



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112143764 B

(45) 授权公告日 2022.04.19

(21) 申请号 202011014184.9

(22) 申请日 2020.09.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112143764 A

(43) 申请公布日 2020.12.29

(73) 专利权人 奥锐特药业股份有限公司
地址 317200 浙江省台州市天台县八都工
业园区
专利权人 浙江工业大学

(72) 发明人 陈小龙 熊志刚 朱林江 褚定军
陆跃乐 冯佳程 马爽

(74) 专利代理机构 浙江千克知识产权代理有限
公司 33246
代理人 冷红梅

(51) Int.Cl.

C12P 17/10 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111154735 A, 2020.05.15

CN 108264495 A, 2018.07.10

审查员 王康

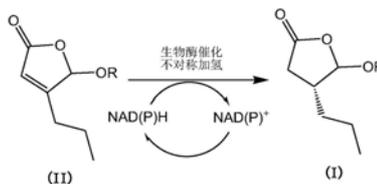
权利要求书2页 说明书13页
序列表8页 附图7页

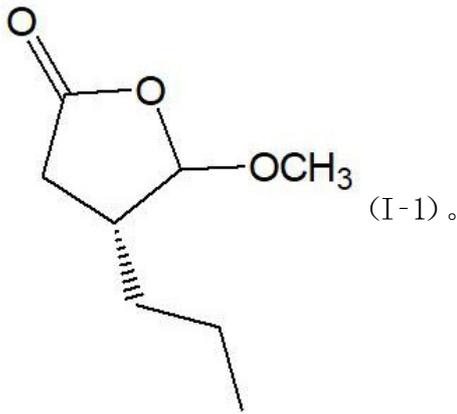
(54) 发明名称

一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法,所述布瓦西坦中间体化合物结构如式(I)所示,所述方法以化合物(II)为底物,以N-乙基马来酰亚胺还原酶为催化剂,经不对称加氢反应制得到化合物(I);所述N-乙基马来酰亚胺还原酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.6所示。本发明的有益效果主要体现在:(1)本发明选择化合物(II)作为布瓦西塔合成的手性中间体,其易于制备,且酶催化的加氢反应速率快,转化率高,易于进行下一步反应;(2)本发明使用采用N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR,可实现一步法的高效率和高对映体选择性生产化合物I,底物转化率>99%,对映体选择>98%。





7. 如权利要求3~5之一所述的方法,其特征在于所述发酵培养方法如下:

(1) 种子培养:将重组大肠杆菌接种在含50 mg/L卡那霉素的种子培养基中,30~37℃、180~250 rpm培养至对数生长中期,获得种子液;所述种子培养基终浓度组成:酵母粉3~6 g/L、蛋白胨5~10 g/L、 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6~10g/L、 KH_2PO_4 2~5 g/L、 NH_4Cl 2~4 g/L、 Na_2SO_4 0.5~1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3~1.0 g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0;

(2) 发酵培养:将种子液以体积浓度5~10%的接种量接种到含卡那霉素 50 mg/L的发酵培养基中,在30~37℃培养4~6 h后,加入终浓度为18~22g/L的 α -乳糖,在22~25℃继续发酵12~18h,得到发酵液,或者取发酵液离心,收集湿菌体细胞用pH7.5、50 mM Tris-HCl缓冲液重新悬浮,采用高压细胞匀浆仪破碎细胞后,得到粗酶液;所述发酵培养基质量终浓度组成:酵母粉10~15 g/L、蛋白胨10~20 g/L、甘油8~12 g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6~10 g/L、 KH_2PO_4 2~5 g/L、 NH_4Cl 1~4 g/L、 Na_2SO_4 0.2~1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.5 g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于所述种子培养基终浓度组成如下:酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.9 g/L、 KH_2PO_4 3.4 g/L、 NH_4Cl 2.67 g/L、 Na_2SO_4 0.71 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0;所述发酵培养基质量终浓度组成如下:酵母粉12g/L、蛋白胨15 g/L、甘油10 g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.9 g/L、 KH_2PO_4 3.4 g/L、 NH_4Cl 2.67 g/L、 Na_2SO_4 0.71 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0。

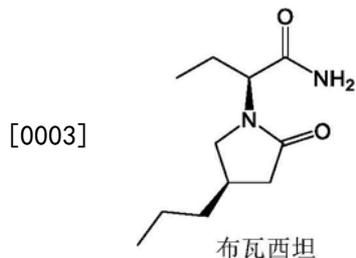
一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法,具体是采用N-乙基马来酰亚胺还原酶对布瓦西坦中间体进行不对称加氢的。

(二) 背景技术

[0002] 布瓦西坦(Brivaracetam)(化学名称为(2S)-2-[(4R)-2-氧代-4-丙基-1-吡咯烷基]丁酰胺,化学结构式如下图所示)是左乙拉西坦的结构衍生物,为比利时优时比(UCB)最新开发的第三代抗癫痫药物(商品名为Briviact[®])。能与突触囊泡糖蛋白2a结合,亲和力较左乙拉西坦强15~30倍,更有效地降低部分性癫痫发作的频率。分别于2016年1月和2月被欧洲EMA和美国FDA批准上市,用于治疗成人和16岁以上青少年癫痫患者的部分发作、伴有或不伴有继发全身发作的辅助治疗。据统计,2011-2015年间左乙拉西坦的平均年销售额超过10亿美元,预计布瓦西坦产品的应用前景较好。



[0004] 对布瓦西坦的合成方法已有较多研究,涉及化学法不对称合成、化学法手性拆分、酶法不对称合成和酶法手性拆分。原研药公司UCB的专利CN 1882535 B和发表的论文(Org.Process Res.Dev.2016,20,1566-1575)分别报道了化学合成法和酶法不对称拆分的应用。国内也有多种新的合成方法被陆续公开,如专利CN 106279074 B、CN 105646319 B、CN 106588741 B、CN 108503573 B、CN 108101824 A等的化学合成方法和CN 109266630 A、CN 109852644 A、CN 110358752 A等的酶法手性拆分。由于布瓦西坦存在两个手性中心,化学合成法往往涉及复杂的对映体分离与纯化,成本较高;酶法手性拆分具备温和条件,降低手性化合物纯化成本,但其理论转化率只有50%。

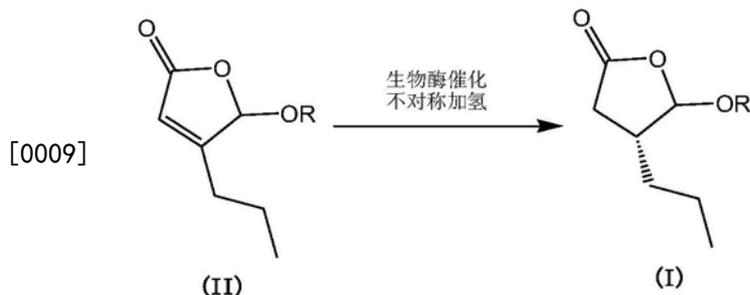
[0005] 近几年,生物酶法的不对称合成技术不断地被开发应用,其中碳碳双键(C=C)不对称加氢已被应用于一些工业产品的合成(Curr Opin Chem Biol 2018,43:97-105),具有反应条件温和,立体选择性好,催化活性高等特点。目前通过C=C酶法不对称加氢合成的布瓦西坦中间体也已有报道,例如(R)-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮(化合物III),其相关专利申请包括CN107604018A、CN109852644A、CN111154735A等。其中CN107604018A虽然公开了烯酮还原酶对底物4-正丙基咪喃-2(3H)-酮(化合物IV)的C=C不对称加氢而制备化合物III的应用,但是缺乏关键酶信息,实际应用效果未知;CN109852644A公开通过醇脱氢酶不对称还原5-羟基-4-丙基二氢咪喃-2(3H)-酮从而制备中间体化合物III;CN111154735A公开应用烯酮还原酶制备化合物III的方法,虽然公开了酶的相关信息和产物的对映体选择性,但是底物转化率未知。

(三) 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种生物酶催化高效制备布瓦西坦中间体化合物的方法。

[0007] 本发明采用的技术方案是：

[0008] 一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法，所述布瓦西坦中间体化合物结构如式 (I) 所示，其特征在于，所述方法以化合物 (II) 为底物，以N-乙基马来酰亚胺还原酶为催化剂，经不对称加氢反应制得到化合物 (I)；所述N-乙基马来酰亚胺还原酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.6所示；



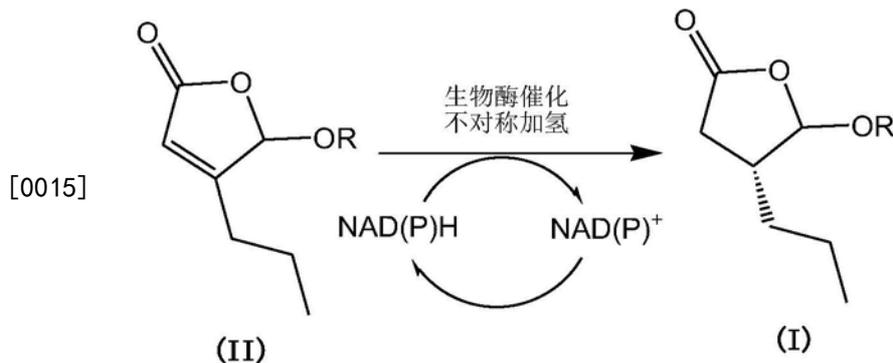
[0010] 上述N-乙基马来酰亚胺还原酶为源于宋氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、无丙二酸柠檬酸杆菌 (*Citrobacter amalonaticus*) 和弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 的N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR (NCBI登录号为Q3Z206)、camNEMR (NCBI登录号为QMD62121)、cfrNEMR (NCBI登录号为AHY13194)，将其克隆至大肠杆菌 (*Escherichia coli*)，可构建相应的重组大肠杆菌工程菌，用于后续生物酶催化反应。

[0011] 所述的N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5所示，编码氨基酸序列分别如SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6所示。

[0012] 与SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6中所示氨基酸序列 $\geq 90\%$ 同源性 (优选地， $\geq 95\%$ 的同源性；更优选地 $\geq 97\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 98\%$ 的同源性，如 $\geq 99\%$ 的同源性)、且具有N-乙基马来酰亚胺还原酶催化活性的多肽；以及将SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6中所示氨基酸序列经过1~5个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的多肽，均属于本发明保护的范围。

[0013] 式 (I)、(II) 中，所述R为C1~C8烷基，C2~C8烯基，C2~C8炔基，C3~C8环烷基，芳香基或芳杂基。

[0014] 优选的，所述不对称加氢反应以 NAD^+ 或 NADP^+ 为辅酶底物，以NAD(P) 依赖的脱氢酶及其底物为辅酶循环系统，在25~45℃、pH 7.0~9.0的条件下进行。



[0016] 具体的,所述NAD(P)依赖的脱氢酶为醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或甲酸脱氢酶,相对应的底物分别为异丙醇、葡萄糖或甲酸。

[0017] 具体的,所述方法是构建表达所述N-乙基马来酰亚胺还原酶的重组大肠杆菌,以重组大肠杆菌经发酵培养获得的发酵液或粗酶液为催化剂,以化合物(II)为底物,在25~40℃、pH7.0~9.0条件下反应10~24h,反应液经分离纯化获得所述化合物(I)。

[0018] 所述的重组大肠杆菌是将SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5所示的基因分别克隆到大肠杆菌宿主细胞而获得,具体可按如下方法构建:将SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5所述的N-乙基马来酰亚胺还原酶基因,交由基因合成公司进行人工合成,并要求克隆至大肠杆菌表达质粒,优选为克隆至表达pET28a上的BamHI和NdeI之间,分别获得重组表达质粒pET28a-shiNEMR、pET28a-camNEMR、pET28a-cfrNEMR,其中pET28a-shiNEMR的质粒结构如图2所示;将其转化到大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)中,得到重组大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)(pET28a-shiNEMR)、(E.coli)BL21(DE3)(pET28a-camNEMR)和(E.coli)BL21(DE3)(pET28a-cfrNEMR),将其命名为大肠杆菌(E.coli)IEF-shiNEMR、大肠杆菌(E.coli)IEF-camNEMR和大肠杆菌(E.coli)IEF-cfrNEMR。

