacillus brevis*的注释为醇脱氢酶 (ADH) 的核苷酸序列。

[0077] SEQ ID NO.10是来源于*Delftia acidovorans*注释为Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶的核苷酸序列。

[0078] 本申请的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体使反应体系具有更好的催化效率,以PPO为底物进行催化反应时,转化率远高于野生型,L-草铵膦产率也大幅提升。

### 附图说明

[0079] 图1示例性示出本申请方法采用的多酶体系拆分法生产L-草铵膦的反应式。

[0080] 图2示例性示出去消旋合成L-草铵膦的反应式(葡萄糖脱氢酶辅酶循环系统)。

[0081] 图3示例性示出去消旋合成L-草铵膦的反应式(甲酸脱氢酶辅酶循环系统)。

[0082] 图4示例性示出双菌多酶一锅两步法去消旋化制备L-草铵膦的反应进程。

### 具体实施方式

[0083] 实施例

[0084] 材料和方法

[0085] 上游基因工程所用试剂:实施例中使用的基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司;一步克隆试剂盒购自诺唯赞有限公司;*E. coli* BL21 (DE3)、质粒pET-28a(+)等购自上海旭冠生物科技发展有限公司;DNA标记、低分子量标准蛋白、蛋白预制胶购自北京GenStar有限公司;ClonExpress II One Step Cloning Kit无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;pfu DNA聚合酶和Dpn I内切酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;引物合成,序列测序工作由杭州擎科梓熙生物技术有限公司完成,全基因合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。以上试剂使用方法参考商品说明书。

[0086] 下游催化工艺所用试剂2-羰基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸(PPO)来自于永农生物科学有限公司;D,L-草铵膦来自于永农生物科学有限公司;其他常用试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

[0087] 实施例中通过高效液相色谱(HPLC)检测反应的进行,并对PPO进行分析。HPLC分析方法为:色谱柱PBR;柱温/30℃;流速/1mL/min;检测波长/210nm;流动相:5mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。

[0088] 通过手性HPLC分析方法检测草铵膦的两个构型的含量,手性HPLC分析方法为:色谱柱/OA-5000L;流动相/0.5g/L五水硫酸铜铵溶液,另加入0.3%v/v乙腈;检测波长/254nm;流速/1mL/min;柱温/35℃。

[0089] 实施例1:基因工程菌的构建

[0090] 将来源于*Microbotryum intermedium*的D-氨基酸氧化酶(DAAO, GenBank号:FMSP01000004.1,氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示)的基因

序列进行全基因合成后,插入表达质粒pET-28a(+),得到pET-28a-daa0。测序验证无误后将pET-28a-daa0转入表达宿主大肠杆菌E.coli BL21(DE3)中用于后续重组酶的表达。

[0091] 将来源于Lactobacillus buchneri的甲酸脱氢(FDH)的序列(氨基酸序列为SEQ ID NO.2所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示)进行全基因合成后,插入表达质粒pET-28a(+),得到pET-28a-fdh。测序验证无误后将pET-28a-fdh转入表达宿主大肠杆菌E.coli BL21(DE3)中用于后续重组酶的表达。

[0092] 将来源于Exiguobacterium sibiricum的葡萄糖脱氢酶(GDH)的序列(氨基酸序列为SEQ ID NO.3所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.8所示)进行全基因合成后,插入表达质粒pET-28a(+),得到pET-28a-gdh。测序验证无误后将pET-28a-gdh转入表达宿主大肠杆菌E.coli BL21(DE3)中用于后续重组酶的表达。

[0093] 将来源于Lactobacillus brevis的醇脱氢酶(ADH)的序列(氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示)进行全基因合成后,插入表达质粒pET-28a(+),得到pET-28a-adh。测序验证无误后将pET-28a-adh转入表达宿主大肠杆菌E.coli BL21(DE3)中用于后续重组酶的表达。

[0094] 将来源于Delftia acidovorans的Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶(GenBank号:WP\_012202150.1,氨基酸序列为SEQ ID NO.5所示,核苷酸序列为SEQ ID NO.10所示)的基因序列进行全基因合成,插入表达质粒pET-28a(+)上,得到质粒pET-28a-laadh。测序验证无误后转入表达宿主大肠杆菌E.coli BL21(DE3)中用于后续重组酶的表达。

[0095] 实施例2:工程菌菌体的培养

[0096] 分别将工程菌重组大肠杆菌E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAA0、E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH、E.coli BL21(DE3)/pET-28a-FDH、E.coli BL21(DE3)/pET-28a-GDH和E.coli BL21(DE3)/pET-28a-ADH经平皿划线活化后,挑单菌落接种至含有50 $\mu$ g/mL卡那霉素的10mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养10h。按2%的接种量转接至50mL同样含有50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD600达到0.8左右时,加入终浓度为0.1mM的IPTG,25 $^{\circ}$ C下震荡培养12h。培养结束后,将培养液8000rpm离心10min,弃上清,收集菌体,放到-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中保存,待用。

[0097] 实施例3:D-氨基酸氧化酶(DAAO)突变体(62位、226位)的构建

[0098] 在实施例1中所述野生型DAAO序列的基础上突变了第62位和/或226位(具体为F62K、M226T)。针对突变的D-氨基酸氧化酶序列的第62位、第226位进行突变的突变体设计PCR的引物序列,具体如表1所示:

[0099] 表1

[0100]

序号	引物名	引物序列
1	F62KF	gattcttgcgggtccaccttggggcaccagttcgctc
2	F62KR	gagcgaactggtgcccccaaggtggacccgcaagaatc
3	M226TF	ggggtctgacgcatcggtagtgcacagcttgac
4	M226TR	gtcaagctgtgcactaccgatgcgtcagacccc

[0101] PCR(25 $\mu$ L)扩增体系如下:

[0102] Pfu缓冲液12.5 $\mu$ L,引物2 $\mu$ L,模板质粒1 $\mu$ L,dNTP 0.5 $\mu$ L,Pfu 1 $\mu$ L,加入ddH<sub>2</sub>O补足至25 $\mu$ L。

[0103] PCR扩增条件:

