



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0047530

(51)^{2020.01} C12P 7/40; C12P 41/00

(13) B

(21) 1-2020-01911

(22) 24/09/2018

(86) PCT/EP2018/075752 24/09/2018

(87) WO 2019/063463 04/04/2019

(30) 17193736.0 28/09/2017 EP

(45) 25/06/2025 447

(43) 27/07/2020 388A

(73) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE)

Kaiser-Wilhelm-Allee 1, 51373 Leverkusen, Germany

(72) SPELBERG, Markus (DE); EGGER, Julian (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN CHỌN LỌC CHẤT ĐỒNG PHÂN ĐỐI ẢNH S
CỦA AXIT ALPHA HALOALKANOIC

(21) 1-2020-01911

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức I bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức II bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rõ rằng đôi khi có sự khác biệt rõ rệt về các tác dụng của các chất đồng phân đối ảnh của cùng một chất hóa học trong các hệ sinh học như các sinh vật. Ví dụ, ở thuốc, thường chỉ có một trong số các chất đồng phân đối ảnh của thuốc chịu trách nhiệm cho các tác dụng sinh lý mong muốn, trong khi chất đồng phân đối ảnh khác ít hoạt động hơn, không hoạt động hoặc đôi khi phản tác dụng.

Do đó, tồn tại các phương pháp khác nhau để chỉ thu được chất đồng phân đối ảnh mong muốn. Một phương pháp được gọi là phân giải bất đối xứng. Phương pháp này bao gồm việc điều chế hợp chất ở dạng raxemic, và tách nó thành các chất đồng phân đối ảnh khác nhau. Phương pháp khác là tổng hợp bất đối xứng, tức là sử dụng các kỹ thuật khác nhau để điều chế hợp chất mong muốn với lượng dư chất đồng phân đối ảnh cao.

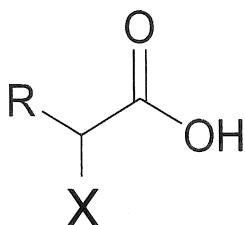
Một nhóm các phân tử tồn tại dưới dạng hỗn hợp raxemic là các axit alpha haloalkanoic. Chất đồng phân đối ảnh R hoặc S của các axit alpha haloalkanoic dùng cho mục đích phân tích có thể được tách bằng sắc ký khí mao dẫn như được mô tả trong US 5154738 chẳng hạn. Đối với các mục đích tổng hợp, cách thiết thực nhất để điều chế axit alpha haloalkanoic bất đối xứng là bằng cách phân giải raxemic sử dụng muối strychnin hoặc bruxin hoặc bằng phương pháp brom hóa chọn lọc lập thể axit R-2-aminobutyric. Tuy nhiên, các tiền chất hoặc chất phản ứng bất đối cho các phản ứng này - ví dụ, [axit R-2-aminobutyric] - không hiệu quả về chi phí. Ngoài ra, các phản ứng này là khó để thực hiện trên quy mô lớn hơn hoặc thậm chí là quy mô công nghiệp. Ví dụ, quá trình brom hóa chọn lọc lập thể axit R-2-aminobutyric gây tốn thời

gian, đòi hỏi nhiệt độ thấp (-10 đến 5°C) và khó theo dõi tiến trình phản ứng. Hơn nữa, khí nitơ được tạo ra trong quá trình phản ứng liên quan đến vấn đề an toàn lao động.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp thay thế, hiệu quả hơn về chi phí, tiết kiệm thời gian hơn và an toàn hơn để cho phép và/hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách các chất đồng phân đối ảnh R và S của axit alpha haloalkanoic có công thức I.

Sáng chế đạt được mục đích này bằng cách đề xuất phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức I,



trong đó X là halogen và

R là mạch alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, trong đó mạch alkyl này có thể là thẳng hoặc phân nhánh tại các nguyên tử cacbon γ hoặc δ ,

phương pháp này bao gồm các bước:

- tạo ra raxemat gồm chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic nói trên,

- tạo ra polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên,

- cho raxemat phản ứng trong 1-8 giờ, trong đó

độ pH nằm trong khoảng 9 - 10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 15 - 35°C đối với polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này hoặc

độ pH nằm trong khoảng 9 - 10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 55 - 65°C đối

với polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này,

- và trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90,0 đến 99,9% đạt được sau 1-8 giờ.

Phương pháp này có ưu điểm ở chỗ đây là phương pháp thay thế, hiệu quả về chi phí và tiết kiệm thời gian hơn dựa trên đặc tính phản ứng khác nhau của các chất đồng phân đối ảnh R và S của axit alpha haloalkanoic có công thức I cho phép và/hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách hai chất đồng phân đối ảnh này, vì polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic có công thức I một cách rất hiệu quả trong các điều kiện phản ứng nhất định, tức là đạt được hiệu suất theo thời gian không gian cao. Tính chọn lọc của phản ứng thủy phân được thể hiện bằng tỷ lệ lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R còn lại nằm trong khoảng từ 90 đến 99%. Nói cách khác, đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng các điều kiện được chỉ định tạo điều kiện thuận lợi cho phương pháp hiệu quả về chi phí hơn, tiết kiệm thời gian hơn và an toàn hơn để tạo ra chất đồng phân đối ảnh R.

Như nêu trên, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic có công thức I một cách rất hiệu quả trong các điều kiện phản ứng nhất định. Trong phản ứng này, chất đồng phân đối ảnh R vẫn không thay đổi, trong khi chất đồng phân đối ảnh S bị thủy phân dưới sự chuyển hóa đồng phân lập thể của nó.

Theo các phương án được ưu tiên của phương pháp này, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này và X là flo trong axit alpha haloalkanoic theo công thức I. Lần đầu tiên, đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng trong các điều kiện này và sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình

tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này, chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic chứa flo theo công thức I được thủy phân một cách chọn lọc, trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90,0 đến 99,9% đạt được sau 1-8 giờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 cho thấy phản ứng được thực hiện trong các điều kiện tối ưu hóa đối với giá trị pH, tức là 9,5 và nhiệt độ, tức là 25°C. Trong trường hợp này, 100 g/L axit 2-bromobutyric được sử dụng làm chất nền, glyxin 20 mM có mặt và 2 g/L dịch dung giải tế bào, tức là E. coli MG1655 chứa plasmid pKA81a-HADH-PP-AJ được sử dụng để biểu hiện enzym dehalogenaza. Dịch dung giải tế bào được thêm vào 3 lần, mỗi giờ.

Fig.2 chứng minh rằng độ pH tối ưu của phản ứng trên Fig.1 nằm trong khoảng pH 8 và pH 10.

Fig.3 chứng minh rằng thay vì sử dụng dịch dung giải tế bào (vô trùng), toàn bộ tế bào biểu hiện enzym được yêu cầu bảo hộ có thể được sử dụng cho phản ứng chuyển hóa.

Fig.4 chứng minh rằng hiệu quả của phản ứng chuyển hóa được duy trì, nếu chất nền được cung cấp và enzym được thêm vào chất nền.

Fig.5 chứng minh rằng hiệu quả của phản ứng chuyển hóa được duy trì, nếu enzym được cung cấp dưới dạng canh trường lên men và chất nền được thêm vào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "bao gồm" được hiểu là chỉ sự có mặt của các bộ phận, các bước hoặc các thành phần đã nêu, nhưng không loại trừ sự có mặt của một hoặc nhiều bộ phận, bước hoặc thành phần bổ sung.

Điều này được hiểu rằng khi đề cập đến một từ ở dạng số ít, thì số nhiều cũng được bao gồm ở đây. Do đó, việc viện dẫn tới một yếu tố bởi mạo từ không xác định "một" không loại trừ khả năng có mặt nhiều hơn một yếu tố, trừ khi bối cảnh yêu cầu rõ ràng phải có một và chỉ một trong các yếu tố. Do đó, mạo từ không xác định "một" thường có nghĩa là "ít nhất một".

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “chất đồng phân đối ảnh” dùng để chỉ một trong hai chất đồng phân lập thể của một phân tử nhất định mà là các ảnh qua gương với nhau mà không thể chồng khít lên nhau được (không giống nhau). Nguyên tử bất đối xứng đơn hoặc dấu hiệu cấu trúc tương tự trong một hợp chất làm cho hợp chất đó có hai cấu trúc có thể, là ảnh qua gương của nhau, không thể chồng khít lên nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “raxemat” hoặc “nền raxemic” đề cập đến hỗn hợp có lượng bằng nhau của hai chất đồng phân lập thể của một phân tử bất đối xứng.

Như nêu trên, trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 1, X trong công thức I được chọn từ halogen khác với flo và phương pháp được mô tả ở trên được thực hiện trong 1-8 giờ, trong đó độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 15-35°C.

Bằng cách sử dụng các điều kiện này, đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% đạt được các giá trị tỷ lệ lượng dư chất đồng phân đối ảnh đáng tin cậy trên 99% (xem Fig.3) và hiệu suất theo thời gian không gian là 16,6 g_{sản phẩm} L⁻¹ giờ⁻¹ (ở nồng độ chất nền là 100 g/l).

Cần lưu ý rằng, do chất nền raxemic, hiệu suất tối đa của chất đồng phân đối ảnh R là 50%, do đó hiệu suất tối đa sử dụng nồng độ chất nền 100 g/l sẽ là 50 g/l. Hơn nữa, hiệu suất theo thời gian không gian sẽ còn cao hơn, nếu sử dụng nồng độ chất nền thấp hơn - ví dụ, 50 g/l. Tuy nhiên, nồng độ chất nền cao hơn có lợi cho quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Theo các phương án được ưu tiên, phương pháp nêu trên trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với nó, được thực hiện trong 4-6 giờ, trong đó độ pH là 9,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng 20-30°C. Bằng cách sử dụng các điều kiện này, có thể đạt được sự chuyển hóa hoàn toàn, tức là lượng dư chất đồng phân đối ảnh 90% sau 3 giờ.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của phản ứng này, nhiệt độ là 25°C.

Độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng 9-10 và tốt nhất là 9,5.

Nhiệt độ phản ứng 25°C và pH 9,5 đạt được sự chuyển hóa hoàn toàn, tức là lượng dư chất đồng phân đối ảnh 90% sau 1 giờ. Do đó, các điều kiện này dẫn đến hiệu suất theo thời gian không gian đặc biệt cao. Trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với nó, được cung cấp dưới dạng sinh khối mới lên men (tức là polypeptit được chứa trong toàn bộ tế bào), hiệu suất theo thời gian không gian đạt được là 50 g sản phẩm L⁻¹ giờ⁻¹.

Như nêu trên, trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với phương pháp nêu trên được thực hiện trong 1-8 giờ, trong đó độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C và lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90% đến 99,9% đạt được sau 1-8 giờ. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp nêu trên trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với nó, được thực hiện trong 4-6 giờ, trong đó độ pH là 9,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng 59-61°C.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của phản ứng này, nhiệt độ là 60°C.

Độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng 9-10 và tốt nhất là 9,5.

Theo một phương án được ưu tiên của polypeptit có hoạt tính dehalogenaza được mô tả ở đây, polypeptit này có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 85%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 90%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và tốt nhất là mức tương đồng trình tự 100% với SEQ ID NO. 1 hoặc polypeptit này có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 85%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 90%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và tốt nhất là mức tương đồng trình tự 100% với SEQ ID NO. 4.

Polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 cũng có thể được xác định đặc tính thông

qua các trình tự axit nucleic của chúng.

Do đó, trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1, polypeptit được đề xuất được chọn từ nhóm

- a) polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này,
- b) đoạn axit nucleic được tối ưu hóa bằng codon được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 2
- c) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự bổ trợ cho SEQ ID NO. 2,
- d) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự lai đặc biệt với đoạn axit nucleic được phân lập nói trên của b) hoặc phần bổ trợ nói trên của c)
- e) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 3
- f) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự bổ trợ cho SEQ ID NO. 3,
- g) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự lai đặc biệt với đoạn axit nucleic được phân lập nói trên của e) hoặc phần bổ trợ nói trên của f).

Do đó, trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1, polypeptit có thể được mã hóa bằng các trình tự axit nucleic khác nhau. Đây là kết quả của sự thoái hóa mã di truyền.

Do sự thoái hóa mã di truyền này, các axit amin có thể được mã hóa bởi một hoặc nhiều codon. Ở các sinh vật khác nhau, các codon mã hóa cho một axit amin được sử dụng với các tần suất khác nhau. Việc điều chỉnh các codon của trình tự axit nucleic mã hóa theo tần suất sử dụng của chúng ở sinh vật trong đó trình tự cần được biểu hiện sẽ được tích hợp có thể góp phần vào việc tăng lượng protein dịch mã và/hoặc sự ổn định của mARN nghi vấn trong các tế bào cụ thể. Tần suất sử dụng các codon trong tế bào chủ hoặc vật chủ nghi vấn có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách kiểm tra càng nhiều trình tự axit nucleic mã hóa của sinh vật nghi vấn về tần suất mà các codon nhất định được sử dụng để mã hóa một axit amin nhất định càng tốt. Tần suất sử dụng codon của các sinh vật nhất định là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem <http://www.kazusa.or.jp/codon/>) và có thể được xác định theo cách đơn giản và nhanh

chóng bằng cách sử dụng các thuật toán được phát triển đặc biệt được cài đặt vào các chương trình máy tính (ví dụ, Grote et al., 2005, *Nucleic Acids Research* 33, W526–W531; doi: 10.1093/nar/gki376). Các công cụ sử dụng các thuật toán như vậy có thể truy cập công khai và được cung cấp miễn phí dưới dạng các giao diện mạng, không kể những công cụ khác, trên mạng lưới toàn cầu (World Wide Web) từ các tổ chức khác nhau, như Viện Tin sinh học châu Âu (EMBL-EBI) và các công cụ khác (ví dụ, <http://www.jcat.de>; <http://gcua.schoedl.de/>; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; <http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>; http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/). Việc điều chỉnh các codon của trình tự axit nucleic mã hóa theo tần suất sử dụng của chúng ở sinh vật trong đó trình tự được dự định để được biểu hiện có thể được thực hiện bằng phương pháp gây đột biến in vitro hoặc tốt hơn là bằng cách tổng hợp trình tự gen de novo. Các phương pháp tổng hợp trình tự axit nucleic de novo là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Quá trình tổng hợp de novo có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ban đầu tổng hợp các oligonucleotit axit nucleic riêng lẻ, lai chúng với các oligonucleotit hỗ trợ cho chúng, để chúng tạo thành sợi ADN kép, và sau đó tháo các oligonucleotit sợi kép riêng lẻ để thu được trình tự axit mong muốn. Quá trình tổng hợp de novo các trình tự axit nucleic bao gồm sự điều chỉnh tần suất mà các codon được sử dụng theo sinh vật đích nhất định cũng có thể được cung cấp cho các công ty cung cấp dịch vụ này (ví dụ, Eurofins MWG).

Các đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 2 hoặc SEQ ID NO 3, tốt hơn là có mức tương đồng trình tự ít nhất 85%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 90%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và tốt nhất là mức tương đồng trình tự 100% với SEQ ID NO. 2 hoặc SEQ ID NO 3, tương ứng.

Trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4, polypeptit được đề xuất được chọn từ nhóm

- a) polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này,
- b) đoạn axit nucleic được tối ưu hóa bằng codon được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 5

- c) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự bổ trợ cho SEQ ID NO. 5,
- d) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự lai đặc biệt với đoạn axit nucleic được phân lập nói trên của b) hoặc phân bổ trợ nói trên của c)
- e) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 6
- f) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự bổ trợ cho SEQ ID NO. 6,
- g) đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự lai đặc biệt với đoạn axit nucleic được phân lập nói trên của e) hoặc phân bổ trợ nói trên của f).

Tương tự, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza - ở đây polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 - có thể được mã hóa bằng các trình tự axit nucleic khác nhau. Tương tự, đây là kết quả của sự thoái hóa mã di truyền như được giải thích ở trên.

Tương tự, các đoạn axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự nucleotit có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 6, tốt hơn là có mức tương đồng trình tự ít nhất 85%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 90%, tốt hơn nữa là mức tương đồng trình tự ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và tốt nhất là mức tương đồng trình tự 100% với SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 6, tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thủy phân” là sự phân cắt thủy phân liên kết cacbon-halogen được xúc tác bằng enzym, trong đó halogen được thay thế bằng nhóm hydroxyl. Một số enzym xúc tác quá trình loại halogen thủy phân axit 2-haloalkanoic để tạo ra axit 2-hydroxyalkanoic tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thủy phân chọn lọc” đề cập đến thực tế là một số enzym (tức là polypeptit) xúc tác quá trình thủy phân cho thấy hoạt tính chọn lọc lập thể. Nói cách khác, thông qua quá trình thủy phân chọn lọc, lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R hoặc S được tạo ra tùy thuộc vào sự ưu tiên của enzym.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng dư chất đồng phân đối ảnh” hoặc “giá trị lượng dư chất đồng phân đối ảnh” nghĩa là đại lượng đo độ tinh khiết của các chất bất đối xứng. Nó phản ánh mức độ mà một mẫu chứa một chất đồng phân đối ảnh với lượng lớn hơn so với mẫu kia. Hỗn hợp racemic có lượng dư chất đồng phân đối

ảnh là 0%, trong khi chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ hoàn toàn tinh khiết có lượng dư chất đồng phân đối ảnh là 100%. Mẫu với 70% một chất đồng phân đối ảnh và 30% chất đồng phân đối ảnh khác có lượng dư chất đồng phân đối ảnh là 40% (70% - 30%).

Các phương pháp để xác định giá trị lượng dư chất đồng phân đối ảnh là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, nó có thể được xác định bằng cách sử dụng các thiết bị sắc ký khí, được trang bị cột bất đối xứng.

Do đó, các polypeptit được mô tả ở đây cho thấy hoạt tính chọn lọc lập thể khi xúc tác phản ứng thủy phân. Hoạt tính chọn lọc lập thể này có thể được biểu thị dưới dạng giá trị lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Như nêu trên, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự này cho thấy hoạt tính chọn lọc lập thể đạt được giá trị lượng dư chất đồng phân đối ảnh rất cao.

Sự xác nhận đáng tin cậy về tính phù hợp của một enzym nhất định cho một phản ứng nhất định có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các tham số: chuyển hóa chất nền, tạo thành sản phẩm, lượng dư chất đồng phân đối ảnh (enantiomeric excess) và hiệu suất theo thời gian không gian (space time yield-STY). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hiệu suất theo thời gian không gian" đề cập đến lượng sản phẩm được tạo ra từ nồng độ chất nền nhất định với thể tích cụ thể trong một thời gian xác định.