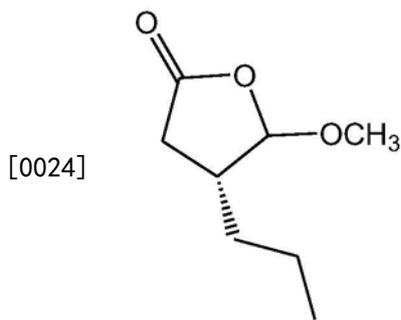
[0019] 或者,构建分别表达所述N-乙基马来酰亚胺还原酶和所述NAD(P)依赖的脱氢酶的重组大肠杆菌,以重组大肠杆菌经发酵培养获得的含有N-乙基马来酰亚胺还原酶的发酵液或粗酶液为催化剂,以NAD⁺或NADP⁺为辅酶底物,以重组大肠杆菌经发酵培养获得的含有NAD(P)依赖的脱氢酶的发酵液或菌悬液及NAD(P)依赖的脱氢酶底物为辅酶循环系统,在25~45℃、pH 7.0~9.0的条件下反应10~24h,反应液经分离纯化获得所述化合物(I)。

[0020] 又或者,构建同时表达所述N-乙基马来酰亚胺还原酶和所述NAD(P)依赖的脱氢酶的重组大肠杆菌,以重组大肠杆菌经发酵培养获得的发酵液或粗酶液为催化剂,以NAD⁺或NADP⁺为辅酶底物,并添加NAD(P)依赖的脱氢酶底物组成辅酶循环系统,在25~45℃、pH 7.0~9.0的条件下反应10~24h,反应液经分离纯化获得所述化合物(I)。

[0021] 具体的,所述的应用为:以重组大肠杆菌经发酵、收集细胞后经高压匀浆破碎后所得的酶液为催化剂,以化合物(II)为底物(优选5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮,即R=Me),以NAD⁺/NADP⁺为辅酶底物(优选NAD⁺),以葡萄糖/葡萄糖脱氢酶、异丙醇/醇脱氢酶或甲酸/甲酸脱氢酶辅酶循环(优选异丙醇/醇脱氢酶),构成反应体系,在25~45℃(优选30~35℃)、pH为7.0~9.0的条件下进行反应,获得含化合物(I)的反应液,分离纯化获得化合物(I)。所述反应体系:10~50g/L湿细胞破碎后所得的粗酶液中(优选20~30g/L湿细胞),加入底物化合物II终浓度为0.5~50g/L(优选10~20g/L),所述NAD⁺/NADP⁺终浓度为0.01~2mM(优选0.05~0.1mM),所述异丙醇终浓度为1~10%(v/v)(优选3~5%v/v),所述辅酶循环所用的醇脱氢酶酶液用量为反应总体的额10~30%(v/v)。

[0022] 进一步,反应控制25~40℃(优选30~35℃),反应过程控制pH7.0~9.0(优选7.5~8.5)之间,反应10~24h(优选12~60h)。

[0023] 优选的,所述布瓦西坦中间体化合物结构如式(I-1)所示:



[0025] 具体的,所述发酵培养方法如下:

[0026] (1) 种子培养:将重组大肠杆菌接种在含50mg/L卡那霉素的种子培养基中,30~37℃、180~250rpm培养至对数生长中期,获得种子液;所述种子培养基终浓度组成:酵母粉3~6g/L、蛋白胨5~10g/L、NaHPO₄·12H₂O 6~10g/L、KH₂PO₄ 2~5g/L、NH₄Cl 2~4g/L、Na₂SO₄ 0.5~1.5g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3~1.0g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0;

[0027] (2) 发酵培养:将种子液以体积浓度5~10%的接种量接种到含卡那霉素50mg/L的发酵培养基中,在30~37℃培养4~6h后,加入终浓度为18~22g/L(优选15g/L)的α-乳糖,在22~25℃继续发酵12~18h,得到发酵液,或者取发酵液离心,收集湿菌体细胞用pH7.5、50mM Tris-HCl缓冲液重新悬浮,采用高压细胞匀浆仪破碎细胞后,得到粗酶液;所述发酵培养基质量终浓度组成:酵母粉10~15g/L、蛋白胨10~20g/L、甘油8~12g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 6~10g/L、KH₂PO₄ 2~5g/L、NH₄Cl 1~4g/L、Na₂SO₄ 0.2~1.0g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1~0.5g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0。

[0028] 优选的,所述种子培养基终浓度组成如下:酵母粉5g/L、蛋白胨10g/L、NaHPO₄·12H₂O 8.9g/L、KH₂PO₄ 3.4g/L、NH₄Cl 2.67g/L、Na₂SO₄ 0.71g/L、MgSO₄·7H₂O 0.49g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0;所述发酵培养基质量终浓度组成如下:酵母粉12g/L、蛋白胨15g/L、甘油10g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 8.9g/L、KH₂PO₄ 3.4g/L、NH₄Cl 2.67g/L、Na₂SO₄ 0.71g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0。

[0029] 本发明的有益效果主要体现在:(1) 本发明选择化合物(II)作为布瓦西塔合成的手性中间体,其易于制备,且酶催化的加氢反应速率快,转化率高,易于进行下一步反应;(2) 本发明使用采用N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR,可实现一步法的高效率和高对映体选择性生产化合物I,底物转化率>99%,对映体选择>98%。

(四)附图说明

[0030] 图1为布瓦西坦手性中间体(化合物(I))制备的酶催化不对称加氢示意图。

[0031] 图2为重组质粒pET28a-shiNEMR的结构示意图。

[0032] 图3为烯酮还原酶表达的SDS-PAGE分析图。

[0033] 图4为底物化合物IV的GC分析图谱。

[0034] 图5为shiNEMR催化化合物IV不对称加氢生产化合物III的GC分析图谱。

[0035] 图6为底物5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮(化合物II,R=Me)的GC分析图谱。

[0036] 图7为NerA催化5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮(化合物II,R=Me)不对称加氢时的GC分析图谱。

[0037] 图8为shiNEMR催化5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮(化合物II,R=Me)不对称

加氢时的GC分析图谱。

[0038] 图9为shiNEMR催化5-甲氧基-4-正丙基呋喃-2(3H)-酮(化合物II,R=Me)不对称加氢反应终点时的GC分析图谱。

[0039] 图10为产物(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I,R=Me)的质谱分析图。

[0040] 图11为产物(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I,R=Me)的核磁分析图。

[0041] 图12为shiNEMR与1bADH共表达质粒的pET28a-shiNEMR-rbs-1bADH的结构示意图。

[0042] 图13为shiNEMR与1bADH共表达质粒的pET28a-shiNEMR-P-1bADH的结构示意图。

(五) 具体实施方式

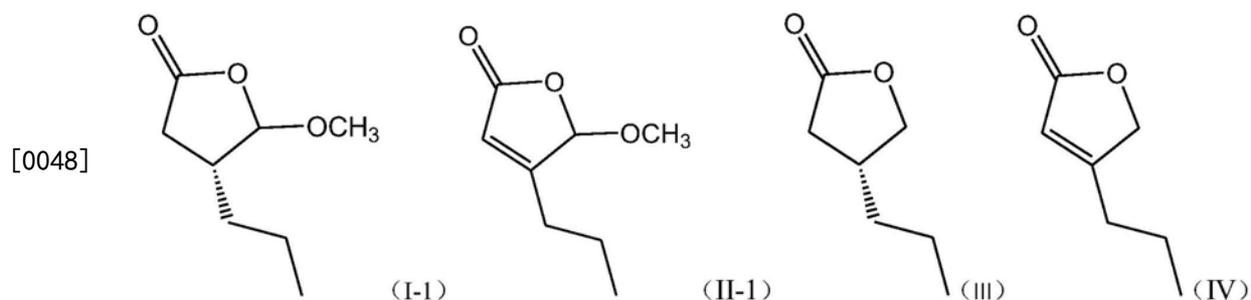
[0043] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0044] 本发明实施例中如无特殊说明所用方法均为常规方法,所用试剂均可从商业途径获得。

[0045] LB培养基:酵母粉5.0g/L,蛋白胨10g/L、NaCl 10g/L,溶剂为去离子水,pH7.0。

[0046] 大肠杆菌的种子培养基终浓度组成如下:酵母粉5g/L、蛋白胨10g/L、NaHPO₄·12H₂O 8.9g/L、KH₂PO₄ 3.4g/L、NH₄Cl 2.67g/L、Na₂SO₄ 0.71g/L、MgSO₄·7H₂O 0.49g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0;发酵培养基质量终浓度组成:酵母粉12g/L、蛋白胨15g/L、甘油10g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 8.9g/L、KH₂PO₄ 3.4g/L、NH₄Cl 2.67g/L、Na₂SO₄ 0.71g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3g/L,溶剂为去离子水,pH6.8~7.0。

[0047] 实施例1:构建C=C双键不对称加氢酶的重组大肠杆菌工程菌



[0049] 查阅文献并检索NCBI数据库,确定了17个候选的烯酮还原酶,其可能对底物4-正丙基呋喃-2(5H)-酮(化合物IV)和5-甲氧基-4-正丙基呋喃-2(3H)-酮(化合物II-1)具有C=C双键不对称加氢活性的酶,如表1所示。将这些酶对应的氨基酸序列发送给基因合成公司(华大基因青兰生物科技有限公司),人工合成基因,并克隆到表达载体pET28a的NdeI/BamHI之间,获得重组质粒,如pET28a-shiNEMR。

[0050] 将各个酶基因的重组质粒转化到表达宿主E.coli BL21(DE3)中,具体操作如下:取50ng的重组质粒,加入到100μL的E.coli BL21(DE3)感受态细胞中,轻弹管壁数下混匀,在冰水浴中放置30min。42℃热激45s,冰水孵育3min。加入900μL不含抗生素的LB培养基,37℃孵育60min使其抗性复苏。取50μL菌液,均匀涂布在含有50μg/mL卡那霉素的LB平板上。将平板倒置,于37℃过夜培养。挑取菌落PCR为阳性的克隆,经过划线纯化和摇床培养,提取质

粒,并酶切验证和测序验证,最终得到验证正确的阳性克隆子,获得各个酶的重组大肠杆菌工程菌,用于酶的表达和酶催化活性分析。

[0051] 实施例2:三角瓶摇瓶发酵酶的表达和酶活性分析

[0052] 实施例1制备重组大肠杆菌工程菌接种在含有50 μ g/m L卡那霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm培养至对数生长中期,获得新鲜培养的种子液。

[0053] 将新鲜培养的种子液以体积浓度5%的接种量接种到含卡那霉素50mg/L的大肠杆菌发酵培养基中,37 $^{\circ}$ C培养3h,加入终浓度为1.0mM IPTG,控制发酵温度25 $^{\circ}$ C,继续发酵6h,获得湿菌体的含量为5g/L的发酵液。

[0054] 离心发酵液,用pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液重新悬浮,采用高压细胞匀浆仪破碎细胞后,得到粗酶液,需尽快用于催化反应,避免长时间保存。

[0055] 取上述粗酶,用于SDS-PAGE电泳分析,确定C=C双键不对称加氢酶的诱导表达情况,结果如图3所示。

[0056] 酶对底物4-正丙基咪喃-2(5H)-酮(化合物IV)的催化活性分析:在上述的粗酶液中,先后加入终浓度为10.0mM NADH、2g/L的化合物IV,将上述反应液置于50mL的圆底烧瓶中,磁力搅拌,30 $^{\circ}$ C反应12h。在磁力搅拌的条件下,取样100 μ L反应液于1.0mL的乙酸乙酯中,15000 \times g离心5min,取上清用于气相色谱分析。气相色谱分析方法:毛细管色谱柱:DB1701 30m \times 0.53mm \times 1.5 μ m;柱温:50 $^{\circ}$ C,以15 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C,保温10min;进样口温度:230 $^{\circ}$ C;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;载气(N₂):5ml/min;分流比:20:1;进样量:1 μ L;空白溶液:乙酸乙酯。底物4-正丙基咪喃-2(5H)-酮(化合物IV)的GC图谱如图4所示,保留时间为7.23min;酶催化化合物IV进行不对称加氢反应生成产物(R)-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮(化合物III),其催化过程的GC图谱如图4所示,产物(化合物III)的保留时间为6.082min。