[0104] (1) 95℃预变性3min, (2) 95℃变性30秒, (3) 65℃退火30秒, (4) 72℃延伸5min, 20个循环, (5) 72℃延伸10min, (6) 4℃保存。

[0105] PCR后取5μL对扩增产物进行核酸凝胶电泳分析,得到的目标条带清晰,将剩余产物加入0.5μL Dpn I内切酶,放于37℃下消化模板DNA 3h。

[0106] 反应完成转化至BL21感受态细胞,涂布在含有50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基,37℃培养过夜。挑单菌落,获得突变体转化子。按照实施例2所述获得菌体。

[0107] 实施例4:Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体(91位、168位)的构建

[0108] 在实施例1中所述野生型LAADH序列的基础上突变了第91位和168位(具体为V91I、N168G)。针对突变的LAADH序列的第91位、第168位进行突变的突变体PCR设计引物序列,具体如表2所示:

[0109] 表2

序号	引物名	引物序列
1	V91IF	cctggtggaaacggatgccgcccttgccg
2	V91IR	cggcaagggcggcatccgtttccaccagg
3	N168GF	gggtccgaagaatcggtcgtgcagcgcttgc
4	N168GR	gcaagcgtgcacgaccgattcttcggacc

[0111] PCR扩增体系及条件同实施例3所述步骤。

[0112] 反应完成转化至BL21感受态细胞,涂布在含有50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基,37℃培养过夜。挑单菌落,获得突变体转化子。按照实施例2所述获得菌体。

[0113] 实施例5:Glu/Leu/Phe/Val脱氢酶突变体酶活的比较

[0114] 通过测定PPO的消耗量来比较L-氨基酸脱氢酶与其突变体的催化效率。当只有L-氨基酸脱氢酶及突变体时,反应体系为:250mM PPO,100mM pH8.0磷酸盐缓冲液,300mM葡萄糖,10g/L L-氨基酸脱氢酶或其突变体冻干细胞和10g/L葡萄糖脱氢酶冻干细胞。反应24h后,取反应液样品进行处理,使用HPLC测定L-PPT的浓度并计算转化率(产物L-PPT的浓度/初始底物PPO的浓度×100%)。

[0115] 表3

酶编号	野生型/突变体	剩余的 PPO /mM	产物 L-PPT /mM	转化率 (四舍五入,保留3位小数)
1	野生型	50±9	183±11	73.2%
2	V91I	12.5±3	228±7	91.2%
3	N168G	20±5	223±3	89.2%
4	V91I+N168G	0	239±8	95.6%

[0117] 由表3可以看出,所得突变体的转化率均高于野生型LAADH的转化率。其中,转化率最高的为LAADH突变体4,其突变位点第91位的V突变为I,第168位的N突变为G。

[0118] 实施例6:LAADH表达菌株的构建

[0119] 一、含葡萄糖脱氢酶辅酶循环系统的表达菌株的构建

[0120] 在载体pET-28a-LAADH V91I-N168G上,通过无缝克隆试剂盒将葡萄糖脱氢酶基因片段连接到多克隆位点上,酶切位点为Hind III,构建得到质粒pET-28a-LAADH V91I-N168G-GDH,构建得到表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-GDH。

[0121] 二、含甲酸脱氢酶辅酶循环系统的表达菌株的构建

[0122] 在载体pET-28a-LAADH V91I-N168G上,通过无缝克隆试剂盒将甲酸脱氢酶基因片段连接到多克隆位点上,酶切位点为Hind III,构建得到质粒pET-28a-LAADH V91I-N168G-FDH,构建得到表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-FDH。

[0123] 三、醇脱氢酶辅酶循环系统的表达菌株的构建

[0124] 在载体pET-28a-LAADH V91I-N168G上,通过无缝克隆试剂盒将醇脱氢酶基因片段连接到多克隆位点上,酶切位点为Hind III,构建得到质粒pET-28a-LAADH V91I-N168G-ADH,构建得到表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-ADH。

[0125] 实施例7:双菌多酶去消旋制备L-草铵膦(含葡萄糖脱氢酶GDH辅酶循环体系)

[0126] 按照实施例2的方法培养能够表达D-氨基酸氧化酶菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T和能够表达L-氨基酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶的表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-GDH,离心收集菌体细胞并冻干。

[0127] 在1L反应器中,加入600mL的磷酸铵缓冲液(pH8.0,100mM),含有400mM D,L-PPT,8000U/L过氧化氢酶,5%(v/v)消泡剂,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T菌体,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-GDH菌体,0.5mM NADH和250mM葡萄糖,通入空气,通气量2L/min,再加入氨水控制pH为8,温度30℃,反应24小时。反应结束后,液相检测L-PPT为388mM,产品L-草铵膦的e.e.值大于99%,L-PPT转化收率为97%。

[0128] 实施例8:双菌多酶去消旋制备L-草铵膦(含甲酸脱氢酶FDH辅酶循环体系)

[0129] 按照实施例2的方法培养能够表达D-氨基酸氧化酶菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T和能够表达L-氨基酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-FDH,离心收集菌体细胞并冻干。

[0130] 在1L反应器中,加入600mL的磷酸铵缓冲液(pH8.0,100mM),含有400mM D,L-PPT,8000U/L过氧化氢酶,5%(v/v)消泡剂,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T冻干菌体,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-FDH冻干菌体,0.5mM NADH和250mM甲酸铵,通入空气,通气量2L/min,氨水控制pH为8,温度30℃,反应24小时。反应结束后,液相检测L-PPT为382mM,产品L-草铵膦的e.e.值大于99%,L-PPT转化收率为95.5%。

[0131] 实施例9:双菌多酶去消旋制备L-草铵膦(醇脱氢酶ADH辅酶循环体系)

[0132] 按照实施例2的方法培养能够表达D-氨基酸氧化酶菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T和能够表达L-氨基酸脱氢酶和醇脱氢酶的表达菌株E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-ADH,离心收集菌体细胞并冻干。