Trong một số trường hợp, các giá trị hiệu suất theo thời gian không gian được đưa ra ở đây cũng được thiết lập liên quan đến lượng cụ thể của chiết xuất tế bào hoặc của toàn bộ các tế bào được sử dụng trong phản ứng đã nêu (xem ví dụ 3 và 5).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen" nghĩa là trình tự ADN được tạo thành từ các nucleotit bao gồm một vùng (vùng được phiên mã), vùng này được phiên mã thành phân tử ARN (ví dụ, trực tiếp thành mARN không có trình tự intron) trong tế bào, được liên kết theo kiểu hoạt động với các vùng điều hòa có khả năng điều hòa sự biểu hiện của polypeptit. Do đó, một gen có thể bao gồm một số trình tự được liên kết theo kiểu hoạt động, như các vùng điều hòa chưa được dịch mã (ví dụ, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, trình tự kìm hãm), trình tự dẫn đầu 5' bao gồm các trình tự liên quan đến sự bắt đầu dịch mã chẳng hạn, vùng mã hóa (protein) (cADN hoặc ADN

bộ gen) và trình tự không được dịch mã 3' bao gồm các vị trí kết thúc phiên mã chẳng hạn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự biểu hiện của gen" hoặc "biểu hiện gen" chỉ quá trình trong đó vùng ADN (vùng mã hóa), được liên kết theo kiểu hoạt động với các khu vực điều hòa thích hợp, đặc biệt là trình tự khởi đầu, được phiên mã thành phân tử mARN. Sau đó, phân tử mARN được xử lý thêm (bằng các quá trình sau phiên mã) trong tế bào, ví dụ, bằng cách bắt đầu dịch mã và dịch mã thành chuỗi axit amin (polypeptit), và kết thúc dịch mã bằng các codon dừng dịch mã.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kiểu đại" chỉ một dạng điển hình của enzym hoặc gen vì nó thường tồn tại trong tự nhiên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ peptit, polypeptit, oligopeptit hoặc protein bất kỳ. Polypeptit bao gồm các axit amin liên tiếp, được liên kết bởi các liên kết peptit. Polyme có thể là thẳng hoặc phân nhánh, nó có thể bao gồm các axit amin cải biến, và nó có thể bị gián đoạn bởi phi axit amin. Polypeptit có thể là của người, không phải người, và dạng bất chức hóa học hoặc nhân tạo của axit amin tồn tại trong tự nhiên tương ứng, cũng như các polyme axit amin tồn tại trong tự nhiên và polyme axit amin không tồn tại trong tự nhiên. Thuật ngữ này cũng bao gồm polyme axit amin đã được cải biến bởi các quá trình tự nhiên hoặc bằng cách cải biến hóa học; ví dụ, bằng cách tạo thành liên kết disulfua, glycosyl hóa, lipit hóa, axetyl hóa, axyl hóa, phosphoryl hóa, hoặc thao tác bất kỳ khác, như liên hợp với một thành phần đánh dấu, như nhưng không giới hạn ở, các chất đánh dấu huỳnh quang, hạt, biotin, hạt, protein, chất đánh dấu phóng xạ, thẻ phát quang hóa học, chất đánh dấu phát quang sinh học, và các loại tương tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mức tương đồng trình tự" của hai trình tự nucleotit hoặc axit amin liên quan, được biểu thị bằng phần trăm, đề cập đến số lượng vị trí trong hai trình tự được sắp thẳng hàng tối ưu mà có các gốc giống nhau ($\times 100$) chia cho số lượng vị trí được so sánh. Khoảng trống, tức là, một vị trí khi sắp thẳng hàng trong đó một gốc có mặt trong một trình tự nhưng không có trong trình tự khác, được coi là một vị trí có các gốc không giống nhau. "Sắp thẳng hàng tối ưu" hai trình tự được thấy bằng cách sắp thẳng hàng hai trình tự trên toàn bộ chiều dài. Nói cách khác, nếu hai trình tự giống nhau được sắp thẳng hàng, thì giá trị tương đồng trình tự

sẽ là 100%.

Các trình tự được sắp thẳng hàng của các gốc axit amin hoặc nucleotit thường được biểu diễn dưới dạng các hàng trong một ma trận. Các khoảng trống được chèn vào giữa các gốc sao cho các ký tự giống hệt hoặc tương tự được sắp thẳng hàng trong các cột liên tiếp.

Để xác định mức tương đồng trình tự, thuật toán sắp thẳng hàng toàn cầu Needman và Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) của Gói phần mềm nguồn mở sinh học phân tử châu Âu (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276— 277; ví dụ, xem <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) sử dụng cài đặt mặc định (điểm phạt mở khoảng trống = 10 (đối với các nucleotit) / 10 (đối với các protein) và điểm phạt mở rộng khoảng trống = 0,5 (đối với các nucleotit) / 0,5 (đối với các protein)) có thể được sử dụng. Đối với các nucleotit, ma trận cho điểm mặc định được sử dụng là EDNAFULL và đối với các protein, ma trận cho điểm mặc định là EBLOSUM62.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" được dự định để chỉ phân tử axit nucleic sợi đơn hoặc kép bất kỳ bao gồm ADN (cADN và/hoặc ADN bộ gen), ARN (tốt hơn là mARN), PNA, LNA và/hoặc Morpholino.

Thuật ngữ "vector", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ chất dẫn phân tử được sử dụng để chuyển vật liệu di truyền ngoại nhập vào tế bào khác. Bản thân vector nói chung là trình tự ADN mà gồm đoạn chèn (trình tự quan tâm) và trình tự lớn hơn mà có tác dụng như là “khung” của vector. Mục đích của vector để chuyển thông tin di truyền sang một tế bào khác thường là để phân lập, nhân lên, hoặc biểu hiện sự chèn vào trong tế bào đích.

Thuật ngữ “plasmid”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ các vector plasmid, tức là trình tự ADN vòng có khả năng sao chép tự động trong vật chủ thích hợp do nguồn gốc sao chép (“ORI”). Hơn nữa, plasmid có thể bao gồm chất đánh dấu có thể chọn lọc để chỉ ra sự thành công của quá trình biến nạp hoặc các quy trình khác có nghĩa là đưa ADN ngoại lai vào tế bào và vị trí đa tách dòng bao gồm nhiều vị trí liên ứng enzym giới hạn để cho phép chèn đoạn chèn. Các vector plasmid được gọi là vector tách dòng hoặc vector cho được sử dụng để dễ dàng tách dòng và khuếch đại trình tự quan tâm. Các vector plasmid được gọi là vector biểu hiện hoặc vector nhận được dành

riêng cho việc biểu hiện gen quan tâm trong tế bào đích xác định. Các vector plasmit này thường hiển thị cat-xet biểu hiện, bao gồm trình tự khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, gen chuyển và trình tự kết thúc. Để kiểm soát sự biểu hiện, các plasmit này chứa trình tự kim hãm, được định vị trên khung plasmit. Các plasmit biểu hiện có thể là các plasmit con thoi chứa các yếu tố cho phép nhân giống và chọn lọc trong các tế bào chủ khác nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lai đặc trưng” hoặc “lai chọn lọc”, đề cập đến phản ứng của trình tự axit nucleic quan tâm trong dung dịch lai chứa dung dịch đệm natri phosphat 0,5 M, pH 7,2 chứa 7% SDS, EDTA 1 mM và 100 mg/ml ADN tinh trùng cá hồi ở 65°C trong 16 giờ và rửa hai lần ở 65°C trong hai mươi phút trong dung dịch rửa chứa 9,5 x SSC và 0,1% SDS.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được cung cấp dưới dạng dịch dung giải tế bào và/hoặc được bao gồm trong toàn bộ tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “toàn bộ tế bào”, đề cập đến thực tế là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được cung cấp ở dạng tế bào, nó được biểu hiện trong đó, tức là các thành tế bào của các tế bào nói trên không bị phá vỡ một cách có chủ đích.

Toàn bộ tế bào có thể là sinh khối tươi được tạo ra trong quá trình lên men chẳng hạn. Ngoài ra, toàn bộ tế bào có thể được đông lạnh trước khi sử dụng.

Nói cách khác, đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng mặc dù enzym, tức là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên, được biểu hiện bởi toàn bộ tế bào (tái tổ hợp), chỉ có mặt trong tế bào, song độ sinh khả dụng của chất nền là đủ để enzym có thể phản ứng với chất nền trong tế bào.

Đã phát hiện ra rằng các tế bào E. coli được sử dụng để tổng hợp enzym tạo ra

enzym mong muốn với tỷ lệ hàm lượng protein tổng không đổi. Nói cách khác, lượng protein tế bào tổng nhất định (ví dụ, 5 g) luôn bao gồm cùng một lượng nồng độ enzym hòa tan. Cũng vì lý do này, toàn bộ các tế bào có thể được sử dụng trong các thử nghiệm thay vì dịch dung giải tế bào.

Việc sử dụng toàn bộ tế bào có một ưu điểm là không phải sử dụng các phương pháp tốn kém và mất thời gian để cung cấp chiết xuất tế bào.

Theo một phương án, toàn bộ tế bào nói trên là tế bào *E. coli* được chọn từ nhóm MG1655, W3110, JM101, BL21DE3, DH5alpha.

Hơn nữa, *E. coli* được chọn tốt hơn là chứa plasmit của SEQ ID NO. 7 và biểu hiện enzym gồm SEQ ID NO. 1 từ plasmit.

Theo cách khác, *E. coli* được chọn chứa plasmit của SEQ ID NO. 8 và biểu hiện enzym gồm SEQ ID NO. 4 từ plasmit.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được thêm vào raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I lúc bắt đầu phản ứng hoặc polypeptit có hoạt tính dehalogenaza nói trên được thêm vào raxemat của axit alpha haloalkanoic nói trên lúc bắt đầu phản ứng và tại các thời điểm khác nhau trong suốt quá trình phản ứng.

Đáng ngạc nhiên là, các profin liều lượng khác nhau không ảnh hưởng đến hiệu suất của quy trình. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể chọn profin liều lượng thích hợp nhất cho quy trình được đề cập. Đặc tính này của các enzym được yêu cầu bảo hộ mang lại sự linh hoạt tối đa cho việc sử dụng enzym trong quy trình sản xuất nhất định.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được thêm vào raxemat của axit alpha haloalkanoic nói trên lúc bắt đầu phản ứng và tại các thời điểm khác nhau trong suốt quá trình phản ứng, trong đó nồng độ của polypeptit được thêm vào là giống nhau tại mỗi thời điểm.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự với mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được thêm vào raxemat của axit alpha haloalkanoic nói trên lúc bắt đầu phản ứng và tại các thời điểm khác nhau trong suốt quá trình phản ứng, trong đó nồng độ của polypeptit được thêm vào khác nhau tại các thời điểm khác nhau.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, raxemat được thêm vào polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự này hoặc polypeptit có hoạt tính dehalogenaza nói trên được thêm vào raxemat.

Trong trường hợp raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên được thêm vào polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự này, tốt hơn là tất cả raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên được thêm vào lúc bắt đầu phản ứng, trong đó độ pH của raxemat được tối ưu hóa cho các điều kiện phản ứng trước khi thêm.