[0057] 酶对底物5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮的催化活性分析:在上述的粗酶液中,先后加入终浓度为10.0mM NADH、2g/L的化合物II-1,将上述反应液置于50mL的圆底烧瓶中,磁力搅拌,30 $^{\circ}$ C反应12h。在磁力搅拌的条件下,取样100 μ L反应液于1.0mL的乙酸乙酯中,15000 \times g离心5min,取上清用于气相色谱分析。气相色谱分析方法:毛细管色谱柱:DB1701 30m \times 0.53mm \times 1.5 μ m;柱温:50 $^{\circ}$ C,以15 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C,保温10min;进样口温度:230 $^{\circ}$ C;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;载气(N₂):5ml/min;分流比:20:1;进样量:1 μ L;空白溶液:乙酸乙酯。底物5-甲氧基-4-正丙基咪喃-2(3H)-酮的GC分析图谱如图6所示,其保留时间约为6.5min;部分酶催化其不对称加氢,产生了非对映异构体的产物,如NerA催化过程的GC分析图谱如图7,非对映异构体的产物的保留时间分别是5.797min和5.853min。这是由于产物5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮有两个手性中心,其中甲氧基位置为化学合成引入,而酶催化选择性决定了正丙基位置的对映体选择性,所以产生了非对映异构体。综合考虑不对称加氢的对映体选择性和催化效率,如表1所示,其中shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR这三个酶较理想,shiNEMR催化的反应液的GC分析图谱如图8所示,其目标产生(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮(化合物I-1)的保留时间约为5.9min。

[0058] 产物的对映体选择性的气相色谱分析方法:SUPELCO的色谱柱Beta Dex-225(30m \times 0.25mm,0.25 μ m),载气(H₂):2.5ml/min;进样口温度:220 $^{\circ}$ C;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;柱箱平衡时间:2.00min,初始温度:60 $^{\circ}$ C,以30 $^{\circ}$ C/min升温至100 $^{\circ}$ C,保温10min;以1.0 $^{\circ}$ C/min升温至140 $^{\circ}$ C,保温10min;保温10min;以15 $^{\circ}$ C/min升温至180 $^{\circ}$ C,保温10min;分流比30:1。

[0059] 表1:C=C双键不对称加氢酶的催化活性比较

酶的名称	来源	NCBI 登录号	对 2g/L 的底物化合物 IV 催化活性		对 2g/L 的底物化合物 II-1 催化活性	
			转化率%	ee 值%	转化率%	ee 值%
老黄酶 1	面包酵母	Q02899	30	98	53	99
老黄酶 2	面包酵母	Q03558	32	99	62	98
老黄酶 3	面包酵母	P41816	28	97	55	92
老黄酶	假丝酵母	AEP22541	48	99	75	96
老黄酶	哈萨克斯坦酵母	AEP22544	33	98	60	97
氧代植二烯酸还原酶 OPR1	番茄	Q9XG54	23	96	25	75
氧代植二烯酸还原酶 OPR3	番茄	Q9FEW9	18	94	20	76
氧代植二烯酸还原酶 ZeaOPR	玉米	Q49HE0	15	95	30	78
季戊四醇四硝酸酯还原酶 PETNR	阴沟肠杆菌	Q6JL81	52	98	76	92
N-乙基马来酰亚胺还原酶 NEMR	宋氏志贺菌	Q3Z206	65	99	86	98
老黄酶	运动发酵单胞菌	Q5NLA1	53	98	76	89
N-乙基马来酰亚胺还原酶 NEMR	无丙二酸柠檬酸杆菌	QMD62121	62	99	85	96
N-乙基马来酰亚胺还原酶 NEMR	弗氏柠檬酸杆菌	AHY13194	65	99	84	98
NADPH 脱氢酶 YqjM	枯草芽孢杆菌	P54550	12	99	10	99
N-乙基马来酰亚胺还原酶	铜绿假单胞菌	NP_250025	46	92	69	92
N-乙基马来酰亚胺还原酶	产酸克雷伯氏菌	AID90551	39	96	72	90
硝酸甘油还原酶 NerA	放射性农杆菌	CAA74280	28	90	55	78

[0060]

[0061] 实施例3:2.5L罐发酵制备N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR的粗酶

[0062] 1、发酵液催化活性的检测

[0063] 根据上述实施例2中的各个酶的活性比较分析表明,这17种烯酮还原酶对底物化合物IV的转化率偏低,不过对映体选择性较好;而对底物化合物II-1的转化率相对较好,但

对映体选择性则有所下降,其中宋氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)来源的N-乙基马来酰亚胺还原酶shiNEMR、camNEMR、cfrNEMR对底物化合物II-1的转化率较高(84%~86%)、产物的ee值也较高(96%~98%)。选择这三个酶对底物化合物II-1进行催化加氢反应。此外,来源于假丝酵母的老黄酶(NCBI登录号为AEP22541)(专利申请公开号CN111154735A)催化两个底物的转化率均不高。

[0064] 上述3个表达N-乙基马来酰亚胺还原酶(NEMR)(烯酮还原酶中的一类酶)的重组大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-shiNEMR)、*E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-camNEMR)、*E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-cfrNEMR)分别命名为*E. coli* IFE-shiNEMR、*E. coli* IFE-camNEMR、*E. coli* IFE-cfrNEMR。

[0065] 按照实施例1活化重组大肠杆菌*E. coli* IFE-shiNEMR、*E. coli* IFE-camNEMR、*E. coli* IFE-cfrNEMR分别接种在含有50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm培养至对数生长中期,获得新鲜培养的种子液。

[0066] 2.5L发酵罐中发酵制备shiNEMR、camNEMR和cfrNEMR的发酵液:将新鲜培养的种子液以体积浓度5%的接种量接种到含卡那霉素50mg/L的大肠杆菌发酵培养基中,30 $^{\circ}$ C培养4h,加入终浓度为10g/L α -乳糖,控制发酵温度23 $^{\circ}$ C,溶解氧DO控制大于20%,用25%的氨水控制发酵pH6.8,继续发酵12h,获得湿菌体含量为30g/L的发酵液,记为NEMR发酵液。

[0067] 离心发酵液,用pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液重新悬浮,采用高压细胞匀浆仪破碎细胞后,得到NEMR粗酶液,需尽快用于催化反应,避免长时间保存。

[0068] 实施例4:NEMR粗酶液在制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)中的应用

[0069] 1、粗酶液酶活检测

[0070] 将实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体细胞5.0g重新悬浮于50mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度10mM NADH和2g/L的底物化合物II-1,构成100ml反应体系,再次调整pH为7.5。反应体系在30 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌催化反应5h,反应液用于GC分析,产物化合物I-1的浓度为0.8g/L。酶活检测结果为正常。

[0071] GC分析方法如下:在磁力搅拌的条件下,取100 μ L反应液,加入1.0mL的乙酸乙酯中,12000 \times g离心5min,取上层乙酸乙酯层,用于GC分析。毛细管色谱柱:DB1701 30m \times 0.53mm \times 1.5 μ m;柱温:50 $^{\circ}$ C,以15 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C,保温10min;进样口温度:230 $^{\circ}$ C;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;载气(N₂):5ml/min;分流比:20:1;进样量:1 μ L;空白溶液:乙酸乙酯。

[0072] 2、制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)

[0073] 取实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体60g,重新悬浮于100mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入NADH,加入底物化合物II-1,定容至200mL,即湿菌体细胞含量为30g/L,底物化合物II-1的终浓度20g/L,NADH终浓度为20mM,再次调节反应pH7.5,在30 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌,催化反应16h,取样用于GC分析,其催化终点的GC图谱如图9所示。将该产物进行乙酸乙酯萃取、脱水、硅胶柱分离纯化等步骤进行用于质谱与核磁的鉴定,如图10和图11所示,结果证实目的产物结构正确。

[0074] 结果表明,由发酵罐制备deshiNEMR、camNEMR和cfrNEMR粗酶液,可以高效催化底

物化合物II-1的不对称加氢,制备得到(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)。与现有公开的方法(CN107604018A、CN109852644A、CN111154735A)相比,其优点是底物化合物II-1的转化率大于99%,可有效减少下游产物纯化的负担。

[0075] 实施例5:构建辅酶循环系统的重组大肠杆菌

[0076] (1)选择合适的辅酶循环系统

[0077] 应用辅酶NADH的循环系统,不需要使用价格昂贵的NADH原料,改用价格相对较低的NAD为原料,且用量显著下降,从而降低生产成本。选择3种辅酶循环系统,如图表2所示。将这3个酶对应的氨基酸序列发送给基因合成公司(华大基因青兰生物科技有限公司),人工合成辅酶循环基因(SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10),克隆到表达载体pET28a的NdeI/BamHI之间,获得辅酶循环的重组质粒pET28a-1bADH、pET28a-bsGDH和pET28a-psFDH。将以上重组质粒分别转化到E.coli BL21(DE3)菌株中,得到表达辅酶循环系统的重组大肠杆菌E.coli BL21(DE3)(pET28a-1bADH)、E.coli BL21(DE3)(pET28a-bsGDH)和E.coli BL21(DE3)(pET28a-psFDH),将其分别命名为E.coli IEF-1bADH、E.coli IEF-bsGDH和E.coli IEF-psFDH。

[0078] 表2:选择的辅酶循环系统

酶名称	来源	NCBI 登录号	底物	副产物
醇脱氢酶 1bADH	短乳杆菌	WP_011668302	异丙醇	丙酮
葡萄糖脱氢酶 bsGDH	枯草芽孢杆菌	NP_388275.1	葡萄糖	葡萄糖酸
甲酸脱氢酶 psFDH	假单胞菌	P33160.3	甲酸	CO ₂

[0080] (2)辅酶循环系统粗酶液的制备

[0081] 取新鲜活化的重组大肠杆菌E.coli IEF-1bADH、E.coli IEF-bsGDH和E.coli IEF-psFDH分别接种在含有50μg/mL卡那霉素的LB培养基中,37℃,200rpm培养至对数生长期,获得新鲜培养的种子液。

[0082] 2.5L发酵罐中发酵制备1bADH、bsGDH和psFDH的发酵液:将新鲜培养的种子液以体积浓度5%的接种量接种到含卡那霉素50mg/L的大肠杆菌发酵培养基中,30℃培养4h,加入终浓度为10g/Lα-乳糖,控制发酵温度23℃,溶解氧DO控制大于20%,用25%的氨水控制发酵pH6.8,继续发酵12h,获得湿菌体含量为30g/L的发酵液,记为NEMR发酵液。

[0083] 离心发酵液,用pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液重新悬浮,采用高压细胞匀浆仪破碎细胞后,得到用于辅酶循环的粗酶液,需尽快用于催化反应,避免长时间保存。

[0084] 实施例6:催化条件优化

[0085] (1)按下述操作制备5份催化液:将实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体细胞50.0g;实施例5方法制备的1bADH发酵液离心,取湿菌体细胞10.0g;将两种湿菌体细胞重新悬浮于150mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度为100μM NAD、5%(v/v)的异丙醇、20g/L的底物化合物II-1,用去离子水补足200ml。将这5份催化液分别调整pH为6.0、7.0、7.5、9.0、10.0。反应体系在30℃水浴锅中,磁力搅拌催化反应12h,反应液用于GC分析,结果如下表所示:

[0086]	pH	转化率(%)	ee值(%)
	6.0	95.2	97.3
	7.0	98.9	98.1
	7.5	99.1	98.2
	9.0	98.1	98.0
	10.0	90.2	89.4

[0087] 结果表明,pH7.0~9.0的条件下,可获得较高的转化率,且产物ee值大于98%。

[0088] (2)按下述操作制备5份催化液:将实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体细胞50.0g;实施例5方法制备的1bADH发酵液离心,取湿菌体细胞10.0g;将两种湿菌体细胞重新悬浮于150mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度为100 μ M NAD、5% (v/v)的异丙醇、20g/L的底物化合物II-1,用去离子水补足200ml,调整pH为7.5。5份催化液分别在20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌催化反应12h,反应液用于GC分析,结果如下表所示:

[0089]	温度($^{\circ}$ C)	转化率(%)	ee值(%)
	20	88.6	85.4
	25	92.3	95.1
	30	99.2	98.3
	40	99.3	99.2
	45	99.5	97.3

[0090] 结果表明,在温度30~40 $^{\circ}$ C的条件下,可获得较高的转化率,且产物ee值大于98%。

[0091] 实施例7:应用shiNEMR粗酶液与辅酶循环系统粗酶液混合制备制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮(化合物I-1)