[0133] 在1L反应器中,加入600mL反应液(氨水调节至pH8.0),含有400mM D,L-PPT,8000U/L过氧化氢酶,0.5%(v/v)消泡剂,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-DAAO F62K-M226T冻干菌体,20g/L E.coli BL21(DE3)/pET-28a-LAADH V91I-N168G-ADH冻干菌体,

0.5mM NADH和250mM异丙醇,通入空气,通气量2L/min,氨水控制pH为8,温度30℃,反应24小时。以实施例所示液相检测方法检测反应过程中D-草铵膦的消耗和L-草铵膦等的生成,反应进程曲线如图4所示。该图显示,随着时间的推移D-草铵膦的浓度逐渐降低,L-草铵膦的浓度逐渐升高。反应结束后,液相检测L-PPT为380mM,产品L-草铵膦的e.e.值大于99%,L-PPT转化收率为95%。

[0134] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 永农生物科学有限公司  
 [0003] 华东理工大学  
 [0004] 宁夏永农生物科学有限公司  
 [0005] <120> Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶突变体及其在制备L-草铵膦中的应用  
 [0006] <130> PD210084N  
 [0007] <160> 10  
 [0008] <170> PatentIn版本3.5  
 [0009] <210> 1  
 [0010] <211> 384  
 [0011] <212> PRT  
 [0012] <213> Microbotryum intermedium  
 [0013] <400> 1  
 [0014] Met Ser Ser Ser Thr Ser Ser Asp Lys Gln Val Val Val Ile Gly Ala  
 [0015] 1 5 10 15  
 [0016] Gly Val Ile Gly Leu Thr Ser Ala Leu Val Leu Ala Gln Ser Asn His  
 [0017] 20 25 30  
 [0018] Asn Val Thr Leu Val Ala Arg Asp Leu Pro Ser Asp Val Ser Ser Gln  
 [0019] 35 40 45  
 [0020] Ala Phe Ala Ser Pro Trp Ala Gly Ala Asn Trp Cys Pro Phe Val Asp  
 [0021] 50 55 60  
 [0022] Pro Gln Glu Ser Val Lys Asn Lys Arg Ile Cys Asp Trp Glu Thr Gln  
 [0023] 65 70 75 80  
 [0024] Ser Phe Ala Asn Phe Gln Gln Leu Ile Arg Glu His Gly Asp Gly Lys  
 [0025] 85 90 95  
 [0026] Leu Val Met Arg Leu Pro Ala Arg Arg Tyr Ala Glu Asn Glu Lys Ala  
 [0027] 100 105 110  
 [0028] Leu Leu Gly His Trp Tyr Lys Ser Val Val Pro Arg Tyr Ser Thr Leu  
 [0029] 115 120 125  
 [0030] Pro Ser Ser Glu Val Pro Asn Asn Gly Val Gly Val Glu Phe Glu Thr  
 [0031] 130 135 140  
 [0032] Ile Ser Val Asn Ala Pro Leu Tyr Cys Gln Trp Leu Glu Ala Gln Leu  
 [0033] 145 150 155 160  
 [0034] Leu Ser His Asn Ala Thr Ile Ile Arg Arg Ser Leu Asn Ser Leu Asp  
 [0035] 165 170 175  
 [0036] Glu Ala Leu Ser Leu Ala Pro Ser Cys Ser Val Ile Val Asn Ala Thr  
 [0037] 180 185 190  
 [0038] Gly Leu Gly Ala Lys Ser Leu Gly Gly Val Glu Asp Gln Thr Val Thr  
 [0039] 195 200 205  
 [0040] Pro Ile Arg Gly Gln Thr Val Leu Ile Lys Thr Asp Val Lys Leu Cys  
 [0041] 210 215 220

[0042]	Thr Met Asp Ala Ser Asp Pro Thr Lys Pro Ser Tyr Ile Ile Pro Arg
[0043]	225 230 235 240
[0044]	Pro Gly Gly Glu Ala Val Cys Gly Gly Cys Tyr Gly Leu Gly Glu Trp
[0045]	245 250 255
[0046]	Asn Leu Ser Thr Asp Thr Glu Leu Ala Lys Leu Ile Leu Glu Arg Cys
[0047]	260 265 270
[0048]	Leu Val Leu Asp Pro Arg Ile Ser Ser Asn Gly Ala Leu Asp Gly Ile
[0049]	275 280 285
[0050]	Glu Val Leu Arg His Asn Val Gly Leu Arg Pro Ser Arg Gly Thr Asn
[0051]	290 295 300
[0052]	Glu Pro Arg Leu Glu Ala Glu Arg Val Val Leu Pro Ser Tyr Ser Leu
[0053]	305 310 315 320
[0054]	Asn Pro His Arg Arg His Ala Leu Gly Ala Glu Gly Asn Ala Ala Thr
[0055]	325 330 335
[0056]	Val Ile His Ala Tyr Gly Val Gly Pro Ala Gly Tyr Gln Val Ser Trp
[0057]	340 345 350
[0058]	Gly Val Ala Asn Glu Val Lys Ala Leu Val Asp Glu His Phe Ala Lys
[0059]	355 360 365
[0060]	Phe Asp Thr Arg Thr Thr Gln Asp Gly Val His Arg Asp Ile Lys Leu
[0061]	370 375 380
[0062]	<210> 2
[0063]	<211> 398
[0064]	<212> PRT
[0065]	<213> <i>Lactobacillus buchneri</i>
[0066]	<400> 2
[0067]	Met Thr Leu Val Leu Ala Val Leu Thr Pro Ala Pro Val Ala Gly Pro
[0068]	1 5 10 15
[0069]	Pro Pro Leu Thr Val Ala Ala Ala Ile Pro Leu Ile Thr His Thr Pro
[0070]	20 25 30
[0071]	Ala Gly Ser Thr Val Pro Thr Pro Gly Gly Ile Ala Pro Leu Pro Gly
[0072]	35 40 45
[0073]	Gly Leu Leu Gly Ser Val Ser Gly Gly Leu Gly Leu Leu Leu Thr Leu
[0074]	50 55 60
[0075]	Gly Ser Leu Gly Val Gly Pro Val Val Thr Ser Ala Leu Gly Gly Pro
[0076]	65 70 75 80
[0077]	Ala Ser Val Pro Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ala Ala Val Val Ile Ser
[0078]	85 90 95
[0079]	Gly Pro Pro Thr Pro Ala Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ala Leu Ala
[0080]	100 105 110
[0081]	Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile Thr Ala Gly Ile Gly Ser Ala His Val
[0082]	115 120 125
[0083]	Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly His Ala Ile Thr Val Ala Gly Val Thr