Đáng ngạc nhiên là, không có ảnh hưởng nào đối với hiệu suất của quy trình cho dù raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên, tức là chất nền được thêm vào polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự này hay cho dù polypeptit có hoạt tính dehalogenaza nói trên được thêm vào raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên hay không.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, một trong hai polypeptit có hoạt tính dehalogenaza như được mô tả ở đây được cung cấp dưới dạng toàn bộ tế bào ở độ pH 9,5 và raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên được thêm vào polypeptit, trong đó raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I cũng được cung cấp ở pH 9,5 và pH 9,5 được giữ không đổi trong suốt quá trình phản ứng thông qua việc chuẩn độ bằng bazơ thích hợp.

Ví dụ, bazơ thích hợp có thể được chọn từ nhóm bao gồm KOH hoặc NaOH.

Theo một số phương án của phương pháp được mô tả ở đây, nồng độ của raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên là từ 80 đến 200 g/L, tốt hơn là từ 90 đến 150 g/L, tốt nhất là 100 g/L. Nói cách khác, nồng độ của raxemat của axit alpha haloalkanoic tốt hơn là được chọn theo cách có thể đạt được sự chuyển hóa hoàn toàn.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự này được cung cấp dưới dạng toàn bộ tế bào hoạt động và sinh khối của toàn bộ tế bào hoạt động nói trên có nồng độ nằm trong khoảng 15-200 g/L, tốt hơn là nằm trong khoảng 25-100 g/L.

Theo một số phương án của phương pháp được mô tả ở đây, tỷ lệ của raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I trên sinh khối của toàn bộ tế bào bao gồm polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên nằm trong khoảng từ 2:1 đến 15:1, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3:1 đến 10:1, tốt nhất là 4:1.

Vì polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được ức chế bởi nồng độ chất nền cao hơn, tỷ lệ chất nền - tức là axit alpha haloalkanoic theo công thức I - trên enzym - tức là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên được bao gồm trong toàn bộ tế bào và do đó được cung cấp dưới dạng sinh khối - tăng với nồng độ chất nền thấp hơn.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, halogen X của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên được chọn từ nhóm bao gồm brom và clo.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, nhóm R của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên là mạch alkyl gồm 1 đến 6 nguyên tử cacbon, trong đó mạch alkyl nói trên là các nguyên tử cacbon gama hoặc delta, và

trong đó các nguyên tử cacbon theo nhánh tại các nguyên tử cacbon γ hoặc δ là vòng.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, nhóm R của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên được chọn từ nhóm bao gồm etyl, butyl, 2-metyl-propyl và metyl-xyclopropyl.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, giá trị pH được giữ không đổi thông qua việc chuẩn độ bằng bazơ thích hợp như kali hydroxit hoặc natri hydroxit.

Thấy rằng các điều kiện phản ứng có thể dễ dàng tăng quy mô thể tích phản ứng trong khoảng từ 1 ml đến vài 1000 lít là có thể.

Theo một phương án của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên là dehalogenaza haloaxit.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự SEQ ID NO. 1 và phản ứng với chất nền raxemic được chọn từ nhóm gồm axit 2-clo butyric, axit 2-bromo-hexanoic, axit 2-bromo-4-metyl pentanoic và axit 2-bromo-3-xyclopropyl-propanoic.

Theo một phương án được ưu tiên khác của phương pháp được mô tả ở đây, polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự SEQ ID NO. 4 và phản ứng với chất nền raxemic được chọn từ nhóm gồm axit 2-clo butyric, axit 2-flo butyric, axit 2-bromo-hexanoic và axit 2-bromo-4-metyl pentanoic.

Sau quá trình thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic được chọn, chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh đã được thủy phân có mặt dưới dạng hỗn hợp. Đối với một số ứng dụng, có lợi khi chỉ thu được, tức là tinh chế chất đồng phân đối ảnh R. Do đó, hỗn hợp gồm chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh đã được thủy phân của axit alpha haloalkanoic theo công thức I được chọn được xử lý tiếp.

Khía cạnh khác được mô tả ở đây đề cập đến việc sử dụng phương pháp được mô tả ở đây để thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic nói trên, trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân

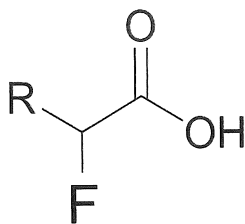
đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90,0 đến 99,9.

Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên để tiếp xúc raxemat bao gồm chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức I, trong đó X là halogen, trong trường hợp SEQ ID NO. 1, halogen khác với flo, và R là mạch alkyl chứa tối đa 6 nguyên tử cacbon trong đó mạch alkyl nói trên có thể thẳng hoặc phân nhánh ở các nguyên tử cacbon γ hoặc δ trong 1-8 giờ, trong đó độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 15-35°C đối với polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C đối với polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4, polypeptit nói trên sẽ thực hiện quá trình thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic nói trên, trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90,0 đến 99,9.

Kết quả này là bất ngờ vì tỷ lệ lượng dư chất đồng phân đối ảnh cao như vậy là rất bất thường, đặc biệt là do polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 đạt được giá trị lượng dư chất đồng phân đối ảnh là 90-99 trong thời gian phản ứng rất ngắn là 1-8 giờ.

Do đó, đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với các trình tự nói trên với các điều kiện được mô tả cho phép một phương pháp thay thế, an toàn hơn và hiệu quả hơn về chi phí và thời gian để cho phép và/hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách chất đồng phân đối ảnh R và S của axit alpha haloalkanoic có công thức I dựa vào đặc tính phản ứng khác nhau của hai chất đồng phân đối ảnh này với polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với một trong các trình tự nói trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh của axit alpha haloalkanoic theo công thức II,



trong đó

R là mạch alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, trong đó mạch alkyl này có thể là thẳng hoặc phân nhánh tại các nguyên tử cacbon γ hoặc δ ,

bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự này.

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự nói trên thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic có công thức II, tức là bao gồm một nguyên tử flo, một cách rất hiệu quả và với lượng dư chất đồng phân đối ảnh cao.

Tốt hơn là, phương pháp được mô tả ở trên sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 được thực hiện ở 55-65°C và ở độ pH 9,5.

Do đó, trong trường hợp polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự nói trên, ngoài các axit alpha haloalkanoic nêu trên còn có axit 2-flo butyric được đặc biệt ưu tiên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 80% với trình tự nói trên để thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic có công thức II, trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R nằm trong khoảng từ 90,0 đến 99,9.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này được tiến hành như sau

polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 được thêm vào axit 2-bromobutanoic ở nhiệt độ trong phòng ở pH 9,5. Phản ứng này được phép tiến hành trong 4-6 giờ, trong khi giá trị pH được giữ không đổi thông qua việc chuẩn độ bằng kali hydroxit 3 M.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, phương pháp này được tiến hành như sau 10 mg/ml protein tế bào tổng ở dạng chiết xuất tế bào chứa polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 được thêm vào 100 g/l axit 2-bromobutanoic ở nhiệt độ trong phòng, ở pH 9,5 và trong thể tích phản ứng là 6L. Phản ứng này được phép tiến hành trong 4-6 giờ, trong khi giá trị pH được giữ không đổi thông qua việc chuẩn độ bằng kali hydroxit 3 M.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp này được tiến hành như sau polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 được thêm vào axit 2-bromobutanoic ở nhiệt độ 55°C, pH 9,5. Phản ứng này được phép tiến hành trong 4-6 giờ, trong khi giá trị pH được giữ không đổi thông qua việc chuẩn độ bằng kali hydroxit 3 M.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên khác, phương pháp này được tiến hành như sau 10 mg/ml protein tế bào tổng ở dạng chiết xuất tế bào chứa polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4 được thêm vào axit 2-flo butyric ở nhiệt độ 55°C, pH 9,5.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sàng lọc hoạt tính của dehalogenaza haloaxit được chọn

Dehalogenaza haloaxit khác nhau từ P. putida AJ, P. putida 109 và S. tokodaii 7 (Jones et al., 1992 (J Gen Microbiol. 1992 Apr; 138(4):675-83, Kawasaki et al., 1994 Biosci Biotechnol Biochem. 1994 Jan; 58(1):160-3 và Bachas-Daunert et al., 2009 Appl Biochem Biotechnol. 2009 Nov; 159(2):382-93) được tách dòng thành E. coli MG1655 và được biểu hiện quá mức thông qua việc xử lý IPTG. 50 g/L axit 2-bromobutyric được sử dụng làm chất nền và 2 x 1,6 g/L dịch dung giải tế bào được thêm vào lúc bắt đầu phản ứng và sau 3,5 giờ, trong khi độ pH là 9 và nhiệt độ được đặt ở 37°C.

Hoạt tính và tính chọn lọc lập thể - tức là sự thủy phân ưu tiên của chất đồng

phân đổi ảnh S - được chứng minh đối với cả ba enzym thông qua phân tích bằng cách sử dụng sắc ký khí với enzym từ *P. putida* AJ (SEQ ID NO. 1) cho thấy tính chọn lọc cao nhất đạt được giá trị ee lớn hơn 90%.

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của độ pH đến kết quả phản ứng

Để kiểm tra khoảng pH tối ưu, các điều kiện phản ứng được đặt là:

- 100 g/L axit 2-bromobutyric (chất nền)
- 1,5 g/L dịch dung giải tế bào của *E. coli* biểu hiện dehalogenaza haloaxit *P. putida* AJ (SEQ ID NO. 1) (6 lần, mỗi giờ)
- Glyxin 20mM
- Nhiệt độ: 25°C
- pH: giữ không đổi ở 8,0, 9,0, 10,0

Như được thể hiện trên Fig.2, các kết quả tốt nhất đạt được với độ pH nằm trong khoảng 9-10.