[0092] (1)shiNEMR与1bADH混合制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮

[0093] 将实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体细胞50.0g;实施例5方法制备的1bADH发酵液离心,取湿菌体细胞10.0g;将两种湿菌体细胞重新悬浮于150mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度为100 μ MNAD、5% (v/v)的异丙醇、20g/L的底物化合物II-1,用去离子水补足200ml,再次调整pH为7.5。反应体系在30 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌催化反应12h,反应液用于GC分析,结果表明底物化合物II-1不可测,即转化率大于99%,且产物ee值大于98%。

[0094] (2)shiNEMR与bsGDH混合制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮

[0095] 将实施例3方法制备的shiNEMR发酵液离心,取湿菌体细胞50.0g;实施例5方法制备的bsGDH发酵液离心,取湿菌体细胞10.0g;将两种湿菌体细胞重新悬浮于120mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度为100 μ M NAD、20%的葡萄糖、20g/L的底物化合物II-1,用去离子水补足200ml。采用2M NaOH对反应液进行自动滴定,控制反应液pH \geq 7.5。反应体系在30 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌催化反应15h,反应液用于GC分析,结果表明底物化合物II-1不可测,即转化率大于99%,且产物ee值大于98%。

[0096] (3)shiNEMR与psFDH混合制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢咪喃-2(5H)-酮

[0097] 将实施例3方法制备的NEMR发酵液离心,取湿菌体细胞50.0g;实施例5方法制备的

psFDH发酵液离心,取湿菌体细胞10.0g;将两种湿菌体细胞重新悬浮于150mL的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中,用高压匀浆仪将菌体破碎,加入终浓度为100 μ MNAD、0.3M的甲酸钠、20g/L的底物化合物II-1,用去离子水补足200ml。采用1M甲酸水溶液对反应液进行自动滴定,控制反应液pH \leq 7.5。反应体系在30 $^{\circ}$ C水浴锅中,磁力搅拌催化反应20h,反应液用于GC分析,结果表明底物化合物II-1不可测,即转化率大于99%,且产物ee值大于98%。

[0098] 三种辅酶系统的比较结果表明:(1)三种辅酶系统均能与NEMR的不对称加氢反应偶联,底物化合物II-1的转化率可达 $>99\%$;(2)相比之下,依赖于1bADH的辅酶循环系统的催化反应时间最短,应用效果最佳,这可能与异丙醇促溶效果相关。

[0099] 实施例8:构建NEMR与辅酶循环系统共表达的重组大肠杆菌

[0100] (1)设计NEMR与辅酶循环系统共表达体系。3种NEMR酶均可以与3种辅酶循环系统构建共表达体系。现选择shiNEMR和1bADH建立共表达体系为例:即在pET28a-shiNEMR的质粒上,再加上1bADH的读码框结构,从而实现共表达。选择采用两种方案进行共表达,包括:
①将shiNEMR和1bADH两个基因置于一个T7启动子之下,即在shiNEMR的终止密码子之后添加rbs+1bADH的基因片段,构建重组质粒pET28a-shiNEMR-rbs-1bADH,其结构如图12所示;
②shiNEMR和1bADH分别由T7启动子启动转录,即在shiNEMR的终止密码子之后添加T7启动子+rbs+1bADH的基因片段,构建重组质粒pET28a-shiNEMR-P-1bADH,其结构如图13所示。

[0101] (2)共表达体系的重组质粒构建

[0102] ①rbs+1bADH的PCR扩增:以pET28a-1bADH质粒为DNA模板,rbs-1bADH-F/1bADH-R为引物,采用南京诺唯赞生物科技有限公司(Vazyme Biotech Co.,Ltd)的高效保真酶Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase进行PCR扩增得到lrsp基因,其PCR扩增程序为:95 $^{\circ}$ C30s;95 $^{\circ}$ C15s、58 $^{\circ}$ C15s、72 $^{\circ}$ C1.0min,30个循环;72 $^{\circ}$ C5min;4 $^{\circ}$ C保存。用DNA胶回收试剂盒纯化PCR产物rbs-ADH。

[0103] rbs-1bADH-F:ctaccctgtaaggatccgaattcaataatTTTTgtttaaactttaa

[0104] 1bADH-R:tgctcgagtgccgcccgaagcttttactgcgcggtataaccgcca

[0105] ②P-1bADH的PCR扩增:以pET28a-1bADH质粒为DNA模板,P-1bADH-F/1bADH-R为引物,采用南京诺唯赞生物科技有限公司(Vazyme Biotech Co.,Ltd)的高效保真酶Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase进行PCR扩增得到lrsp基因,其PCR扩增程序为:95 $^{\circ}$ C30s;95 $^{\circ}$ C15s、58 $^{\circ}$ C15s、72 $^{\circ}$ C1.0min,30个循环;72 $^{\circ}$ C5min;4 $^{\circ}$ C保存。用DNA胶回收试剂盒纯化PCR产物P-1bADH。

[0106] P-1bADH-F:ctaccctgtaaggatccgaattctctcgatcccgcgaaattaata

[0107] 1bADH-R:tgctcgagtgccgcccgaagcttttactgcgcggtataaccgcca

[0108] ③构建共表达质粒pET28a-shiNEMR-rbs-1bADH:提取质粒pET28a-shiNEMR,经过EcoRI/HindIII酶切后,采用DNA胶回收试剂盒回收线性化的质粒p43NMK;将已纯化的rbs-1bADH的PCR产物与线性化的pET28a-shiNEMR进行重组连接反应:采用南京诺唯赞生物科技有限公司的一步克隆试剂盒One Step Cloning Kit(根据试剂盒说明书操作),转化E.coli BL21 (DE3)的高效感受态细胞中,在含终浓度50mg/L卡那霉素的LB平板上筛选。菌落PCR验证阳性克隆子,并提取质粒进行测序分析。阳性克隆子含有的重组表达载体命名为pET28a-shiNEMR-rbs-1bADH(图12所示),所得的重组工程菌为E.coli BL21 (DE3) (pET28a-shiNEMR-rbs-1bADH),命名为E.coli IEF-SHIRL。

[0109] ④构建共表达质粒pET28a-shiNEMR-P-1bADH:提取质粒pET28a-shiNEMR,经过EcoRI/HindIII酶切后,采用DNA胶回收试剂盒回收线性化的质粒pET28a-shiNEMR;将已纯化的P-1bADH的PCR产物与线性化的pET28a-shiNEMR进行重组连接反应:采用南京诺唯赞生物科技有限公司的一步克隆试剂盒One Step Cloning Kit(根据试剂盒说明书操作),转化E.coli BL21 (DE3)的高效感受态细胞中,在含终浓度50mg/L卡那霉素的LB平板上筛选。菌落PCR验证阳性克隆子,并提取质粒进行测序分析。阳性克隆子含有的重组表达载体命名为pET28a-shiNEMR-P-1bADH(图13所示)。所得的重组工程菌为E.coli BL21 (DE3) (pET28a-shiNEMR-P-1bADH),命名为E.coli IEF-SHIPL。

[0110] 实施例9:共表达重组大肠杆菌IEF-SHIRL菌剂和重组大肠杆菌IEF-SHIPL菌剂在生产(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)中的应用

[0111] (1) 菌种活化

[0112] 将新鲜活化的重组大肠杆菌IEF-SHIRL和重组大肠杆菌IEF-SHIPL过夜培养液,按5%(v/v)接种量接种到含有50 μ g/mL卡那霉素的种子培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm培养3h至对数生长中期,获得种子液。

[0113] (2) 2.5L发酵罐中的催化剂制备

[0114] 将新鲜培养的种子液按体积浓度5%的接种量,接种到1.0L的含质量浓度0.05%消泡剂和50mg/L卡那霉素的大肠杆菌发酵培养基中,32 $^{\circ}$ C培养4.5h;加入终浓度为15g/L的 α -乳糖,控制发酵温度24 $^{\circ}$ C,溶解氧DO控制大于20%,用25%的氨水控制发酵pH6.8,开始以17mL/min恒速补料400mL的甘油溶液(甘油200g/L,生物素4.5mg/L,MgSO₄·7H₂O 10g/L,溶剂为去离子水),补料发酵15h,得到重组大肠杆菌的发酵液,湿菌体含量为70g/L。

[0115] (3) 重组大肠杆菌IEF-SHIRL催化转化制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)

[0116] 取上述制备的重组大肠杆菌IEF-SHIRL发酵液,离心收集湿菌体20g,重新悬浮于450mL去离子水中,用高压匀浆仪破碎细胞得到细胞破碎液,加入25mL异丙醇(终浓度5%,v/v),加入0.033g的NAD(终浓度100 μ M),加入10g底物化合物II-1(终浓度5g/L),加去离子水补足至500mL,采用磁力搅拌,在30 $^{\circ}$ C条件下进行催化反应,反应20h后得到含化合物I-1的催化液。取样进行GC分析,结果表明底物化合物II-1已全部转化,且产物ee值大于98%。

[0117] (4) 重组大肠杆菌IEF-SHIPL催化转化制备(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)

[0118] 取上述制备的重组大肠杆菌IEF-SHIPL发酵液,离心收集湿菌体15g,重新悬浮于450mL去离子水中,用高压匀浆仪破碎细胞得到细胞破碎液,加入25mL异丙醇(终浓度5%,v/v),加入0.033g的NAD(终浓度100 μ M),加入10g底物化合物II-1(终浓度5g/L),加去离子水补足至500mL,采用磁力搅拌,在30 $^{\circ}$ C条件下进行催化反应,反应18h后得到含化合物I-1的催化液。取样进行GC分析,结果表明底物化合物II-1已全部转化,且产物ee值大于98%。

[0119] 取样GC分析方法如下:在磁力搅拌的条件下,取100 μ L反应液,加入1.0mL的乙酸乙酯中,12000 \times g离心5min,取上层乙酸乙酯层,用于GC分析。毛细管色谱柱:DB1701 30m \times 0.53mm \times 1.5 μ m;柱温:50 $^{\circ}$ C,以15 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C,保温10min;进样口温度:230 $^{\circ}$ C;检测器温度:240 $^{\circ}$ C;载气(N₂):5ml/min;分流比:20:1;进样量:1 μ L;空白溶液:乙酸乙酯。

[0120] 产物对映体选择性分析:SUPELCO的色谱柱Beta Dex-225(30m \times 0.25mm,0.25 μ m),

载气(H₂):2.5ml/min;进样口温度:220℃;检测器温度:240℃;柱箱平衡时间:2.00min,初始温度:60℃,以30℃/min升温至100℃,保温10min;以1.0℃/min升温至140℃,保温10min;保温10min;以15℃/min升温至180℃,保温10min;分流比30:1。