[0084]	130	135	140
[0085]	Thr Ser Ala Ser Val Ser Val Ala Gly Ala Gly Val Met Gly Leu Leu		
[0086]	145	150	155 160
[0087]	Ala Leu Val Ala Ala Pro Ile Pro Ala His Ala Ile Val Leu Ala Gly		
[0088]		165	170 175
[0089]	Gly Thr Ala Ile Ala Ala Ala Val Ser Ala Ala Thr Ala Leu Gly Gly		
[0090]		180	185 190
[0091]	Met Thr Val Gly Val Ile Gly Ala Gly Ala Ile Gly Ala Ala Val Leu		
[0092]		195	200 205
[0093]	Gly Ala Leu Leu Pro Pro Gly Val Leu Leu Val Thr Ala Gly Ala His		
[0094]		210	215 220
[0095]	Gly Leu Pro Ala Gly Val Gly Ala Gly Leu Gly Leu Thr Thr Pro Pro		
[0096]		225	230 235 240
[0097]	Ala Val His Gly Met Val Leu Val Val Ala Ala Val Val Leu Ala Ala		
[0098]		245	250 255
[0099]	Pro Leu His Ala Gly Thr Thr His Leu Pro Ala Ala Gly Val Leu Ala		
[0100]		260	265 270
[0101]	Thr Met Leu Ala Gly Ala Thr Ile Val Ala Ala Ser Ala Gly Gly Gly		
[0102]		275	280 285
[0103]	Val Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Ala Leu Ala Ser Gly Gly Ile Gly		
[0104]		290	295 300
[0105]	Gly Thr Ser Gly Ala Val Thr Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Ala His		
[0106]		305	310 315 320
[0107]	Pro Thr Ala Thr Met Pro Ala Gly Ala Met Thr Pro His Met Ser Gly		
[0108]		325	330 335
[0109]	Thr Thr Leu Ser Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ile		
[0110]		340	345 350
[0111]	Leu Gly Ala Pro Leu Gly Ala Leu Pro Ile Ala Pro Gly Thr Leu Ile		
[0112]		355	360 365
[0113]	Ala Gly Gly Gly Ser Leu Ala Gly Thr Gly Ala Leu Ser Thr Thr Val		
[0114]		370	375 380
[0115]	Leu Leu Gly Gly Gly Thr Pro Gly Ser Gly Gly Ala Gly Leu		
[0116]		385	390 395
[0117]	<210> 3		
[0118]	<211> 262		
[0119]	<212> PRT		
[0120]	<213> <i>Exiguobacterium sibiricum</i>		
[0121]	<400> 3		
[0122]	Met Gly Thr Ala Ser Leu Leu Gly Leu Val Ala Ile Val Thr Gly Gly		
[0123]	1	5	10 15
[0124]	Ser Met Gly Ile Gly Gly Ala Ile Ile Ala Ala Thr Ala Gly Gly Gly		
[0125]		20	25 30

[0126] Met Ala Val Val Ile Ala Thr Ala Ser His Pro Gly Gly Ala Leu Leu  
 [0127] 35 40 45  
 [0128] Ile Ala Gly Ala Ile Leu Gly Ala Gly Gly Gly Ala Leu Thr Val Gly  
 [0129] 50 55 60  
 [0130] Gly Ala Val Ser Leu Gly Gly Ala Met Ile Ala Leu Val Leu Gly Thr  
 [0131] 65 70 75 80  
 [0132] Val Ala His Pro Gly Gly Leu Ala Val Pro Val Ala Ala Ala Gly Val  
 [0133] 85 90 95  
 [0134] Gly Met Pro Ser Pro Ser His Gly Met Ser Leu Gly Ala Thr Gly Leu  
 [0135] 100 105 110  
 [0136] Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Gly Ala Ala Gly Ala  
 [0137] 115 120 125  
 [0138] Leu Leu Thr Pro Val Gly His Ala Val Leu Gly Ala Ile Ile Ala Met  
 [0139] 130 135 140  
 [0140] Ser Ser Val His Gly Ile Ile Pro Thr Pro Thr Pro Val His Thr Ala  
 [0141] 145 150 155 160  
 [0142] Ala Ser Leu Gly Gly Val Leu Leu Met Thr Gly Thr Leu Ala Met Gly  
 [0143] 165 170 175  
 [0144] Thr Ala Pro Leu Gly Ile Ala Ile Ala Ala Ile Gly Pro Gly Ala Ile  
 [0145] 180 185 190  
 [0146] Ala Thr Pro Ile Ala Ala Gly Leu Pro Gly Ala Pro Leu Gly Ala Ala  
 [0147] 195 200 205  
 [0148] Ala Val Gly Ser Met Ile Pro Met Gly Ala Ile Gly Leu Pro Gly Gly  
 [0149] 210 215 220  
 [0150] Ile Ser Ala Val Ala Ala Thr Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Thr Val  
 [0151] 225 230 235 240  
 [0152] Thr Gly Ile Thr Leu Pro Ala Ala Gly Gly Met Thr Leu Thr Pro Ser  
 [0153] 245 250 255  
 [0154] Pro Gly Ala Gly Ala Gly  
 [0155] 260  
 [0156] <210> 4  
 [0157] <211> 252  
 [0158] <212> PRT  
 [0159] <213> Lactobacillus brevis  
 [0160] <400> 4  
 [0161] Met Ser Ala Ala Leu Ala Gly Leu Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr  
 [0162] 1 5 10 15  
 [0163] Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Thr Leu Pro Val Gly Gly Gly Ala  
 [0164] 20 25 30  
 [0165] Leu Val Met Ile Thr Gly Ala His Ser Ala Val Gly Gly Leu Ala Ala  
 [0166] 35 40 45  
 [0167] Leu Ser Val Gly Thr Pro Ala Gly Ile Gly Pro Pro Gly His Ala Ser