Ví dụ 3: Tối ưu hóa hơn nữa quá trình loại halogen chọn lọc để tạo ra lượng dư chất đồng phân đổi ảnh cao bằng cách sử dụng dehalogenaza haloaxit của *P. putida* AJ, tức là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm SEQ ID NO. 1

Trong trường hợp thứ nhất, 100g/l rax-axit 2-bromobutyric trong glyxin 10 mM được sử dụng làm chất nền. Phản ứng được thực hiện ở 25°C mặc dù nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính của enzym là 37°C do chất nền ổn định hơn ở 25°C so với 37°C và do đó ngăn chặn quá trình tự thủy phân (dữ liệu không được hiển thị)

Enzym được cung cấp dưới dạng dịch dung giải tế bào và được thêm vào lúc bắt đầu phản ứng hoặc mỗi giờ với nồng độ 2 mg/ml. Độ pH được giữ không đổi ở mức 9,5 thông qua việc chuẩn độ bằng KOH 3 M cho đến khi hoàn thành phản ứng sau khoảng 4 giờ. Sau đó, pH được điều chỉnh thành pH 1,5 bằng H₂SO₄ đặc và mảnh tế bào được lọc qua xelit. Việc chiết được thực hiện với MTBE và rửa để loại bỏ axit 2-hydroxybutyric còn lại được thực hiện với dung dịch nước CuSO₄. Cuối cùng, việc cô đặc được thực hiện trong chân không.

Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng phản ứng đạt được giá trị tỷ lệ lượng dư chất đồng phân đổi ảnh đáng tin cậy lớn hơn 99% (dữ liệu không được hiển thị).

Các tỷ lệ lượng dư chất đồng phân đối ảnh cao này, tức là sau phản ứng chỉ có mặt chất đồng phân đối ảnh R của axit alpha haloalkanoic và sản phẩm được hydroxyl hóa của chất đồng phân đối ảnh S trước đó của axit alpha haloalkanoic, làm cho quá trình này trở nên thu hút để sử dụng trên quy mô công nghiệp lớn.

Ví dụ 4: Chuyển hóa với toàn bộ tế bào

Đáng ngạc nhiên là, đã phát hiện được rằng thay vì chuẩn bị dịch dung giải tế bào, toàn bộ các tế bào có thể được sử dụng để chuyển hóa. Điều này có lợi thế là bước tiêu tốn thời gian để chuẩn bị dịch dung giải tế bào (vô trùng) có thể được bỏ qua.

Trong trường hợp thứ nhất, axit 2-bromo butyric racemic với nồng độ 100 g/L được sử dụng làm chất nền. Các thông số phản ứng được đặt ở 150 ml, 25°C, 500 vòng/phút, đệm glyxin 20 mM và pH 9,5. Độ pH được giữ không đổi bằng cách sử dụng KOH 3 M. Bình phản ứng được chuẩn bị với hỗn hợp chất nền và phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm enzym, tức là thêm toàn bộ tế bào của *E. coli* MG1655 biểu hiện enzym dehalogenaza từ *P. putida* AJ, tức là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm SEQ ID NO. 1. Các tế bào được thêm vào lúc bắt đầu phản ứng hoặc từng bước sau 1, 2 và 3 giờ, với nồng độ tương ứng là 8,3 g/L (xem Fig.3). Nồng độ cuối của toàn bộ tế bào chứa enzym là 25g/L hoặc 50 g/L. Phản ứng được hoàn thành sau 4 giờ. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3 và bảng dưới đây chứng minh rằng lý tưởng nhất là phản ứng được thực hiện trong hơn 1 giờ, ví dụ, trong 4 giờ.

Mẫu	T[giờ]	%ee
25 g/L sinh khối	1	62
25 g/L sinh khối	3	89
25 g/L sinh khối (nạp)	1	52
25 g/L sinh khối (nạp)	3	90

Sau đó, phản ứng được lặp lại nhưng sinh khối bao gồm các tế bào *E. coli* MG1655 biểu hiện enzym dehalogenaza từ *P. putida* AJ, tức là polypeptit có hoạt tính

dehalogenaza bao gồm SEQ ID NO. 1 được thêm vào bình phản ứng trước khi thêm chất nền. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4 và Bảng dưới đây. Các kết quả này chứng minh rằng trước tiên có thể cung cấp enzym dưới dạng sinh khối bao gồm toàn bộ tế bào và thêm chất nền vào sinh khối nói trên.

t[giờ]	%ee
1	61
2	78
3	88

Hơn nữa, việc chuyển hóa được thực hiện bằng cách sử dụng canh trường lên men. Một lần nữa, E. coli MG1655 chứa plasmid pKA81a-HADH-PP-AJ được sử dụng để biểu hiện enzym dehalogenaza, tức là polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm SEQ ID NO. 1. Quá trình tạo enzym được thực hiện bằng cách lên men E. coli trong môi trường tối thiểu bằng cách sử dụng quy trình chuẩn. Sau khi biểu hiện gen, đạt được nồng độ tế bào là 100 g/L. Sau đó, các biến đổi sinh học được thực hiện với canh trường lên men không được xử lý. Canh trường lên men được làm nguội xuống 25°C và độ pH được điều chỉnh thành 9,5 bằng cách thêm KOH 3 M. Phản ứng dehalogenaza được bắt đầu bằng cách thêm hỗn hợp chất nền chứa 100 g/L axit 2-bromobutyric, 0,5 thể tích (thể tích/thể tích) đệm glyxin ở pH 9,5 và 2 thể tích (thể tích/thể tích) KOH 5 M. Phản ứng đạt được sự chuyển hóa hoàn toàn, tức là 90% ee sau 1 giờ (xem Fig.5).

Từ hỗn hợp thu được gồm axit hydroxybutyric và axit R-2-Bromobutyric, khoảng 30% axit R-2-Bromobutyric tinh khiết có thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn như axit hóa và chiết.

Ví dụ 5: Thử nghiệm các chất nền khác

Ngoài axit 2-bromobutyric, các chất nền khác được thử nghiệm và các kết quả được nêu dưới đây

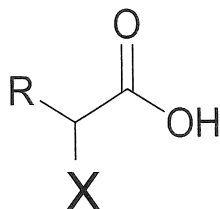
Chất nền	Axit 2-clo	Axit 2-flo	Axit 2-bromo-	Axit 2-bromo-4-metyl	Axit 2-bromo-3-xyclopropyl-
Enzym	butyric	butyric	hexanoic	pentanoic	propanoic
P. putida AJ SEQ ID NO. 1	Có	Không	Có;	Có;	Có;
P. putida 109	Có	Không	Không	Có	Có
S. sulfolobus SEQ ID NO. 4	Có	Có	Có	Có	Không xác định

Ví dụ 6: Tăng quy mô

Điều kiện tiên quyết để tăng quy mô phản ứng lên 2000 lít là phát hiện ra rằng các enzym có thể được sử dụng được bao gồm trong toàn bộ tế bào được cung cấp dưới dạng sinh khối mà không cần phải chuẩn bị dịch dung giải tế bào. Do đó, các bước chuẩn bị tốn thời gian và tốn kém như lọc dịch dung giải tế bào, các bước này không khả thi về mặt kinh tế trên quy mô lớn, có thể được bỏ qua. Hơn nữa, việc phát hiện ra rằng phản ứng có thể được bắt đầu bằng cách thêm chất nền (raxemat) hoặc sinh khối chứa enzym trong toàn bộ tế bào có nghĩa là thiết bị có thể được sử dụng với độ linh hoạt tối đa. Để điều chỉnh thêm cho quá trình này, KOH được sử dụng để chuẩn độ pH (xem ở trên) được trao đổi với NaOH 50%, dung môi để chiết sản phẩm được thay đổi từ MTBE thành MIBK và CuSO₄ được sử dụng để loại bỏ các sản phẩm phụ được trao đổi cho CaCl₂ để loại bỏ chất thải dễ dàng hơn và rẻ hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức I,



trong đó X là brom hoặc clo và

R là mạch alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, trong đó mạch alkyl này là thẳng hoặc phân nhánh tại các nguyên tử cacbon γ hoặc δ ,

phương pháp này bao gồm các bước:

- tạo ra raxemat gồm chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic nói trên,
- tạo ra polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1,
- cho raxemat phản ứng trong 1-8 giờ, trong đó

độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 15-35°C đối với polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1,

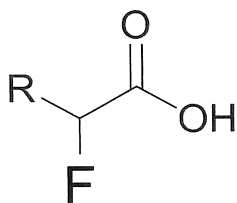
và trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R của axit haloalkanoic nằm trong khoảng từ 90,0% đến 99,9% đạt được sau 1-8 giờ, và trong đó nồng độ của raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I nói trên nằm trong khoảng từ 80 đến 200 g/L và polypeptit có hoạt tính dehalogenaza được bao gồm trong toàn bộ tế bào.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ của raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức I trên sinh khối của toàn bộ tế bào bao gồm polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có mức tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự nói trên nằm trong khoảng từ 2:1 đến 15:1.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhóm R của axit alpha haloalkanoic có công thức I nói trên được chọn từ nhóm gồm etyl, butyl, 2-metyl-propyl và metyl-xyclopropyl.

4. Phương pháp theo điểm 1 để thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic có công thức I từ raxemat, trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R còn lại của axit alpha haloalkanoic nằm trong khoảng từ 90,0% đến 99,9%.

5. Phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic theo công thức II,



trong đó

R là mạch alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, trong đó mạch alkyl này là thẳng hoặc phân nhánh tại các nguyên tử cacbon γ hoặc δ , và F là nguyên tử flo đơn, phương pháp này bao gồm các bước:

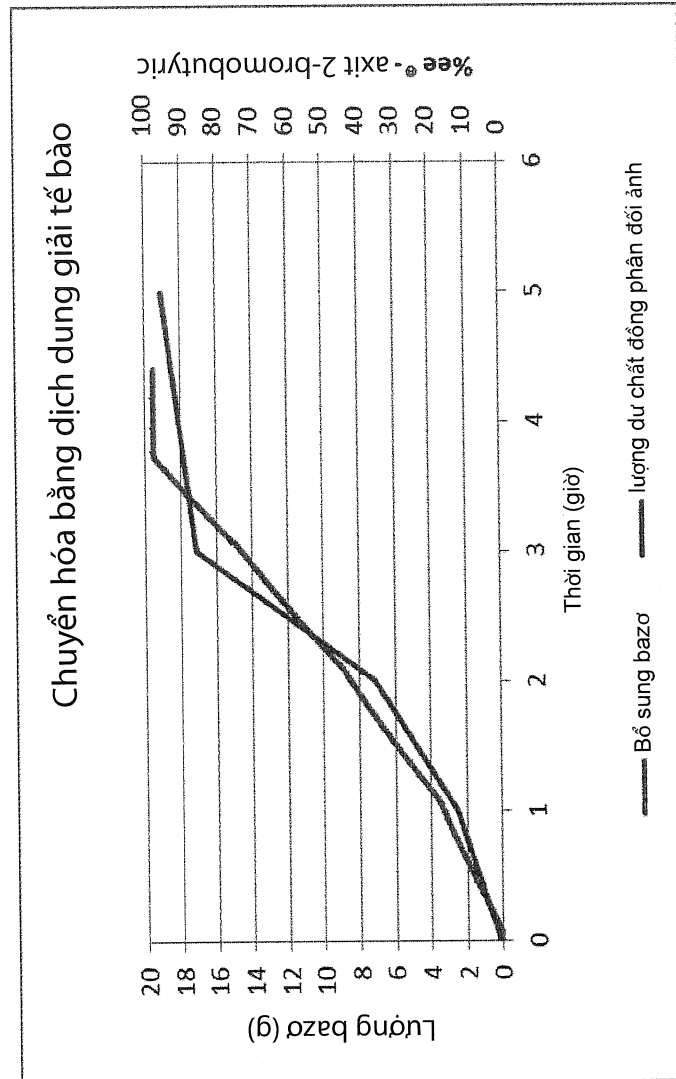
- tạo ra raxemat gồm chất đồng phân đối ảnh R và chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic nói trên,
- tạo ra polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4,
- cho raxemat phản ứng trong 1-8 giờ, trong đó độ pH nằm trong khoảng 9-10 và nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C đối với polypeptit có hoạt tính dehalogenaza bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO. 4,

trong đó lượng dư chất đồng phân đối ảnh của chất đồng phân đối ảnh R của axit haloalkanoic nằm trong khoảng từ 90,0% đến 99,9% đạt được sau 1-8 giờ, và trong đó nồng độ của raxemat của axit alpha haloalkanoic theo công thức II nói trên nằm trong khoảng từ 80 đến 200 g/L và polypeptit có hoạt tính dehalogenaza được bao gồm trong toàn bộ tế bào.

6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3:1 đến 10:1.
7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó tỷ lệ là 4:1.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó X là brom.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó X là clo.
10. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nhóm R của axit alpha haloalkanoic có công thức I nói trên là etyl.
11. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nhóm R của axit alpha haloalkanoic có công thức I nói trên là butyl.
12. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nhóm R của axit alpha haloalkanoic có công thức I nói trên là 2-metyl-propyl.
13. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nhóm R của axit alpha haloalkanoic có công thức I nói trên là metyl-xyclopropyl.