[0121] 采用重组大肠杆菌IEF-SHIRL或IEF-SHIPL,经18~20h小时催化,可转换生成产物(R)-5-甲氧基-4-正丙基二氢呋喃-2(5H)-酮(化合物I-1)浓度为16.5g/L,底物化合物II-1不可测,即转化率为100%。与现有公开的技术(Org.Process Res.Dev.2016,20,1566-1575、CN107604018A、CN109852644A、CN111154735A)相比,本发明方法的优点是:①采用不对称加氢制备手性中间体,可实现底物100%的利用;②底物转化率高,即底物化合物II-1实现100%转化;③不对称加氢反应的对映体选择高,产物ee值大于98%。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 奥锐特药业股份有限公司
- [0003] 浙江工业大学
- [0004] <120> 一种生物酶催化制备布瓦西坦中间体化合物的方法
- [0005] <160> 9
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1098
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 宋氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)
- [0011] <400> 1
- [0012] atgtettccg aaaagetgta ctctccgctg aaagtgggtg cgatcaccgc tgcgaaccgt 60
- [0013] attttcatgg cgccactgac ccgtctgctg tccatcgaac cgggtgatat tccgaccccg 120
- [0014] ctgatggcgg aatattaccg tcaacgtgca tccgcgggtc tgattatctc tgaagccacc 180
- [0015] cagatctctg cgcaggcaaa aggttatgca ggcgaccgg gtatccactc tcctgaacag 240
- [0016] attgccgctg ggaaaaaat cactgcgggc gtgcatgcag aaaacgggtca catggctgtt 300
- [0017] cagctgtggc aactggccg catttctcac gtttcctgc aaccaggtgg tcaggctcct 360
- [0018] gttgcaccaa gcgctctgag cgcaggtacc cgtacttctc tgcgtgacga aaatggccag 420
- [0019] gccatccgtg ttgaaacctc catgccgcgc gactggaac tggaagaaat cccgggtatc 480
- [0020] gtgaacgact ttcgtcaggc gattgcgaac gcgctggaag ctggttttga cctggttgaa 540
- [0021] ctgcaactctg cgcacggcta cctgctgcac cagtctctgt ctccgtctag caaccatcgc 600
- [0022] accgatcagt atggtggttc cgttgaaaac cgtgcccgtc tggttctgga agttgttgat 660
- [0023] gcgggtattg aagaatgggg cgcggatcgt atcggtatc gtgtttcccc gatcgggtacc 720
- [0024] ttccagaata ccgataatgg tccgaacgag gaagctgacg cgctgtacct gatcgagcag 780
- [0025] ctgggtaaac gcggcatcgc atatctgcac atgtctgacg cagattgggc ggggtggcgaa 840
- [0026] ccatacaccg acgctttccg tgaaaaagt cgtgcgcgct tccacggccc tateatcggt 900
- [0027] gcgggtgctt atacggtcga gaaagcggaa accctgattg gtaaaggctc gatcgatgag 960
- [0028] gtggcattcg gccgtgactg gattgcgaac ccgatctgg ttgcgcgtct gcaacgtcgc 1020
- [0029] gcgaactga accacaacg tgcagaatct ttctacggtg gtggcgcgga aggctacact 1080
- [0030] gactaccgca cgctgtaa 1098
- [0031] <210> 2
- [0032] <211> 365
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> 宋氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)
- [0035] <400> 2
- [0036] Met Ser Ser Glu Lys Leu Tyr Ser Pro Leu Lys Val Gly Ala Ile Thr
- [0037] 1 5 10 15
- [0038] Ala Ala Asn Arg Ile Phe Met Ala Pro Leu Thr Arg Leu Arg Ser Ile
- [0039] 20 25 30
- [0040] Glu Pro Gly Asp Ile Pro Thr Pro Leu Met Ala Glu Tyr Tyr Arg Gln
- [0041] 35 40 45

[0042]	Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ser Glu Ala Thr Gln Ile Ser Ala
[0043]	50 55 60
[0044]	Gln Ala Lys Gly Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Ile His Ser Pro Glu Gln
[0045]	65 70 75 80
[0046]	Ile Ala Ala Trp Lys Lys Ile Thr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Gly
[0047]	85 90 95
[0048]	His Met Ala Val Gln Leu Trp His Thr Gly Arg Ile Ser His Ala Ser
[0049]	100 105 110
[0050]	Leu Gln Pro Gly Gly Gln Ala Pro Val Ala Pro Ser Ala Leu Ser Ala
[0051]	115 120 125
[0052]	Gly Thr Arg Thr Ser Leu Arg Asp Glu Asn Gly Gln Ala Ile Arg Val
[0053]	130 135 140
[0054]	Glu Thr Ser Met Pro Arg Ala Leu Glu Leu Glu Glu Ile Pro Gly Ile
[0055]	145 150 155 160
[0056]	Val Asn Asp Phe Arg Gln Ala Ile Ala Asn Ala Arg Glu Ala Gly Phe
[0057]	165 170 175
[0058]	Asp Leu Val Glu Leu His Ser Ala His Gly Tyr Leu Leu His Gln Phe
[0059]	180 185 190
[0060]	Leu Ser Pro Ser Ser Asn His Arg Thr Asp Gln Tyr Gly Gly Ser Val
[0061]	195 200 205
[0062]	Glu Asn Arg Ala Arg Leu Val Leu Glu Val Val Asp Ala Gly Ile Glu
[0063]	210 215 220
[0064]	Glu Trp Gly Ala Asp Arg Ile Gly Ile Arg Val Ser Pro Ile Gly Thr
[0065]	225 230 235 240
[0066]	Phe Gln Asn Thr Asp Asn Gly Pro Asn Glu Glu Ala Asp Ala Leu Tyr
[0067]	245 250 255
[0068]	Leu Ile Glu Gln Leu Gly Lys Arg Gly Ile Ala Tyr Leu His Met Ser
[0069]	260 265 270
[0070]	Glu Pro Asp Trp Ala Gly Gly Glu Pro Tyr Thr Asp Ala Phe Arg Glu
[0071]	275 280 285
[0072]	Lys Val Arg Ala Arg Phe His Gly Pro Ile Ile Gly Ala Gly Ala Tyr
[0073]	290 295 300
[0074]	Thr Val Glu Lys Ala Glu Thr Leu Ile Gly Lys Gly Leu Ile Asp Ala
[0075]	305 310 315 320
[0076]	Val Ala Phe Gly Arg Asp Trp Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Ala Arg
[0077]	325 330 335
[0078]	Leu Gln Arg Arg Ala Glu Leu Asn Pro Gln Arg Ala Glu Ser Phe Tyr
[0079]	340 345 350
[0080]	Gly Gly Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp Tyr Pro Thr Leu
[0081]	355 360 365
[0082]	<210> 3
[0083]	<211> 1098

[0084] <212> DNA

[0085] <213> 无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)

[0086] <400> 3

[0087] atgagctctg acaagctggt caccctctg aaagtgggtg cgattaccgc tccgaaccgc 60

[0088] atcttcatgg ctccgtgac ccgtctgcgc agcattgagc caggtgatat ccctacgccg 120

[0089] ctgatggcag aatactaccg tcagcgcgca agcgcaggcc tgatcatctc tgaagcgacc 180

[0090] caaatctccg cgcaagcaaa aggctacgca ggtgctccgg gtctgcattc cgacgagcag 240

[0091] atcgcggcct ggaaaaaat cactgcgggt gttcatgcgg agaacggcca tatcgcggtt 300

[0092] cagctgtggc atactggtcg catctctcat gcttctctgc aaccgggtgg ccaaccacct 360

[0093] gtaagcgcag ctgctatctc cgctggcacc cgtacttccc tgcgtgacga gaacggccag 420

[0094] gcgatccgtg tagacaccag catgccgct gctctggaaa ccgacgagat gccgggtatt 480

[0095] gtaaacgatt tccgtcaggc gattgctaag gcgcgtgaag cgggcttcga cctggtagag 540

[0096] ctgcattctg ctcacggta cctgctgcac cagttctctga gcccatctc taaccatcgt 600

[0097] actgaccagt acggtggttc tgttgagaac cgtgcgcgtc tggactgga agtggttgac 660

[0098] gccggtatca agaatgggg tgcagatcgt atcggcatcc gtgtatcccc ggtcggcagc 720

[0099] ttccagaacg ttgacaacgg ccctaacgag gaagccgatg ccctgtacct gattgaagag 780

[0100] ctgggcaaac gcggtatgc ctacctgac atgtctgagc cggattgggc ggggtgtaaa 840

[0101] ccgtacaccg atgtttccg tgaagggtt cgtgctcgtt tccacggccc gatcatcgtt 900

[0102] gccggtgat aactcgtga gaaagcagaa actctgatcg aaaaaggcct gatcgacgca 960

[0103] gtggcgtttg gccgtgatta cattgtaac ccggatctgg tcgcacgtct gcaacgtaag 1020

[0104] gcagagctga acccgcagcg ctctgaaatc ttttacgggt gcggcgtgca gggttacacc 1080

[0105] gactaccaa ccctgtaa 1098

[0106] <210> 4

[0107] <211> 365

[0108] <212> PRT

[0109] <213> 无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)

[0110] <400> 4

[0111] Met Ser Ser Asp Lys Leu Phe Thr Pro Leu Lys Val Gly Ala Ile Thr

[0112] 1 5 10 15

[0113] Ala Pro Asn Arg Ile Phe Met Ala Pro Leu Thr Arg Leu Arg Ser Ile

[0114] 20 25 30

[0115] Glu Pro Gly Asp Ile Pro Thr Pro Leu Met Ala Glu Tyr Tyr Arg Gln

[0116] 35 40 45

[0117] Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ser Glu Ala Thr Gln Ile Ser Ala

[0118] 50 55 60

[0119] Gln Ala Lys Gly Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Leu His Ser Asp Glu Gln

[0120] 65 70 75 80

[0121] Ile Ala Ala Trp Lys Lys Ile Thr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Gly

[0122] 85 90 95

[0123] His Ile Ala Val Gln Leu Trp His Thr Gly Arg Ile Ser His Ala Ser

[0124] 100 105 110

[0125] Leu Gln Pro Gly Gly Gln Pro Pro Val Ser Ala Ser Ala Ile Ser Ala

[0126]	115	120	125
[0127]	Gly Thr Arg Thr Ser Leu Arg Asp Glu Asn Gly Gln Ala Ile Arg Val		
[0128]	130	135	140
[0129]	Asp Thr Ser Met Pro Arg Ala Leu Glu Thr Asp Glu Met Pro Gly Ile		
[0130]	145	150	155
[0131]	Val Asn Asp Phe Arg Gln Ala Ile Ala Asn Ala Arg Glu Ala Gly Phe		
[0132]	165	170	175
[0133]	Asp Leu Val Glu Leu His Ser Ala His Gly Tyr Leu Leu His Gln Phe		
[0134]	180	185	190
[0135]	Leu Ser Pro Ser Ser Asn His Arg Thr Asp Gln Tyr Gly Gly Ser Val		
[0136]	195	200	205
[0137]	Glu Asn Arg Ala Arg Leu Val Leu Glu Val Val Asp Ala Gly Ile Lys		
[0138]	210	215	220
[0139]	Glu Trp Gly Ala Asp Arg Ile Gly Ile Arg Val Ser Pro Val Gly Thr		
[0140]	225	230	235
[0141]	Phe Gln Asn Val Asp Asn Gly Pro Asn Glu Glu Ala Asp Ala Leu Tyr		
[0142]	245	250	255
[0143]	Leu Ile Glu Glu Leu Gly Lys Arg Gly Ile Ala Tyr Leu His Met Ser		
[0144]	260	265	270
[0145]	Glu Pro Asp Trp Ala Gly Gly Lys Pro Tyr Thr Asp Ala Phe Arg Glu		
[0146]	275	280	285
[0147]	Lys Val Arg Ala Arg Phe His Gly Pro Ile Ile Gly Ala Gly Ala Tyr		
[0148]	290	295	300
[0149]	Thr Arg Glu Lys Ala Glu Thr Leu Ile Glu Lys Gly Leu Ile Asp Ala		
[0150]	305	310	315
[0151]	Val Ala Phe Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Ala Arg		
[0152]	325	330	335
[0153]	Leu Gln Arg Lys Ala Glu Leu Asn Pro Gln Arg Ser Glu Ser Phe Tyr		
[0154]	340	345	350
[0155]	Gly Gly Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp Tyr Pro Thr Leu		
[0156]	355	360	365
[0157]	<210> 5		
[0158]	<211> 1098		
[0159]	<212> DNA		
[0160]	<213> 弗氏柠檬酸杆菌(Citrobacter freundii)		
[0161]	<400> 5		
[0162]	atgtctagcg aaaaactggt ctctccgctg aaagtgggtg ccatcactgc ggctaactgt 60		
[0163]	gtattcatgg caccactgac ccgtctgcgt tccatcgagc caggtgatat tccgaccccg 120		
[0164]	ctgatggctg aatactaccg tcagcgtgct tctgcgggtc tgatcatctc cgaagctacc 180		
[0165]	cagatttctg cacaggccaa aggttacgca ggcgcgccag gtctgcattc tgaagcgcag 240		
[0166]	atcgtctgct ggaaaaaat caccgcagcg gtgcatgcgg aacagggtca catcgcagtt 300		
[0167]	cagctgtggc acaccggccg tatttccac gcaagcctgc aaccgaacgg tcaaccaccg 360		