[0168]	50	55	60
[0169]	Ser Ala Gly Ala Gly Thr Thr Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gly Leu Ala		
[0170]	65	70	75 80
[0171]	Pro Gly Pro Val Ser Thr Leu Val Ala Ala Ala Gly Ile Ala Val Ala		
[0172]		85	90 95
[0173]	Leu Ser Val Gly Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu Ala		
[0174]		100	105 110
[0175]	Val Ala Leu Ala Gly Val Pro Pro Gly Thr Ala Leu Gly Ile Gly Ala		
[0176]		115	120 125
[0177]	Met Leu Ala Leu Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Ala Met Ser Ser Ile		
[0178]		130	135 140
[0179]	Gly Gly Pro Val Gly Ala Pro Ser Leu Gly Ala Thr Ala Ala Ser Leu		
[0180]		145	150 155 160
[0181]	Gly Ala Val Ala Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Leu Ala Cys Ala Leu		
[0182]		165	170 175
[0183]	Leu Ala Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Val His Pro Gly Thr Ile Leu		
[0184]		180	185 190
[0185]	Thr Pro Leu Val Ala Ala Leu Pro Gly Ala Gly Gly Ala Met Ser Gly		
[0186]		195	200 205
[0187]	Ala Thr Leu Thr Pro Met Gly His Ile Gly Gly Pro Ala Ala Ile Ala		
[0188]		210	215 220
[0189]	Thr Ile Cys Val Thr Leu Ala Ser Ala Gly Ser Leu Pro Ala Thr Gly		
[0190]		225	230 235 240
[0191]	Ser Gly Pro Val Val Ala Gly Gly Thr Thr Ala Gly		
[0192]		245	250
[0193]	<210> 5		
[0194]	<211> 434		
[0195]	<212> PRT		
[0196]	<213> <i>Delftia acidovorans</i>		
[0197]	<400> 5		
[0198]	Met Gln Gln Pro Ala Ser Ala Gly Val Thr Asn His Ala Ile Pro Ser		
[0199]	1	5	10 15
[0200]	Tyr Leu Gln Ala Asp His Leu Gly Pro Trp Gly Asn Tyr Leu Gln Gln		
[0201]		20	25 30
[0202]	Val Asp Arg Val Thr Pro Tyr Leu Gly His Leu Ala Arg Trp Val Glu		
[0203]		35	40 45
[0204]	Thr Leu Lys Arg Pro Lys Arg Ile Leu Ile Val Asp Val Pro Ile Glu		
[0205]		50	55 60
[0206]	Leu Asp Asn Gly Thr Ile Ala His Tyr Glu Gly Tyr Arg Val Gln His		
[0207]		65	70 75 80
[0208]	Asn Leu Ser Arg Gly Pro Gly Lys Gly Gly Val Arg Phe His Gln Asp		
[0209]		85	90 95

[0210]	Val Thr Leu Ser Glu Val Met Ala Leu Ser Ala Trp Met Ser Val Lys
[0211]	100 105 110
[0212]	Asn Ala Ala Val Asn Val Pro Tyr Gly Gly Ala Lys Gly Gly Ile Arg
[0213]	115 120 125
[0214]	Val Asp Pro Lys Thr Leu Ser Arg Gly Glu Leu Glu Arg Leu Thr Arg
[0215]	130 135 140
[0216]	Arg Tyr Thr Ser Glu Ile Gly Leu Leu Ile Gly Pro Ser Lys Asp Ile
[0217]	145 150 155 160
[0218]	Pro Ala Pro Asp Val Asn Thr Asn Gly Gln Ile Met Ala Trp Met Met
[0219]	165 170 175
[0220]	Asp Thr Tyr Ser Met Asn Thr Gly Ala Thr Ala Thr Gly Val Val Thr
[0221]	180 185 190
[0222]	Gly Lys Pro Val Asp Leu Gly Gly Ser Leu Gly Arg Val Glu Ala Thr
[0223]	195 200 205
[0224]	Gly Arg Gly Val Phe Thr Val Gly Val Glu Ala Ala Lys Leu Thr Gly
[0225]	210 215 220
[0226]	Leu Ser Val Gln Gly Ala Arg Ile Ala Val Gln Gly Phe Gly Asn Val
[0227]	225 230 235 240
[0228]	Gly Gly Thr Ala Gly Lys Leu Phe Ala Asp Val Gly Ala Lys Val Val
[0229]	245 250 255
[0230]	Ala Val Gln Asp His Thr Gly Thr Ile His Asn Ala Asn Gly Leu Asp
[0231]	260 265 270
[0232]	Val Pro Ala Leu Leu Ala His Val Ala Ala Lys Gly Gly Val Gly Gly
[0233]	275 280 285
[0234]	Phe Asp Gly Ala Glu Ala Met Asp Ala Ala Asp Phe Trp Ser Val Asp
[0235]	290 295 300
[0236]	Cys Asp Ile Leu Ile Pro Ala Ala Leu Glu Gly Gln Ile Thr Lys Glu
[0237]	305 310 315 320
[0238]	Asn Ala Gly Lys Ile Lys Ala Lys Met Val Ile Glu Gly Ala Asn Gly
[0239]	325 330 335
[0240]	Pro Thr Thr Thr Glu Ala Asp Asp Ile Leu Thr Glu Lys Gly Val Leu
[0241]	340 345 350
[0242]	Val Leu Pro Asp Val Leu Ala Asn Ala Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr
[0243]	355 360 365
[0244]	Phe Glu Trp Val Gln Asp Phe Ser Ser Phe Phe Trp Ser Glu Asp Glu
[0245]	370 375 380
[0246]	Ile Asn Ala Arg Leu Val Arg Ile Met Gln Asp Ala Phe Ala Ala Ile
[0247]	385 390 395 400
[0248]	Trp Gln Val Ala Gln Gln His Gly Val Thr Leu Arg Thr Ala Thr Phe
[0249]	405 410 415
[0250]	Ile Val Ala Cys Gln Arg Ile Leu His Ala Arg Glu Met Arg Gly Leu
[0251]	420 425 430