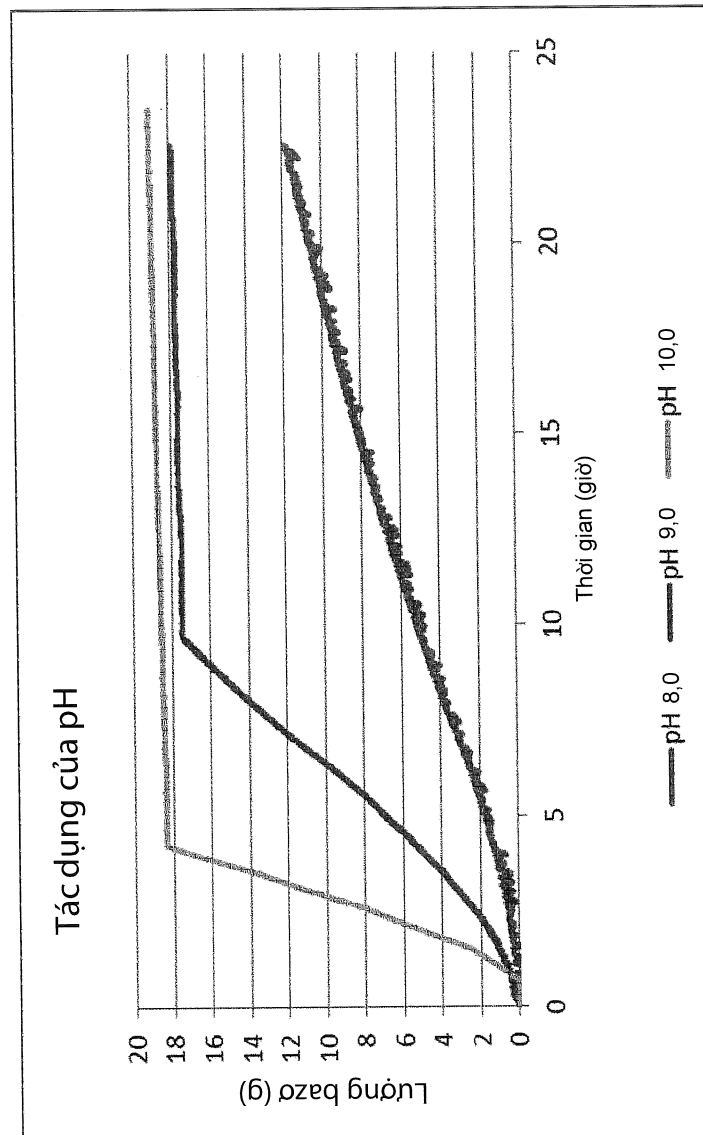
-1/5-

Fig. 1



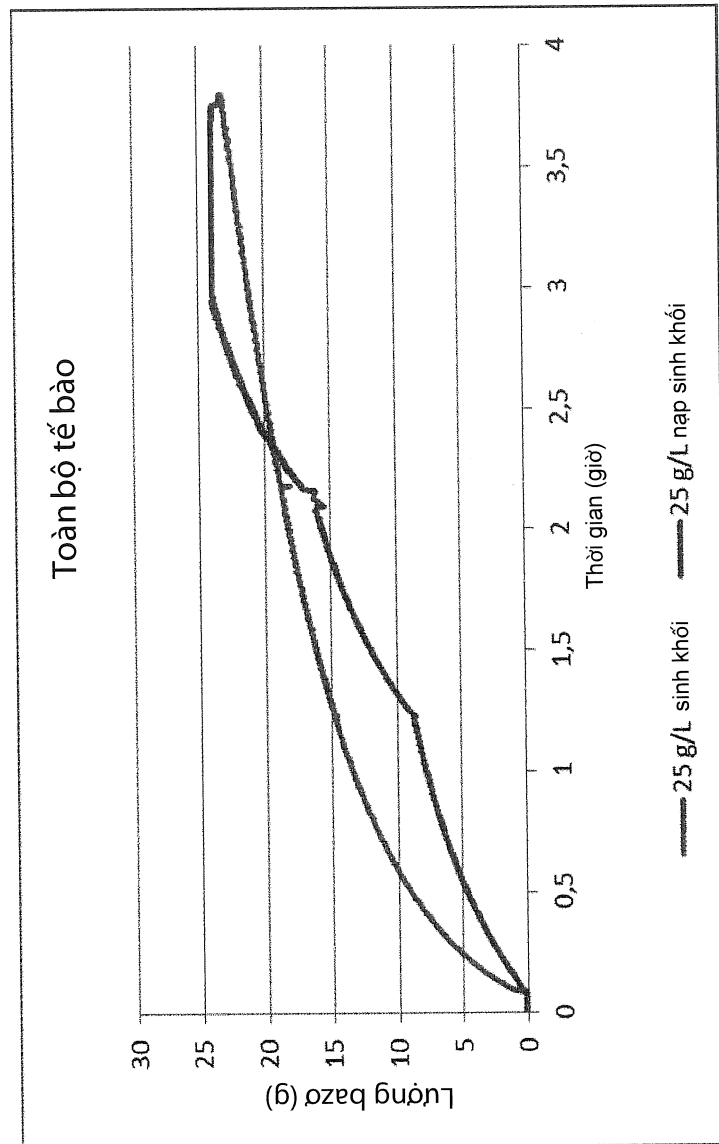
-2/5-

Fig. 2



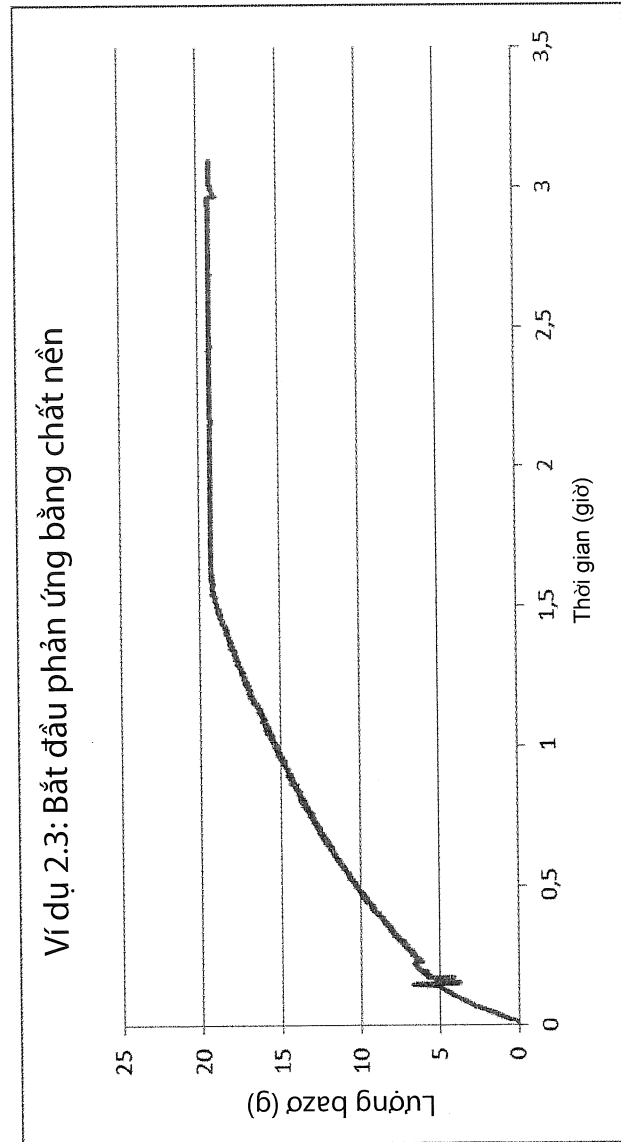
-3/5-

Fig. 3



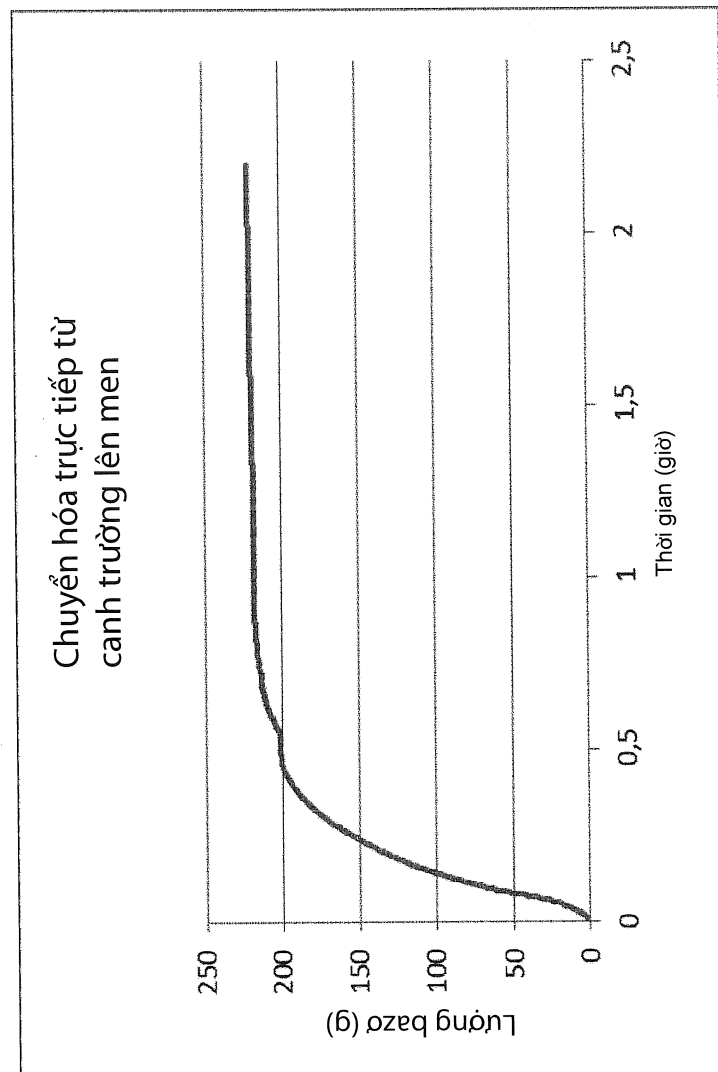
-4/5-

Fig. 4



-5/5-

Fig. 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Bayer Aktiengesellschaft

<120> Phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối ảnh S của axit alpha haloalkanoic

<130> BTS173006

<160> 8

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> Pseudomonas Putida AJ1

<400> 1

Met	Lys	Asn	Ile	Gln	Gly	Ile	Val	Phe	Asp	Leu	Tyr	Gly	Thr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

Asp	Val	His	Ser	Val	Val	Gln	Ala	Cys	Glu	Glu	Val	Tyr	Pro	Gly	Gln
			20					25					30		

Gly	Asp	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Tyr	Thr
		35					40					45			

Trp	Leu	Arg	Ser	Leu	Met	Gly	Arg	Tyr	Val	Asn	Phe	Glu	Lys	Ala	Thr
	50					55					60				

Glu	Asp	Ala	Leu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	His	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Asp
65					70					75					80

Asp	Glu	Thr	His	Gln	Arg	Leu	Ser	Asp	Ala	Tyr	Leu	His	Leu	Thr	Pro
				85					90					95	

Tyr	Ala	Asp	Thr	Ala	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu
			100					105					110		

Pro	Leu	Gly	Ile	Ile	Ser	Asn	Gly	Ser	His	Cys	Ser	Ile	Glu	Gln	Val
		115					120					125			

Val	Thr	Asn	Ser	Glu	Met	Asn	Trp	Ala	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Ser	Val
	130					135					140				

Glu	Asp	Val	Gln	Val	Phe	Lys	Pro	Asp	Ser	Arg	Val	Tyr	Ser	Leu	Ala
145					150					155					160

Glu Lys Arg Met Gly Phe Pro Lys Glu Asn Ile Leu Phe Val Ser Ser
 165 170 175

Asn Ala Trp Asp Ala Ser Ala Ala Ser Asn Phe Gly Phe Pro Val Cys
 180 185 190

Trp Ile Asn Arg Gln Asn Gly Ala Phe Asp Glu Leu Asp Ala Lys Pro
 195 200 205

Thr His Val Val Arg Asn Leu Ala Glu Met Ser Asn Trp Leu Val Asn
 210 215 220

Ser Leu Asp
 225

<210> 2
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas Putida AJ1

<400> 2
 atgaagaaca ttcagggcat tgtgtttgac ctctatggta cgctgtatga cgtacacagc 60
 gtcgttcaag cgtgtgaaga agtttaccct ggtcaaggcg atgcgatttc ccgtttgtgg 120
 cgtcagaaac agctggaata cacgtgggtg cggtccttga tgggacgcta tgtcaacttc 180
 gagaaagcga ctgaggatgc gttacgcttt acctgtacgc acctgggtct gtcccttgac 240
 gacgaaaccc atcaacgtct gagcgatgcc tatctccacc tgactccgta cgcagataca 300
 gccgatgcag ttcgtcgggt aaaagccgca ggcttaccac tggggatcat cagcaatggc 360
 agtcattgca gcattgaaca ggtggtaacc aactcggaaa tgaactgggc tttcgatcag 420
 ctgatttcgg tcgaagatgt ccaggtgttc aaacccgatt ctgcggtgta ttactggcg 480
 gagaaacgca tgggctttcc gaaggagaac atcctcttcg tgagttcgaa tgcttgggat 540
 gcgtcagctg cctctaactt tgggtttccg gtttgctgga tcaatcgcca gaatggtgcg 600
 tttgacgaac tggatgccaa accgacccat gtggtacgca atctggcaga aatgagcaat 660
 tggcttgtga acagtctgga ctaa 684

<210> 3
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas Putida AJ1

<400> 3
 atgaaaaaca tccaaggtat cgttttcgat ttgtatggca cgctctacga cgtgcattcc 60

```

gtggtgcaag cctgtgaaga ggtctatccg ggccaaggcg acgctatttc tgcctctgg      120
cggcaaaagc aattggaata cacctggctc aggagcctca tgggccgtta cgtgaacttt      180
gagaaagcaa cagaggatgc cttgcgcttt acctgcacgc atctgggctt gtcgctcgat      240
gatgaaaccc accagcgcct cagtgatgct tatttgcacc tcacccctta tgccgataca      300
gctgacgccg ttgcgcgttt gaaagctgcg ggcctaccgc taggcatcat ttcaaattgg      360
tctcattgct cgatcgagca agtcgtgact aactctgaaa tgaattgggc gttcgatcag      420
ctgatcagcg tcgaggatgt gcaagtgttc aaacctgata gtcgcgtcta tagccttgcc      480
gagaagcgca tgggtttttcc aaaggaaaac atcctcttcg tttcgtcaaa cgcgtgggat      540
gcgagtgcag ccagtaactt tggttttccg gtttgctgga tcaatcggca gaacggcgcg      600
tttgatgagc tggatgcaaa gccgacacac gtcgtgcgta atctcgccga aatgtcgaac      660
tggctggtta attcgctcga ttaa                                           684

```

```

<210> 4
<211> 201
<212> PRT
<213> Sulfolobus tokodaii 7

```

```
<400> 4
```

```

Met Ile Ile Leu Ala Phe Asp Ile Phe Gly Thr Val Leu Asp Thr Ser
1           5           10           15

```

```

Thr Val Ile Gln Glu Phe Arg Asn Lys Gln Leu Glu Tyr Thr Trp Leu
20           25           30

```

```

Leu Thr Ile Met Gly Lys Tyr Val Glu Phe Glu Glu Ile Thr Lys Ile
35           40           45

```

```

Thr Leu Arg Tyr Ile Leu Lys Val Arg Gly Glu Glu Ser Lys Phe Asp
50           55           60

```

```

Glu Glu Leu Asn Lys Trp Lys Asn Leu Lys Ala Tyr Glu Asp Thr Lys
65           70           75           80

```

```

Tyr Leu Lys Glu Ile Ser Glu Ile Ala Glu Val Tyr Ala Leu Ser Asn
85           90           95

```

```

Gly Ser Ile Asn Glu Val Lys Gln His Leu Glu Arg Asn Gly Leu Leu
100          105          110