[0168] gtagctcctt ctgcatcag cgcaggtacc cgtactagcc tgcgtgacga gaacggctctg 420
 [0169] gcaactcgtg cagatactac gatgcccgct gcgctggaaa cggaagaaat cccgggtatc 480
 [0170] gtcaacgatt ttcgtcaggc aatcgcaaac gcgctgaag ctggttttga catggttgaa 540
 [0171] ctgcattccg cacacggta tctgctgcac cagttcctgt ccccgacttc taaccagcgt 600
 [0172] actgatcagt atggtgtag cgtagaaaac cgcgctcgtc tggtagtga agttgtagat 660
 [0173] gccggtatca aggaatgggg cgctgatcgc atcggtatcc gtgtaagccc gatcggttct 720
 [0174] tttcagaacg tggacaacgg tccgaacgag gaagcggacg cgctgtacct gatcagcag 780
 [0175] ctggcacaac gtggcattgc ctacctgcac atgtctgaac cggactgggc tggcggtgaa 840
 [0176] ccgtattccg atgctttccg tgaaaaagtg cgtgcacgct ttcattggtcc gattatcgtt 900
 [0177] gcgggcgctt atactccgga aaaagcagaa accctgattg aaaaaggcct gatcagcag 960
 [0178] gtagctttcg gccgcgcta tatcgcaaac ccgatctgg ttgcgctct gcaacacaaa 1020
 [0179] gcggaactga acctcaacg tgcggaatcc ttctacggcg gtggtgcgga aggttatact 1080
 [0180] gactaccga ccctgtaa 1098
 [0181] <210> 6
 [0182] <211> 365
 [0183] <212> PRT
 [0184] <213> 弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)
 [0185] <400> 6
 [0186] Met Ser Ser Glu Lys Leu Phe Ser Pro Leu Lys Val Gly Ala Ile Thr
 [0187] 1 5 10 15
 [0188] Ala Ala Asn Arg Val Phe Met Ala Pro Leu Thr Arg Leu Arg Ser Ile
 [0189] 20 25 30
 [0190] Glu Pro Gly Asp Ile Pro Thr Pro Leu Met Ala Glu Tyr Tyr Arg Gln
 [0191] 35 40 45
 [0192] Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ser Glu Ala Thr Gln Ile Ser Ala
 [0193] 50 55 60
 [0194] Gln Ala Lys Gly Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Leu His Ser Glu Ala Gln
 [0195] 65 70 75 80
 [0196] Ile Ala Ala Trp Lys Lys Ile Thr Ala Ala Val His Ala Glu Gln Gly
 [0197] 85 90 95
 [0198] His Ile Ala Val Gln Leu Trp His Thr Gly Arg Ile Ser His Ala Ser
 [0199] 100 105 110
 [0200] Leu Gln Pro Asn Gly Gln Pro Pro Val Ala Pro Ser Ala Ile Ser Ala
 [0201] 115 120 125
 [0202] Gly Thr Arg Thr Ser Leu Arg Asp Glu Asn Gly Leu Ala Thr Arg Ala
 [0203] 130 135 140
 [0204] Asp Thr Thr Met Pro Arg Ala Leu Glu Thr Glu Glu Ile Pro Gly Ile
 [0205] 145 150 155 160
 [0206] Val Asn Asp Phe Arg Gln Ala Ile Ala Asn Ala Arg Glu Ala Gly Phe
 [0207] 165 170 175
 [0208] Asp Met Val Glu Leu His Ser Ala His Gly Tyr Leu Leu His Gln Phe
 [0209] 180 185 190

[0210]	Leu Ser Pro Thr Ser Asn Gln Arg Thr Asp Gln Tyr Gly Gly Ser Val
[0211]	195 200 205
[0212]	Glu Asn Arg Ala Arg Leu Val Leu Glu Val Val Asp Ala Gly Ile Lys
[0213]	210 215 220
[0214]	Glu Trp Gly Ala Asp Arg Ile Gly Ile Arg Val Ser Pro Ile Gly Ser
[0215]	225 230 235 240
[0216]	Phe Gln Asn Val Asp Asn Gly Pro Asn Glu Glu Ala Asp Ala Leu Tyr
[0217]	245 250 255
[0218]	Leu Ile Glu Gln Leu Gly Lys Arg Gly Ile Ala Tyr Leu His Met Ser
[0219]	260 265 270
[0220]	Glu Pro Asp Trp Ala Gly Gly Glu Pro Tyr Ser Asp Ala Phe Arg Glu
[0221]	275 280 285
[0222]	Lys Val Arg Ala Arg Phe His Gly Pro Ile Ile Gly Ala Gly Ala Tyr
[0223]	290 295 300
[0224]	Thr Pro Glu Lys Ala Glu Thr Leu Ile Glu Lys Gly Leu Ile Asp Ala
[0225]	305 310 315 320
[0226]	Val Ala Phe Gly Arg Ala Tyr Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Ala Arg
[0227]	325 330 335
[0228]	Leu Gln His Lys Ala Glu Leu Asn Pro Gln Arg Ala Glu Ser Phe Tyr
[0229]	340 345 350
[0230]	Gly Gly Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp Tyr Pro Thr Leu
[0231]	355 360 365
[0232]	<210> 7
[0233]	<211> 759
[0234]	<212> DNA
[0235]	<213> 短乳杆菌(Lactobacillus brevis)
[0236]	<400> 7
[0237]	atgagcaacc gcctggatgg caaagtggcg attattaccg gcggcaccct gggcattggc 60
[0238]	ctggcgattg caaccaaatt tgtggaagaa ggcgcgaaag tgatgattac cggccgccat 120
[0239]	agcgatgtgg gcgaaaaagc ggcaaaaagc gtgggcaccc ctgatcagat tcagtttttt 180
[0240]	cagcatgata gcagcgatga ggatggctgg accaaactgt ttgatgcgac cgaaaaagcg 240
[0241]	tttgccccgg tgagcaccct ggtgaataat gcgggtattg cgggtgaacaa aagcgtggaa 300
[0242]	gaaaccacca ccgccgaatg gcgcaaactg ctggcagtta acttagatgg cgtgtttttt 360
[0243]	ggcaccgcc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggcc tgggcgag cattattaac 420
[0244]	atgagcagca ttgaaggctt tgtggcgat ccgagcctgg gcgctataa tgcgagcaaa 480
[0245]	ggcgcggttc gcattatgag caaaagcgcg gcgtagatt gcgctgaa agattatgat 540
[0246]	gtgcgctga acaccgtca tccgggctat attaaaacc cgctgggtgga tgatctgccg 600
[0247]	ggcgcggaag aagcgtgag ccaacgtacc aaaacccga tgggtcatat tggcgaaccg 660
[0248]	aacgatattg cgtatattg cgtgtatctg gcgagcaac aaagcaaatt tgcgaccggc 720
[0249]	agcgaatttg tggatgatgg cgttatacc gcgcagtaa 759
[0250]	<210> 9
[0251]	<211> 786

[0252] <212> DNA
 [0253] <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)
 [0254] <400> 9
 [0255] atgtatccgg atttaaaagg aaaagtcgtc gctattacag gagctgcttc agggctcggg 60
 [0256] aaggcgatgg ccattcgctt cggcaaggag caggcaaaag tggttatcaa ctattatagt 120
 [0257] aataaacaag atccgaacga ggtaaaagaa gaggtcatca aggcgggagg tgaagctggt 180
 [0258] gtcgtccaag gagatgtcac gaaagaggaa gatgtaaaaa atatcgtgca aacggcaatt 240
 [0259] aaggagtctg gcacactcga tattatgatt aataatgccg gtcttgaaaa tctgtgcca 300
 [0260] tctcacgaaa tgccgctcaa ggattgggat aaagtcacgc gcacgaactt aacgggtgcc 360
 [0261] ttttaggaa gccgtgaagc gattaaatat ttcgtagaaa acgatatcaa gggaaatgtc 420
 [0262] attaacatgt ccagtgtgca cgaagtgatt cttggccgt tatttgtcca ctatgcggca 480
 [0263] agtaaaggcg ggataaagct gatgacagaa acattagcgt tggaatacgc gccgaagggc 540
 [0264] attcgcgtca ataatttgg gccagtgcg atcaacacgc caatcaatgc tgaaaaattc 600
 [0265] gctgacccta aacagaaagc tgatgtagaa agcatgattc caatgggata tatcggcgaa 660
 [0266] ccggaggaga tcgccgcagt agcagcctgg cttgcttcca aggaagccag ctacgtcaca 720
 [0267] ggcatcacgt tattcgcgga cggcgggatg acacaatc cttcattcca ggcaggccgc 780
 [0268] ggttaa 786
 [0269] <210> 11
 [0270] <211> 1206
 [0271] <212> DNA
 [0272] <213> 未知 (Unknown)
 [0273] <400> 11
 [0274] atggcgaag tgctgtcgt gctgtatgat gatccggtgg atggctatcc gaaaacctat 60
 [0275] gcgcgcgatg atctgccgaa aattgatcat tatccggcgc gccagacct gccgacct 120
 [0276] aaagcgattg attttaccg gggccagctg ctgggcagcg ttagcggatga attgggctta 180
 [0277] cgcaaatatc tggaagcaa cggccatacc ctgggtggtga ccagcgataa agatggccc 240
 [0278] gatagcgtgt ttgaacgca actggtgat gcggatgtgg tgattagcca gccgttttgg 300
 [0279] ccggcgtatc tgaccctga acgtattcgc aaagcgaaaa acctgaaact ggcgctgacc 360
 [0280] gcgggcattg gcagcgatca tgttgatctg cagagcgcga ttgatcgcaa cgtgaccgtg 420
 [0281] gcggaagtga cctattgcaa cagcattagc gtggcggaac atgtggtgat gatgattctg 480
 [0282] agcctgggtc gcaactatct gccagccat gaatgggccc gcaaaggcgg ttggaatatt 540
 [0283] gcggattcgc tgagccatgc gtatgatctg gaagcgatgc atgtgggcac cgtggcggcg 600
 [0284] ggtcgtattg gtttagcggg tttacgtcgt ctggcgccgt ttgatgttca tctgcattat 660
 [0285] accgatgcc atcgcctgcc ggaaagcgtg gaaaaagaac tgaacctgac ctggcatgcg 720
 [0286] acccgcaag atatgtatcc ggtgtcgcgt gtggtgacc tgaactgcc tctgcatccg 780
 [0287] gaaaccgaac acatgattaa cgatgaaacc ctgaaactgt tcaagcgcgg cgcgtatatt 840
 [0288] gtgaacaccg cgcgcggtaa actgtcgcgt cgtgatcgcg ttgcgcgcgc gttagaaagc 900
 [0289] ggtcgtttag cgggttatgc gggatgatgt tggtttccgc aaccggcgc taaagatcat 960
 [0290] ccgtggcgta ccatgccgta taacggcatg accccgcata ttagcggcac caccttgacc 1020
 [0291] gcgcaagcgc gttatgcggc gggatccctg gaaattttag aatgcttttt tgaggccgc 1080
 [0292] ccgattcgcg atgaatatct gattgtcag ggcggcgcgc tggcgggtac cgggtgacat 1140
 [0293] agctatagca aaggtaacgc gaccggcggc agcgaagaag cggcgaatt taaaaagc 1200

