(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105849263 A
(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201480071249.X
(22)申请日 2014.12.26
(30)优先权数据
2013-273402 2013.12.27 JP
2014-158037 2014.08.01 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/084685 2014.12.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/099169 JA 2015.07.02
(71)申请人 物产食品科技股份有限公司
地址 日本爱知县
申请人 日本迈科洛生物制药有限公司
(72)发明人 栃尾巧 伊藤有未 中村早岐 藤井匡 田村圭辅
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 钟晶 金鲜英
(51)Int.Cl.
C12N 15/09(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
C12P 19/02(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

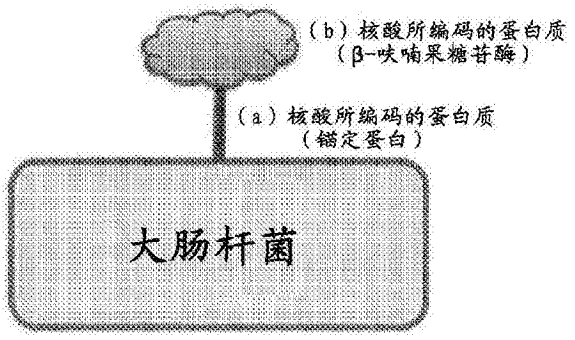
权利要求书1页 说明书23页
序列表29页 附图3页

(54)发明名称

附加有果糖的糖质的制造方法

(57)摘要

本发明提供能够利用β-呋喃果糖苷酶高效且简便地制造附加有果糖的糖质的制造方法。一种附加有果糖的糖质的制造方法，具有以下工序：使在末端含有果糖残基的糖质及受体底物与以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶的大肠杆菌、含有进行该表达的大肠杆菌的死菌的组合物或由进行该表达的大肠杆菌获得且含有β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的多肽接触。



CN 105849263 A

1.一种附加有果糖的糖质的制造方法，其具有以下工序：使在末端含有果糖残基的糖质及受体底物与以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌、含有进行该表达的大肠杆菌的死菌的组合物、或由进行该表达的大肠杆菌获得且含有下述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽接触，

(a)编码如下氨基酸序列的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列，

(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

2.一种大肠杆菌，其为按照能够以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌或以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌，

(a)编码如下氨基酸序列的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列，

(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

3.一种组合物，其含有以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌，

(a)编码如下氨基酸序列的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列，

(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

4.一种多肽，其由以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得且含有下述(b)核酸所编码的氨基酸序列，

(a)编码如下氨基酸序列的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列，

(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

5.一种附加有果糖的糖质，其是利用权利要求1所述的制造方法而制造的。

附加有果糖的糖质的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及附加有果糖的糖质的制造方法，尤其涉及：可利用β-呋喃果糖苷酶高效地制造附加有果糖的糖质的制造方法，可用于该制造方法的大肠杆菌、组合物及多肽，以及利用该制造方法制造的附加有果糖的糖质。

背景技术

[0002] β-呋喃果糖苷酶是识别在末端含有果糖残基的糖质中的果糖并将其水解的酶。β-呋喃果糖苷酶中，还存在具有将因水解而生成的果糖转移给受体底物的活性的类型。即，利用具有该活性的β-呋喃果糖苷酶，能够通过将果糖转移给糖质、糖质以外的物质来制造附加有果糖的糖质。

[0003] 作为利用β-呋喃果糖苷酶进行的、制造附加有果糖的糖质的方法，迄今为止已经公开了：例如，使糖底物与固定有保有β-呋喃果糖苷酶的曲霉菌菌丝的载体接触的方法(专利文献1)，使用来自运动发酵单胞菌的果聚糖蔗糖酶或菌体外转化酶的方法(专利文献2)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开2013-252056号公报

[0007] 专利文献2:日本特开2006-67958号公报

发明内容

[0008] 发明要解决的课题

[0009] 但是，专利文献1所述的方法是将原本具有β-呋喃果糖苷酶的曲霉菌的菌丝固定于硅藻土、珠光体这样的载体来制造寡糖的方法，使用外源的β-呋喃果糖苷酶简便且高效地制造寡糖并非易事。这是由于，利用该方法的情况下，在导入外源的β-呋喃果糖苷酶而制造寡糖时，为了准确地进行评价必须预先去除曲霉菌的内源性β-呋喃果糖苷酶活性，从而缺乏操作容易性。专利文献2所述的方法也是使用来自运动发酵单胞菌的β-呋喃果糖苷酶制造果糖糖苷的方法，并不是能够不受β-呋喃果糖苷酶的来源限制地制造果糖糖苷的方法。