```

Arg Tyr Phe Lys Gly Ile Phe Ser Ala Glu Ser Val Lys Glu Tyr Lys
 115 120 125

Pro Ser Pro Lys Val Tyr Lys Tyr Phe Leu Asp Ser Ile Gly Ala Lys
 130 135 140

Glu Ala Phe Leu Val Ser Ser Asn Ala Phe Asp Val Ile Gly Ala Lys
 145 150 155 160

Asn Ala Gly Met Arg Ser Ile Phe Val Asn Arg Lys Asn Thr Ile Val
 165 170 175

Asp Pro Ile Gly Gly Lys Pro Asp Val Ile Val Asn Asp Phe Lys Glu
 180 185 190

Leu Tyr Glu Trp Ile Leu Arg Tyr Lys
 195 200

<210> 5
 <211> 606
 <212> ADN
 <213> Sulfolobus tokodaii 7

<400> 5
 atgatcattc tggcctttga tatctttggt actgtactcg atacatctac cgttatccag 60
 gaatttcgca acaaacaact ggagtatact tggctgctga cgattatggg caaatacgtg 120
 gaatttgagg aaatcaccaa aattacgtta cgctatatcc tgaaagttcg tgggtgaagaa 180
 tcgaagtttg acgaagaact gaacaaatgg aagaacctga aagcgtatga agatacaaaa 240
 taccttaaag agatttcgga aattgccgaa gtttatgcmc tgtcaaatgg gagtattaac 300
 gaagtgaaac agcatttgga acgtaatggg ttacttcggt acttcaaagg cattttctcc 360
 gcagaaagcg ttaaagagta caaaccgagt ccgaaagtgt ataagtactt tctggatagc 420
 attggtgcga aagaagcctt cttggtatct agcaacgcat tcgatgtgat tggcgctaag 480
 aatgctggta tgcgttccat ctttgtcaat cgcaagaaca ccattgtcga tcctatcggc 540
 ggaaaaccag acgtgatcgt caatgacttc aaagagctgt atgagtggat tctccgctat 600
 aaataa 606

<210> 6
 <211> 606
 <212> ADN
 <213> Sulfolobus tokodaii 7

<400> 6

atgatcattc tagcatttga tatcttcgga acagttcttg atacatctac ggtaattcaa 60
 gagtttagga ataagcaatt agagtataca tggttactta caataatggg gaaatatgtg 120
 gaatttgagg aaataacaaa gattacttta agatacatct taaaggtaag aggcgagag 180
 agcaaatttg atgaggagtt aaataagtgg aagaatctta aagcttatga agatactaaa 240
 tattttaaagg aaatatctga gatagccgag gtctacgctg tatctaacgg gtctataaat 300
 gaggttaaagc aacattttaga gcgcaatggg ttgttaagat attttaaggg catatttagt 360
 gcagaaagtg ttaaagaata taaaccttca cctaaagtat acaaataattt cctagactcg 420
 ataggagcta aagaagcatt cttagtttca tcaaatgcat ttgacgtcat aggagctaaa 480
 aacgcgggta tgaggagtat attcgtaaag aggaagaata caatagtcga tcctataggt 540
 ggcaaacctg atgttatagt aaatgacttc aaagagttat atgaatggat tttgcgatat 600
 aagtga 606

<210> 7
 <211> 4515
 <212> ADN
 <213> plasmit pKA81a-HADH-PP-AJ

<400> 7
 ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
 accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
 taggatggca agatcctggg atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
 tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgacgac 240
 tgaatccggg gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca 300
 gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaa ccgttattca ttcgtgattg 360
 cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480
 ttcttctaag acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 540
 atcaggagta cggataaaat gcttgatggg cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
 tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cttttgccat gtttcagaaa 660
 caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc 720
 attatcgga gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgagg 780
 cctagagcaa gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat 840
 gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 900

gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 960
 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggttgt ttgccggatc 1020
 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata 1080
 ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 1140
 catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1200
 ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 1260
 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 1320
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 1380
 taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt 1440
 atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgatct ttgtgatgct 1500
 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc gcccttttta cggttcctgg 1560
 ccttttgctg gcccttttgc cacatgttct ttctgcgtt atccctgat tctgtggata 1620
 accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca 1680
 gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 1740
 tgtgcggtat ttcacaccgc aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 1800
 gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 1860
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 1920
 caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 1980
 cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 2040
 gcctgttcat ccggtccag ctggttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 2100
 ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tctgttttg tctactgatgc ctccgtgtaa 2160
 gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata 2220
 cgggttactg atgatgaaca tgcccgttga ctggaacgtt gtgagggtaa acaactggcg 2280
 gtatggatgc ggccgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg ctcatgagcc 2340
 cgaagtggcg agcccgatct tcccacatcg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg 2400
 cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatccatt 2460
 tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggtg tggcatgata gcgcccggaa 2520
 gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat 2580
 gccggtgtct cttatcagac cgtttccgc gtgggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg 2640
 aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg 2700

gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc 2760
ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc 2820
agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtogaag cctgtaaagc ggcggtgcac 2880
aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat 2940
gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac 3000
cagacacca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact ggcgctggag 3060
catctggctg cattgggtca ccagcaaata gcgctgttag cgggccatt aagttctgtc 3120
tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctgcfaatca aattcagccg 3180
atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaata 3240
ctgaatgagg gcatcggtcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc 3300
gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga 3360
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atcccgcgt taaccaccat caaacaggat 3420
tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg 3480
gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcttga 3540
gaaatcataa aaaatttatt tgctttgtga gcggataaca attataatag attcaattgt 3600
gagcggataa caatttcaca catctagaaa taattttgtt taactttaag aaggagatat 3660
catatgaaga acattcaggg cattgtgttt gacctctatg gtacgctgta tgacgtacac 3720
agcgtcgttc aagcgtgtga agaagtttac cctggtcaag gcgatgcgat ttcccgtttg 3780
tggcgtcaga aacagctgga atacacgtgg ttgcgttcct tgatgggacg ctatgtcaac 3840
ttcgagaaag cgactgagga tgcgttacgc ttacctgta cgcacctggg tctgtccctt 3900
gacgacgaaa cccatcaacg tctgagcgat gcctatctcc acctgactcc gtacgcagat 3960
acagccgatg cagttcgtcg gttaaaagcc gcaggcttac cactggggat catcagcaat 4020
ggcagtcatt gcagcattga acaggtggta accaactcgg aaatgaactg ggctttcgat 4080
cagctgattt cggctgaaga tgtccagggt ttcaaaccg attctcgcgt gtattcactg 4140
gcggagaaac gcatgggctt tccgaaggag aacatcctct tcgtgagttc gaatgcttgg 4200
gatgcgtcag ctgcctctaa ctttgggttt ccggtttgct ggatcaatcg ccagaatggt 4260
gcgtttgacg aactggatgc caaaccgacc catgtggtac gcaatctggc agaaatgagc 4320
aattggcttg tgaacagtct ggactaactc gagcaccacc accaccacca ctgagatccg 4380
gctgctaaca aagcccgaag ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta 4440

gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt ttttgctgaa aggaggaact 4500
 atatccgat aattc 4515

<210> 8
 <211> 4437
 <212> ADN
 <213> Vector pKA81a-HADH vói Dehalogenaza Haloaxit aus Sulfolobus tokodaii 7

<400> 8
 ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
 accatatattt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
 taggatggca agatcctggt atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
 tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 240
 tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca 300
 gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacacaa ccgttattca ttcgtgattg 360
 cgctcgagcg agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480
 ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 540
 atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
 tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
 caactctggc gcatcgggct tccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgcac 720
 attatcgcca gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg 780
 cctagagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgtttat 840
 gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 900
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 960
 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggttgt ttgccggatc 1020
 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 1080
 ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 1140
 catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1200
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 1260
 ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 1320
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 1380
 taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt 1440

atctttatag tctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct	1500
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcccttttta cggttcctgg	1560
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atccctgat tctgtggata	1620
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca	1680
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac	1740
tgtgcggtat ttcacaccgc aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata	1800
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac	1860
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcacc cgcttacaga	1920
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc atcaccgaaa	1980
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggctgt gaagcgattc acagatgtct	2040
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg	2100
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tctgtttgg tcaactgatgc ctccgtgtaa	2160
gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata	2220
cgggttactg atgatgaaca tgcccggta ctggaacgtt gtgagggtaa acaactggcg	2280
gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg ctcatgagcc	2340
cgaagtggcg agcccgatct tcccacatcg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg	2400
cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatccatt	2460
tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc ttctgcggta tggcatgata gcgcccggaa	2520
gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgaatg cgcagagtat	2580
gccggtgtct cttatcagac cgtttccgc gtgggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg	2640
aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg	2700
gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc	2760
ctgcacgcgc cgtcgcaaatt tgcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc	2820
agcgtggtgg tgcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac	2880
aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat	2940
gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac	3000
cagacaccca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag	3060
catctggtcg cattgggtca ccagcaaata gcgctgttag cgggccatt aagttctgtc	3120
tcggcgcgctc tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg	3180
atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg	3240

ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc	3300
gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga	3360
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atcccgcctg taaccacat caaacaggat	3420
tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg	3480
gtgaagggca atcagctggt gcccgctctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcttga	3540
gaaatcataa aaaattttatt tgctttgtga gcgataaca attataatag attcaattgt	3600
gagcggataa caatttcaca catctagaaa taattttgtt taactttaag aaggagatat	3660
catatgatca ttctggcctt tgatatcttt ggtactgtac tcgatacatc taccgttatac	3720
caggaatttc gcaacaaaca actggagtat acttggtctg tgacgattat gggcaaatac	3780
gtggaatttg aggaaatcac caaaattacg ttacgctata tcctgaaagt tcgtggtgaa	3840
gaatcgaagt ttgacgaaga actgaacaaa tggaagaacc tgaaagcgta tgaagatacc	3900
aaatacctta aagagatttc ggaaattgcc gaagtttatg cgctgtcaaa tgggagttat	3960
aacgaagtga aacagcattt ggaacgtaat gggttacttc ggtacttcaa aggcattttc	4020
tccgcagaaa gcgttaaaga gtacaaaccg agtccgaaag tgtataagta ctttctggat	4080
agcattgggtg cgaaagaagc cttcttggtg tctagcaacg cattcgatgt gattggcgct	4140
aagaatgctg gtatgcgttc catctttgtc aatcgcaaga acaccattgt cgatcctatc	4200
ggcggaaaac cagacgtgat cgtcaatgac ttcaaagagc tgtatgagtg gattctccgc	4260
tataaataac tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga	4320
aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc	4380
tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg ataattc	4437