[0294] gtgtaa 1206

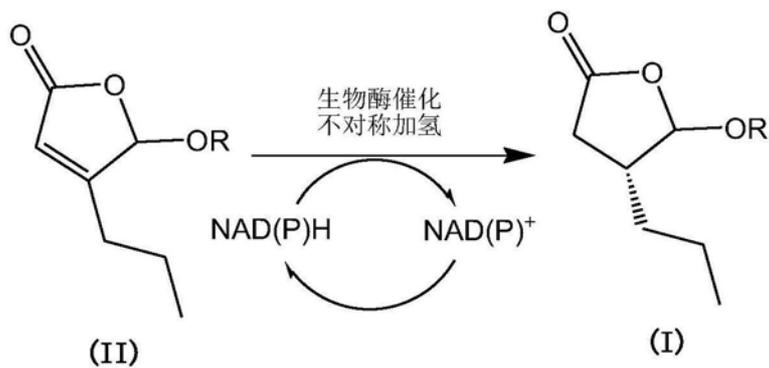


图1

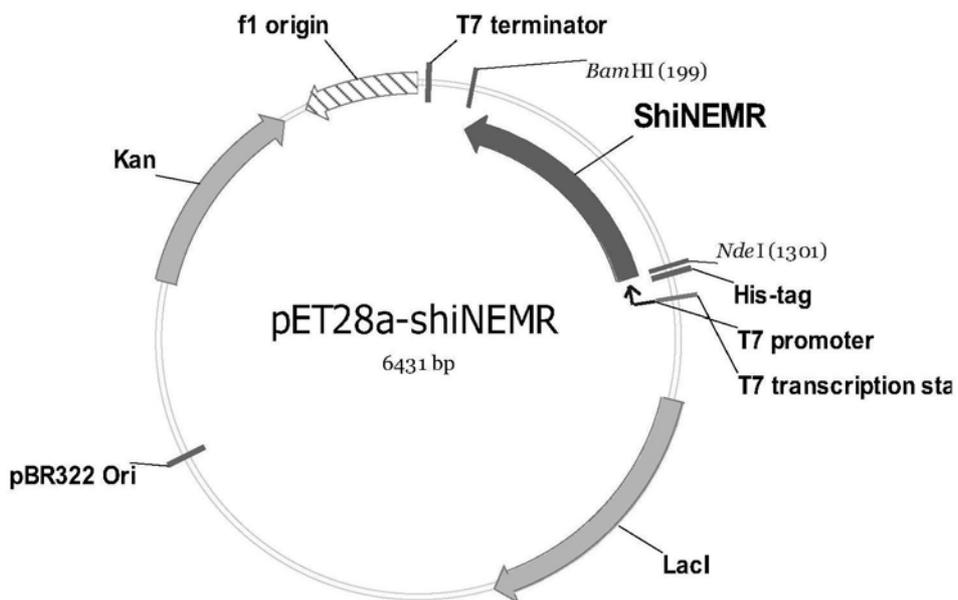


图2

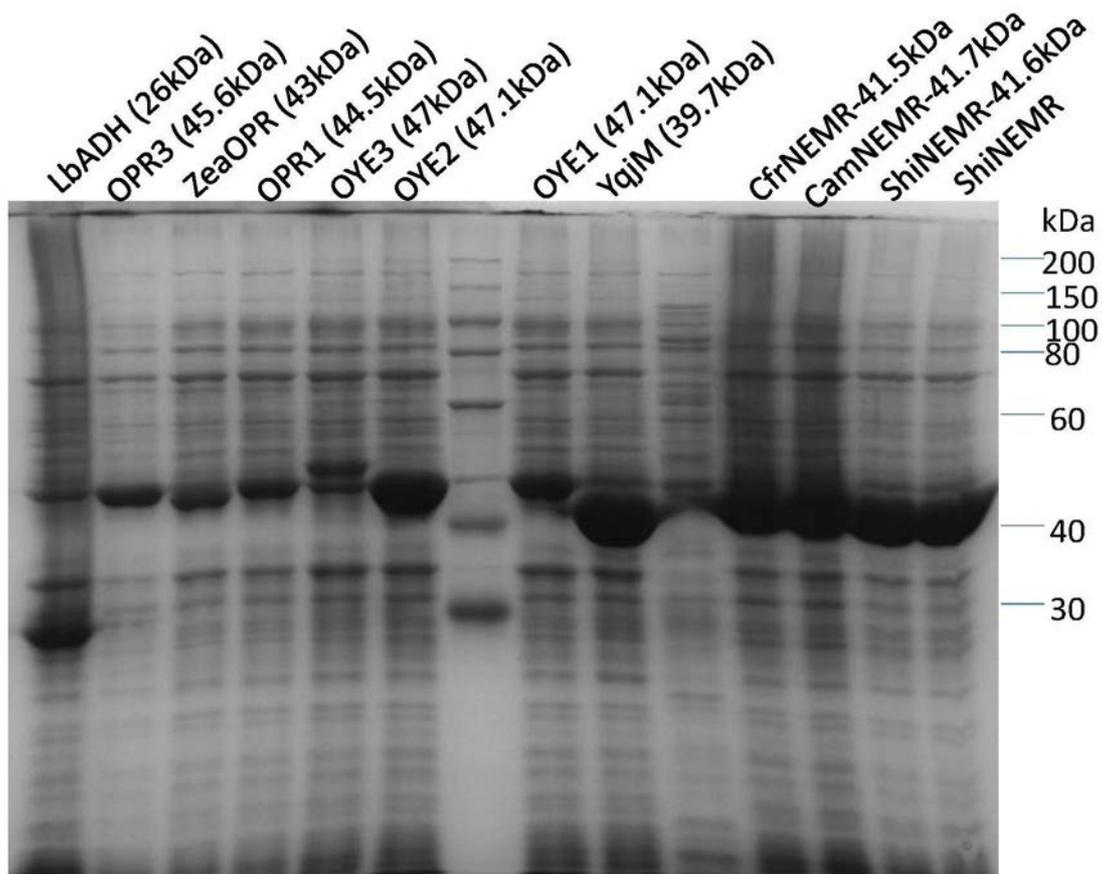


图3

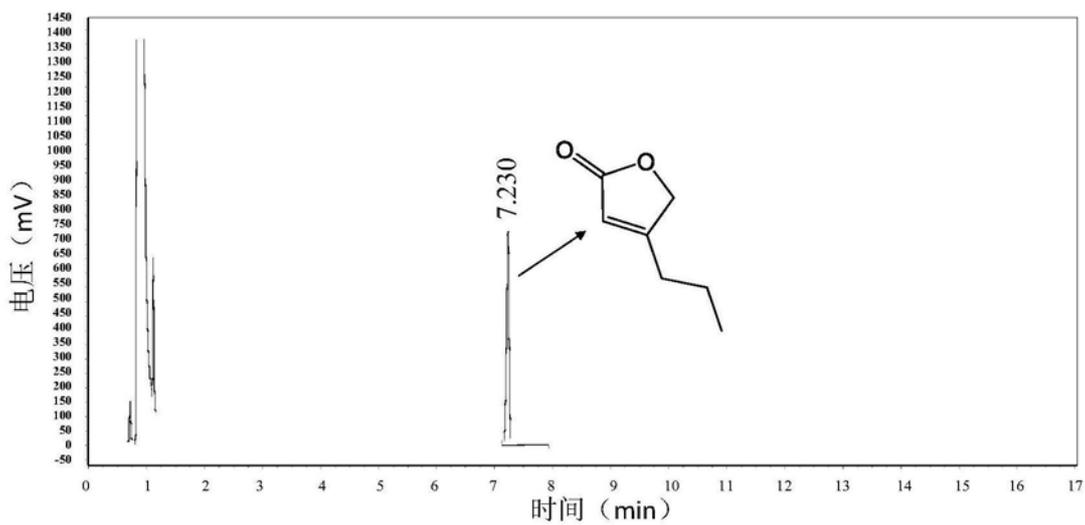


图4

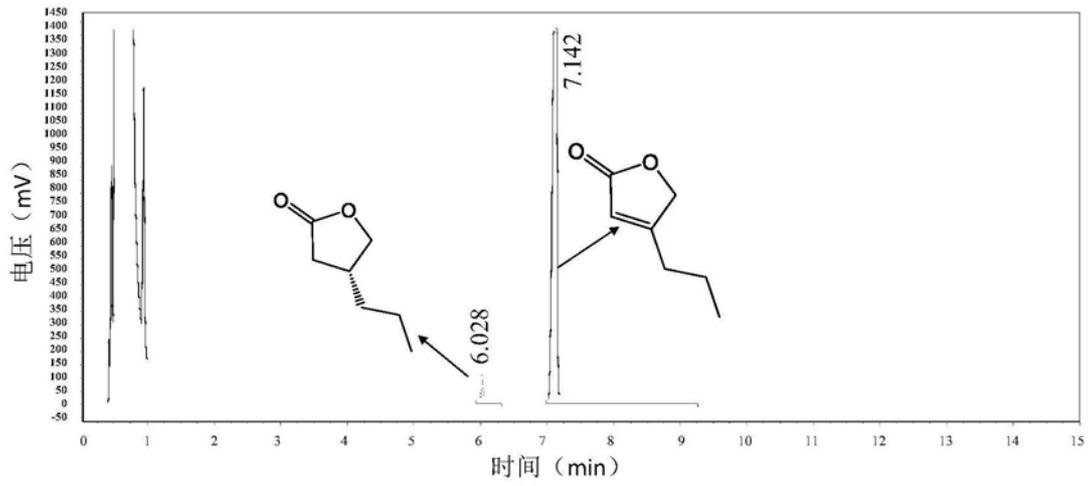


图5

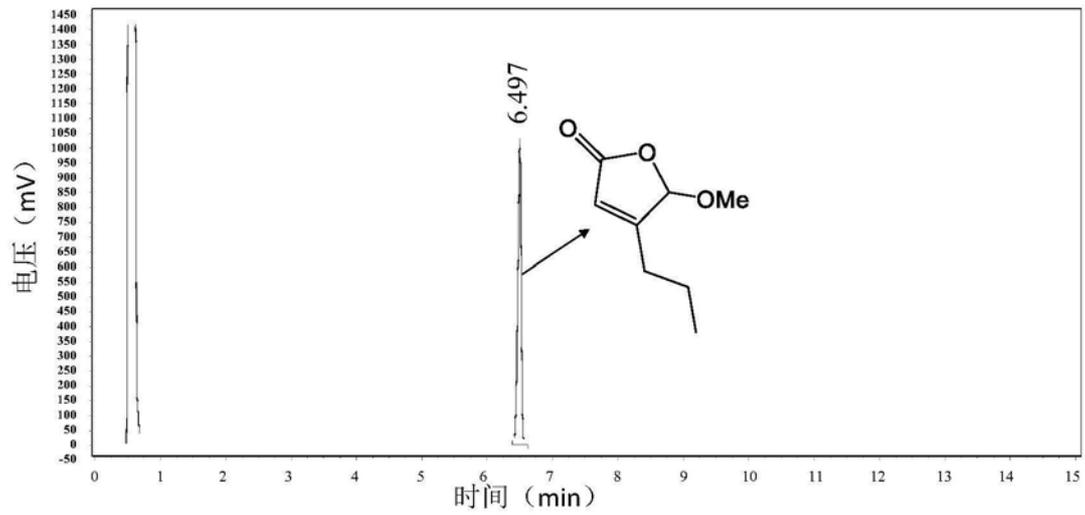


图6