[0252] Tyr Pro  
 [0253] <210> 6  
 [0254] <211> 1155  
 [0255] <212> DNA  
 [0256] <213> *Microbotryum intermedium*  
 [0257] <400> 6  
 [0258] atgtcgtcaa gcacttcate cgacaagcaa gtcgtcgtca ttggtgctgg tgttattggc 60  
 [0259] ctcacgtcgg cgctcgttct cgcgcagtcg aaccacaacg tcaccctcgt cgctcgggat 120  
 [0260] ctcccctcgg atgtatcgtc ccaagcgttt gcctcacctt gggccggagc gaactggtgc 180  
 [0261] ccctttgtgg acccgcaaga atcggtaag aacaagagga tctgcgactg ggagacgcag 240  
 [0262] tcgttcgcaa acttcagca actcataaga gaacacggcg atggcaaact cgtcatgagg 300  
 [0263] cttccggcga ggagatacgc cgagaacgaa aaagccctcc tggggcattg gtacaaatca 360  
 [0264] gtcgtgccta gatactcgac cttgccctcg tccgaggtcc ccaacaacgg cgtcggcgtc 420  
 [0265] gaattcgaga ccatctcggg taacgcgccg ctctactgcc aatggctcga ggctcaactc 480  
 [0266] ttgtctcaca acgccaccat catccgccgc tcgctcaact ccctcgacga ggccttgtcg 540  
 [0267] ctcgcacctt cttgctcggg catcgtcaac gccaccgggc tcggcgccaa atcactcgga 600  
 [0268] ggagtcgagg atcagacggt caccctcacc cgagggcaga ccgtcttgat caagaccgac 660  
 [0269] gtcaagctgt gcactatgga tgcgtcagac cccacaaac cgtcctatat cattccgagg 720  
 [0270] ccagggggcg aggccgtttg tgggtggtgc tacggcctcg gggaatggaa tctctccacc 780  
 [0271] gatacggaac tggccaagct gattctcgaa cgatgcctgg tgctcgacc ccgcatctca 840  
 [0272] tccaatggtg cgcttgacgg catcgaagtg cttcgacaca atgtcgggct gcggccatca 900  
 [0273] cgaggcacga atgaaccag gctagaggcc gaacgagtcg tccttccttc ctattctttg 960  
 [0274] aaccctcacc gaaggcatgc gctcgggtca gagggcaacg ccgcgacggt cattcacgcc 1020  
 [0275] tacggggtcg ggccggcagg atatcaagtc agctgggggg tcgcgaacga ggtgaaagcg 1080  
 [0276] ctagtgcagc aacactcgc caagtttgac actcgaacga cccaagacgg cgtccaccgg 1140  
 [0277] gacattaaac tctag 1155  
 [0278] <210> 7  
 [0279] <211> 1197  
 [0280] <212> DNA  
 [0281] <213> *Lactobacillus buchneri*  
 [0282] <400> 7  
 [0283] atgaccaaag ttctggccgt gctgtatccg gatccggtgg atggttttcc gccgaaatat 60  
 [0284] gttcgtgatg atattccgaa aatcaccat tatccggatg gcagtaccgt tccgaccccg 120  
 [0285] gaaggcattg attttaaacc ggggtgaactg ctgggtagcg ttagtggcgg tctgggctg 180  
 [0286] aaaaaatc tgaaaagtaa aggtgtgaa tttgttgta ccagtataa agaaggccc 240  
 [0287] gatagtgtgt ttgaaaaga actgccgacc gccgatgtgg ttattagtca gccgttttgg 300  
 [0288] ccggctatc tgaccgaga tctgattgat aaagcaaaaa agctgaaact ggcaattacc 360  
 [0289] gccgtattg gcagcagca tgtggatctg aatgccgcca atgaacataa tattaccggt 420  
 [0290] gcagaagtga cctatagcaa tagtgtagt gttgcagaag cagaagtgat gcagctgctg 480  
 [0291] gccctggtgc gtaattttat tccggcacat gatattgtga aagccggtgg ctggaatatt 540  
 [0292] gcagatgcag ttagccgtgc ctatgatctg gaaggtatga ccgttggtgt gattggtgca 600  
 [0293] ggccgcattg gtcgtgccgt tctggaacgt ctgaaaccgt ttggcgtaa actggtgtat 660

[0294]	aatcagcgcc atcagctgcc ggatgaagtt gaaaatgaac tgggcctgac ctattttccg	720
[0295]	gatgttcatg aatggtgaa agttgtggat gccgttggtc tggcagcacc gctgcatgca	780
[0296]	cagacctatc atctgtttaa tgatgaagtt ctggccacca tgaaacgtgg cgcctatatt	840
[0297]	gtgaataata gccgcggcga agaagttgat cgcgatgcaa ttgttcgcgc actgaatagc	900
[0298]	ggcagattg gcggttatag tggcgatgtt tggtatccgc agccggcacc gaaagatcat	960
[0299]	ccgtggcgta ccatgccgaa tgaagcaatg accccgcata tgagtggcac caccctgagt	1020
[0300]	gcccaggcac gctatgccgc aggtgcacgt gaaattctgg aagattttct ggaagataaa	1080
[0301]	ccgattcgtc cggaatatct gattgccag ggtggtagtc tggccggtac cggtgccaaa	1140
[0302]	agttataccg tgaaaaaagg cgaagaaacc ccgggtagcg gcgaagcaga aaaataa	1197
[0303]	<210>	8
[0304]	<211>	789
[0305]	<212>	DNA
[0306]	<213>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>
[0307]	<400>	8
[0308]	atgggttata attctctgaa aggcaaagtc gcgattgtta ctggtggtag catgggcatt	60
[0309]	ggcgaagcga tcatccgtcg ctatgcagaa gaaggcatgc gcgttggtat caactatcgt	120
[0310]	agccatccgg aggaagccaa aaagatcgcc gaagatatta aacaggcagg tggatgaagcc	180
[0311]	ctgaccgtcc agggtgacgt ttctaaagag gaagacatga tcaacctggt gaaacagact	240
[0312]	gttgatcact tcggtcagct ggacgtcttt gtgaacaacg ctggcgttga gatgccttct	300
[0313]	ccgtcccacg aatgtccct ggaagactgg cagaaagtga tcgatgttaa tctgacgggt	360
[0314]	gcgttcctgg gcgctcgtga agctctgaaa tacttcgttg aacataacgt gaaaggcaac	420
[0315]	attatcaata tgtctagcgt ccacgaaatc atcccgtggc ctactttcgt acattacgct	480
[0316]	gcttctaagg gtggcgttaa actgatgacc cagactctgg ctatggaata tgcaccgaaa	540
[0317]	ggtatccgca ttaacgtat cggctccaggc gcgatcaaca ctccaattaa tgcagaaaaa	600
[0318]	ttcaggatc cgaaacagcg tgcagacgtg gaaagcatga tcccgatggg caacatcggc	660
[0319]	aagccagagg agatttccgc tgctcggcga tggctggctt ctgacgaage gtcttacgtt	720
[0320]	accggcatca ccctgttcgc agatgggtggc atgaccctgt acccgagctt tcaggctggc	780
[0321]	cgtggttga	789
[0322]	<210>	9
[0323]	<211>	759
[0324]	<212>	DNA
[0325]	<213>	<i>Lactobacillus brevis</i>
[0326]	<400>	9
[0327]	atgagcaacc gtctggacgg caaggtggcg atcattaccg gtggcacctt gggatttggg	60
[0328]	ctggcgattg cgaccaagtt cgtggaggaa ggtgcgaaag ttatgatcac cggccgtcac	120
[0329]	agcgacgtgg gcgagaaggc ggcgaaaagc gttggcacc cggaccagat tcaattcttt	180
[0330]	cagcacgata gcagcgacga ggatggttgg accaagctgt tcgatgcgac cgaaaaagcg	240
[0331]	tttgccccgg ttagcacctt ggttaacaac gcgggtattg cggatgaaca gagcgttgag	300
[0332]	gaaaccacca ccgcggagtg gcgtaaactg ctggcgggtga acctggatgg tgttttcttt	360
[0333]	ggcaccgctc tgggtatcca acgtatgaag aacaaagtc tgggcgcgag catcattaa	420
[0334]	atgagcagca ttgaaggttt cgttgggtgac ccgagcctgg gtgcgtacaa cgcgagcaag	480
[0335]	ggtgcggttc gtatcatgag caaaagcgcg gcgctggatt gcgcgctgaa ggactacgat	540

[0336] gtgcgtgtta acaccgtgca cccgggctat attaaaacc cgctggttga cgatctgccg 600  
[0337] ggtgcggagg aagcgatgag ccagcgtacc aagaccccga tgggtcacat cggcgaaccg 660  
[0338] aacgacatcg cgtacatttg cgtttatctg gcgagcaacg agagcaaatt cgcgaccggt 720  
[0339] agcgaatttg tggttgatgg tggctatacc gcgcaataa 759  
[0340] <210> 10  
[0341] <211> 1305  
[0342] <212> DNA  
[0343] <213> *Delftia acidovorans*  
[0344] <400> 10  
[0345] atgcagcaac ccgcttcggc cggcgttacc aaccacgcca tcccttccta cctgcaggcc 60  
[0346] gatcacctcg gcccttgggg caactacctg cagcaggtcg atcgcgtcac gccctacctg 120  
[0347] ggccatctcg cccgctgggt cgaaacctc aagcgcacca agcgcacccg gatcgtcgat 180  
[0348] gtgccgatcg agctggacaa cggcaccatc gccactacg aaggctaccg cgtgcagcac 240  
[0349] aacctgagcc gcggtcccgg caagggcggc gtgcgtttcc accaggacgt gaccctgtcc 300  
[0350] gaagtcattg ccctgtcggc ctggatgtcg gtcaagaacg cggccgtcaa cgtgccctat 360  
[0351] ggtggcgcca agggcggcat ccgtgtcgat cccaagacgc tgtcgcgcgg tgagctggag 420  
[0352] cgctgacgc gccgtacac cagcagatc ggctgtgta tcggcccctc caaggacatc 480  
[0353] cccgcgctg acgtcaacac caatggccag atcatggcct ggatgatgga cacgtactcc 540  
[0354] atgaacaccg gcgccaccgc caccggcgtg gtcacgggca agcccgtgga cctggggcgc 600  
[0355] tcgctgggccc gcgtcagagc caccggcgc ggcgtgttca ccgtgggctt ggaagcggcc 660  
[0356] aagctgaccg gcctgtcggc ccaggcgcgc cgcacgcgc tgcagggtt cggcaacgtg 720  
[0357] ggcggcacgg cgggcaagct gttcgcggac gtgggcgcca aggtcgtggc cgtgcaggac 780  
[0358] cacaccggca ccatccaaa cgccaatggc ctggacgtgc cggccctgct ggcccacgtg 840  
[0359] gctccaagg gcggcgtggg cggctttgac ggcccgagg ccatggacgc tgccgacttc 900  
[0360] tggagcgtgg actgcgacat cctgatcccc gccgcactgg aaggccagat caccaaggaa 960  
[0361] aacgccgca agatcaaggc caagatggtg atcagggcg ccaacggccc caccaccacc 1020  
[0362] gaggccgacg acatcctgac cgaaaaggc gtgctggtgc tgcccgatgt gctggccaat 1080  
[0363] gccggcggcg tgacggtgag ctacttcgaa tgggtgcagg acttctccag cttcttctgg 1140  
[0364] agcaggacg agatcaacgc ccgctggtg cgcacatgc aggacgctt cgcggccatc 1200  
[0365] tggcaggtcg cccagcagca cggcgtgacg ctgcgcaccg ccacctcat cgtggcctgc 1260  
[0366] cagcgcaccc tgcatgcgcg cgagatgcgg ggactgtatc cctga 1305