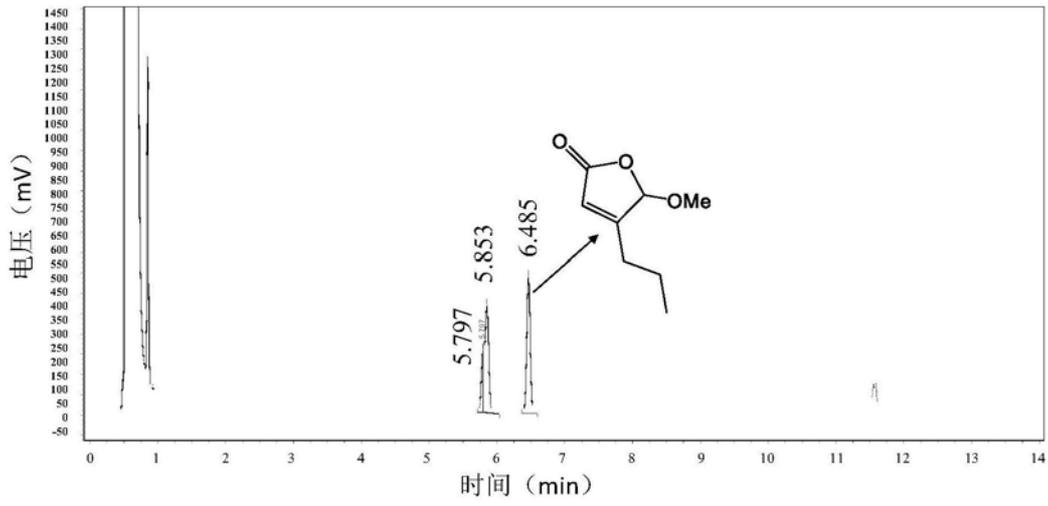


图7

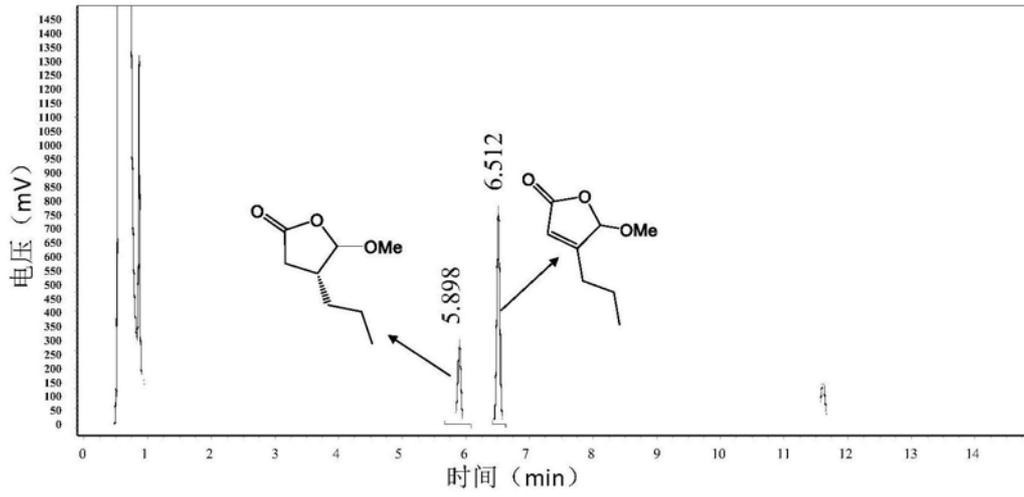


图8

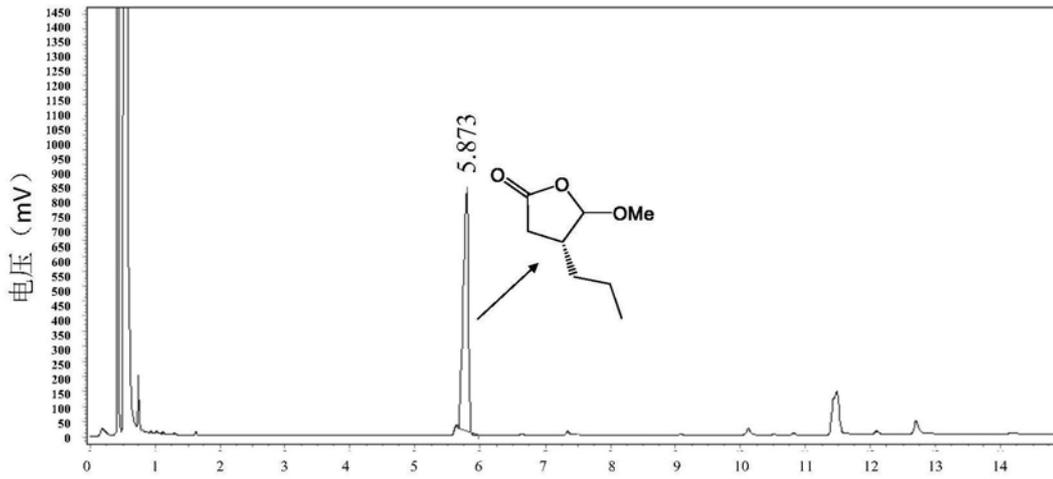


图9

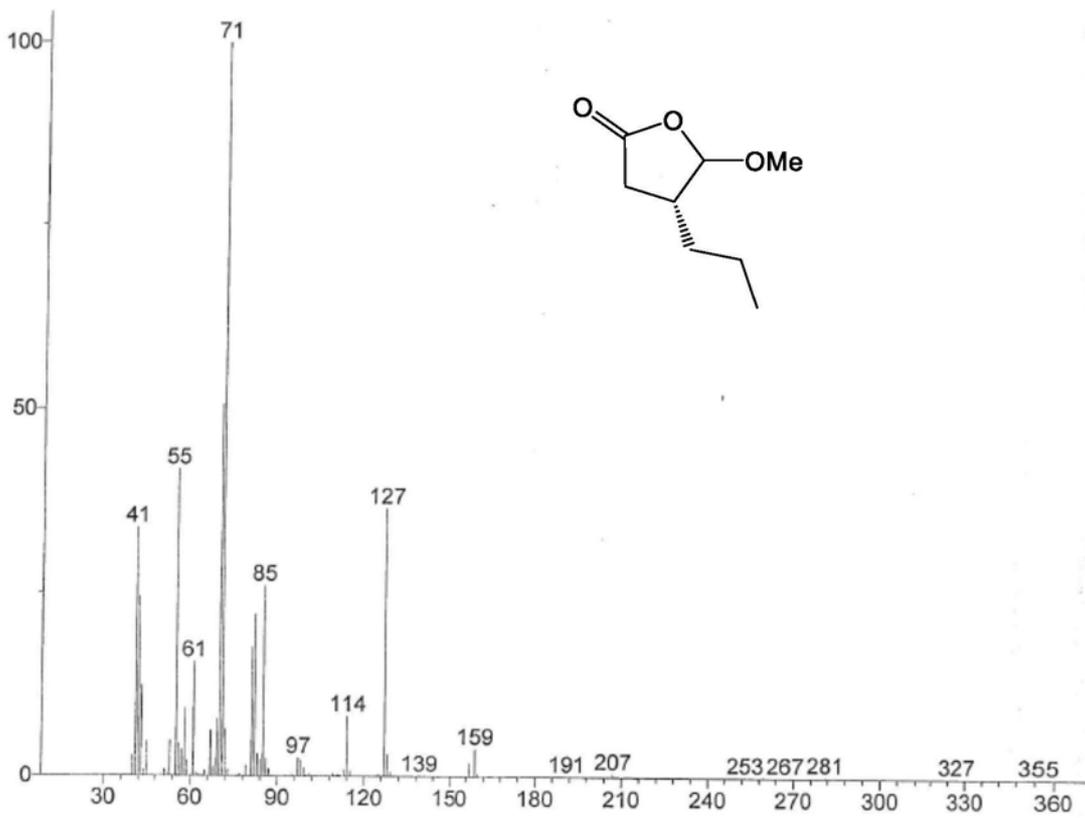


图10

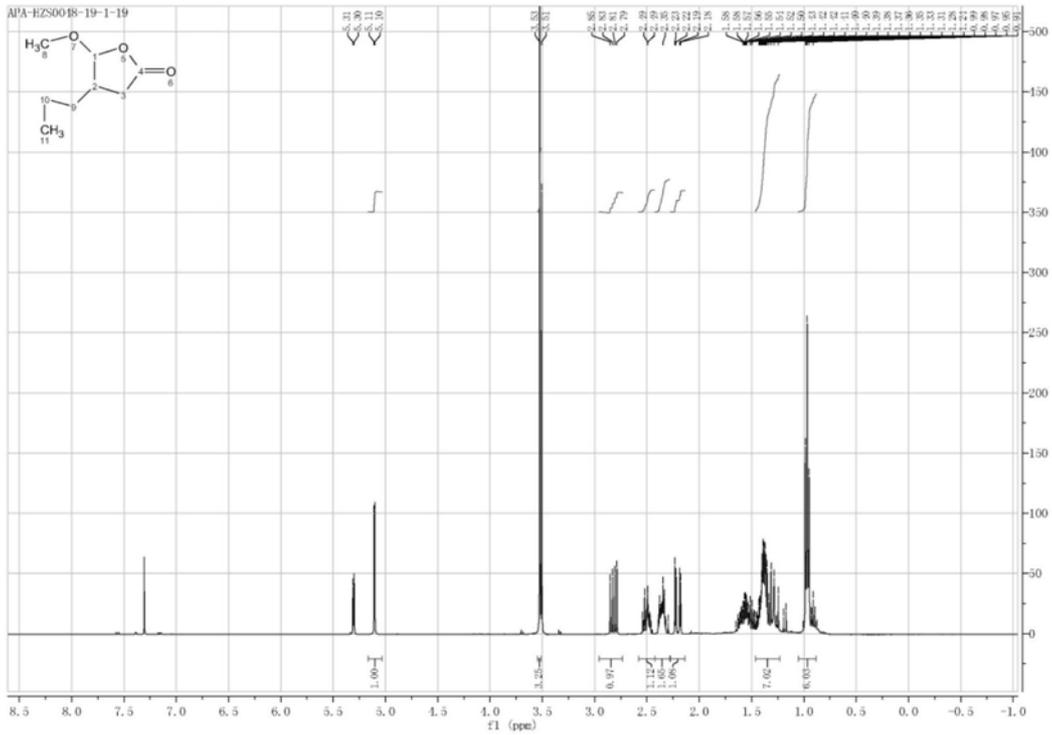


图11

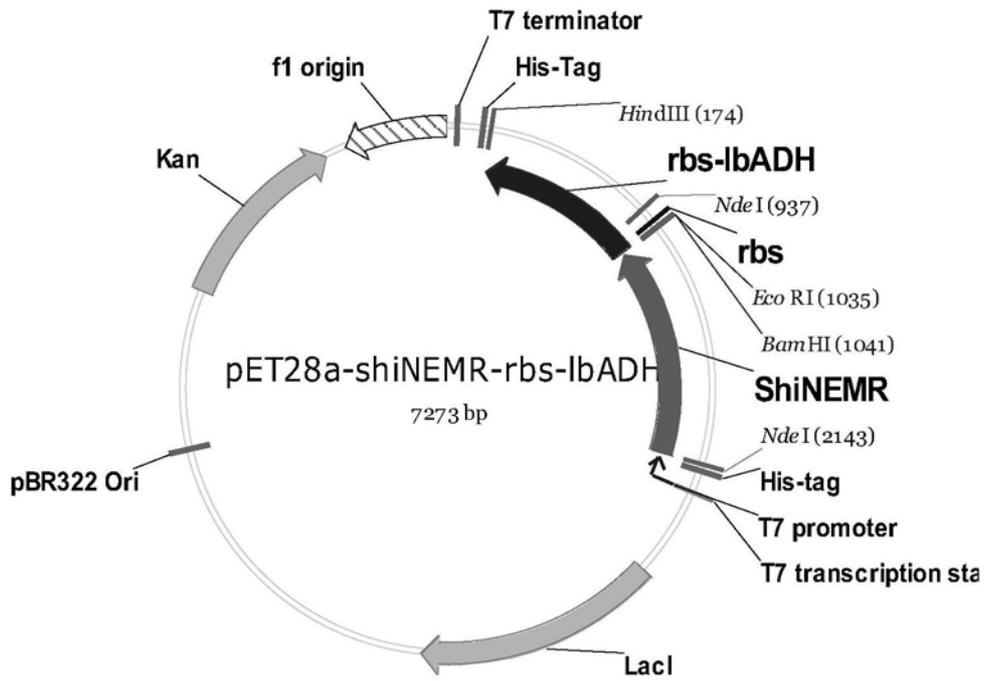


图12

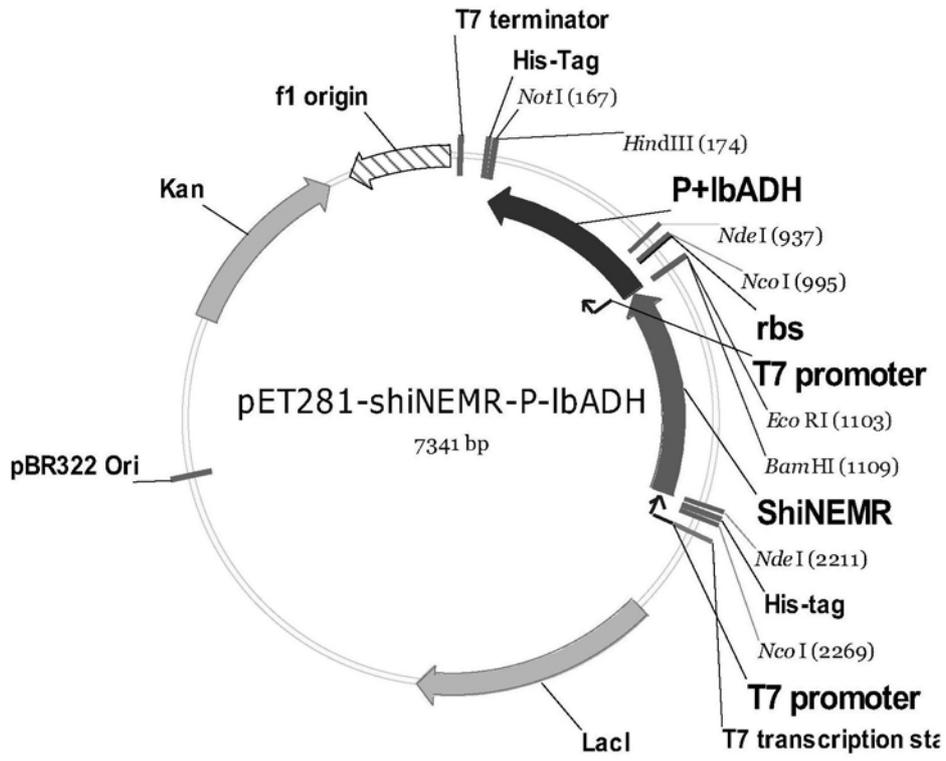


图13