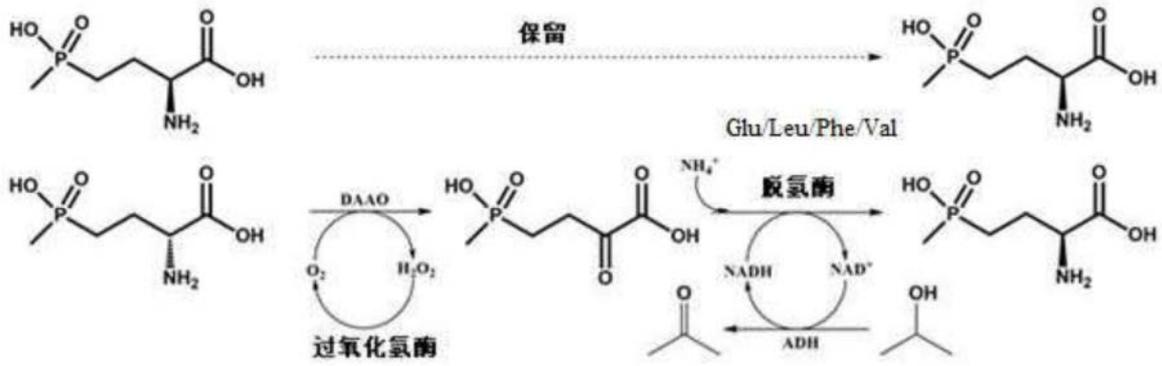


图1

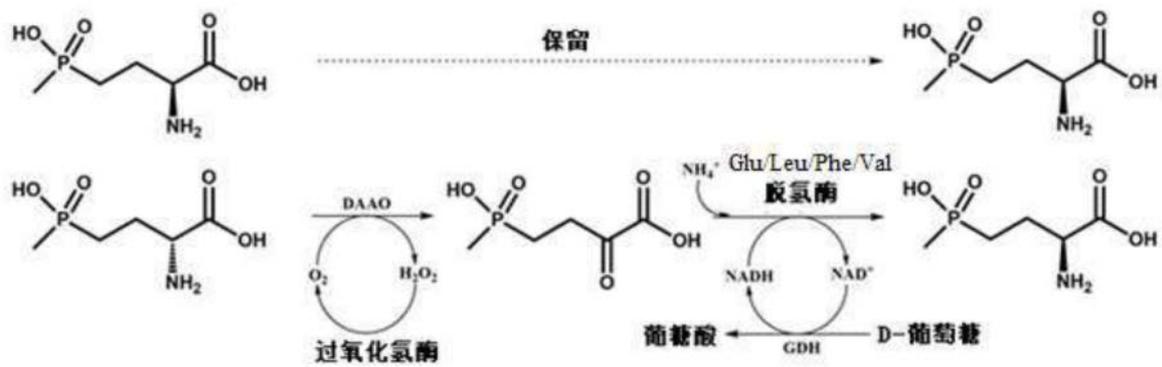


图2

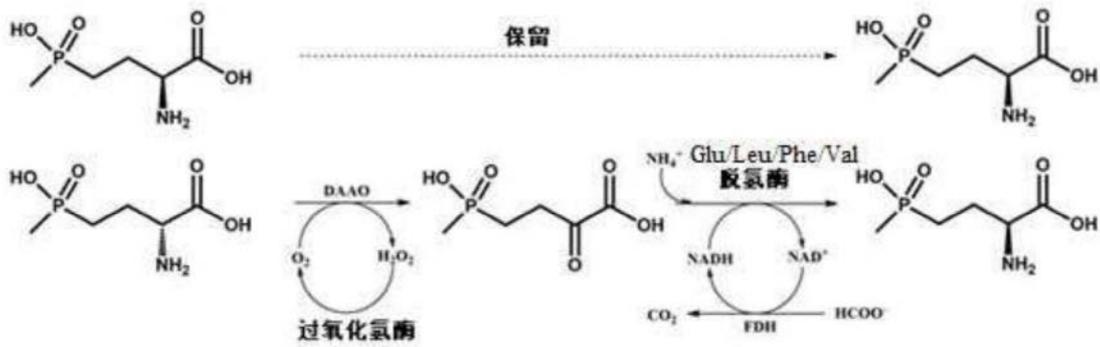


图3

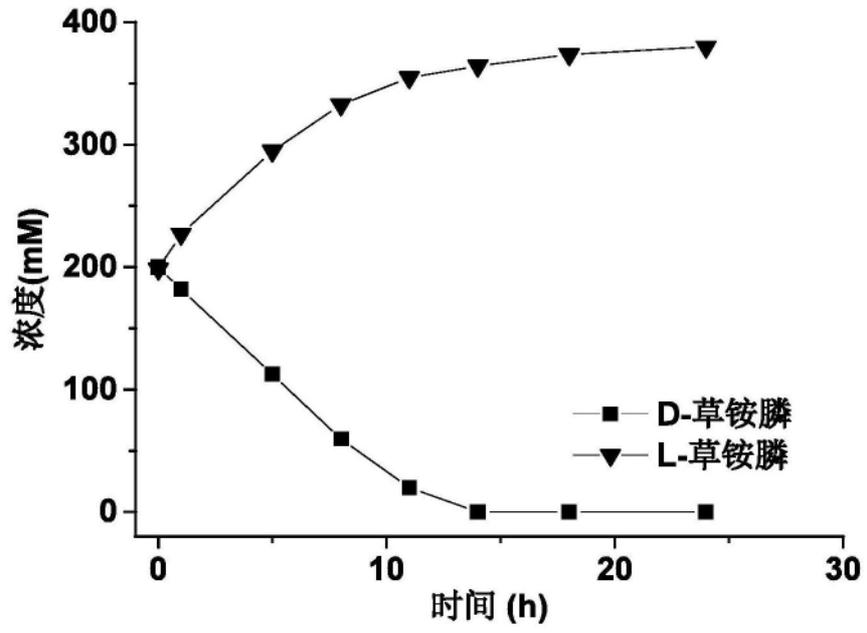


图4