[0010] 本发明是为了解决这样的问题而作出的，目的在于，通过在由于原本不具有β-呋喃果糖苷酶因而导入的β-呋喃果糖苷酶的活性评价容易、且转化和培养操作也容易的大肠杆菌中表达外源的β-呋喃果糖苷酶，从而提供：能够不受β-呋喃果糖苷酶的来源限制地高效且简便地制造附加有果糖的糖质的制造方法，可用于该制造方法的大肠杆菌、组合物及多肽，以及利用该制造方法制造的附加有果糖的糖质。

[0011] 用于解决课题的方法

[0012] 本发明人等进行了深入研究，结果发现，通过使用以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶的大肠杆菌，从而能够高效且简便地制造附加有果糖的糖质，并完成了下述的各发明。

[0013] (1)本发明的附加有果糖的糖质的制造方法具有以下工序:使在末端含有果糖残基的糖质及受体底物与以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌、含有进行该表达的大肠杆菌的死菌的组合物、或由进行该表达的大肠杆菌获得且含有下述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽接触;(a)编码如下氨基酸序列的核酸:与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45%以上的同源性的氨基酸序列,(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

[0014] (2)本发明的大肠杆菌为按照能够以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌或以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌;(a)编码如下氨基酸序列的核酸:与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45%以上的同源性的氨基酸序列,(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

[0015] (3)本发明的组合物为含有以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌的组合物;(a)编码如下氨基酸序列的核酸:与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45%以上的同源性的氨基酸序列,(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

[0016] (4)本发明的多肽为由以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得且含有下述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽;(a)编码如下氨基酸序列的核酸:与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45%以上的同源性的氨基酸序列,(b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

[0017] (5)本发明的附加有果糖的糖质为利用(1)所述的制造方法制造的附加有果糖的糖质。

[0018] 发明的效果

[0019] 根据本发明的附加有果糖的糖质的制造方法或可用于该制造方法的大肠杆菌、组合物或多肽,能够使用来自各种生物的β-呋喃果糖苷酶简便且高效地制造附加有果糖的糖质。

附图说明

[0020] 图1是示意性示出本发明的“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”的一个实施方式的图。

[0021] 图2是示出使重组枯草芽孢杆菌与45%蔗糖溶液接触而获得的反应液中的糖组成的HPLC谱图,所述重组枯草芽孢杆菌是利用pHT43-pgsA-indica重组载体或pHT43质粒转化而得的。

[0022] 图3是示出使重组巨大芽孢杆菌与45%蔗糖溶液接触而获得的反应液中的糖组成的HPLC谱图,所述重组巨大芽孢杆菌是利用pWH1520-capA_opti-indica重组载体或pWH1520质粒转化而得的。

[0023] 图4是示出使重组大肠杆菌与作为受体底物的氢醌、作为供体底物的蔗糖接触而获得的反应液(样品反应液)及各种对照反应液(对照反应液No.1～3)中的物质组成的HPLC谱图,所述重组大肠杆菌是利用pCDF-pgsA-indica重组载体转化而得的。

具体实施方式

[0024] 以下对本发明的附加有果糖的糖质的制造方法、可用于该制造方法的大肠杆菌、组合物及多肽、以及利用该制造方法制造的附加有果糖的糖质进行详细说明。

[0025] 在本发明中，“糖质”除了$C_n(H_2O)_m$所示的化合物以外还包括多元醇的醛、酮衍生物、与它们类似的衍生物、缩合物。即，本发明的“糖质”中除了单糖、寡糖、多糖以外，还包括它们与蛋白质、脂质等进行共价结合而得的复合脂质，单糖、寡糖的还原基团与醇、酚、皂甙、色素等配基结合而成的糖苷(岩波生物学事典第4版；岩波书店发行，2005年)。此外，本发明的“糖质”有时可以与“糖”、“碳水化合物”互换使用。

[0026] 在本发明中，“附加有果糖的糖质”是指含有1个以上的果糖残基作为构成物质的化合物。作为本发明的“附加有果糖的糖质”，具体可以列举例如果糖与果糖以外的单糖结合而成的二糖、蔗果四糖或蔗果三糖等含有果糖残基的寡糖、含有果糖残基的多糖以及含有果糖残基的糖醇、果糖与糖以外的物质(配基)结合而成的糖苷等。

[0027] 需要说明的是，在本发明中，寡糖是指3～十几个程度的单糖结合而成的糖，可以与“低聚糖”、“寡聚糖”互换使用。此外，糖苷一般是指糖与糖以外的物质(配基)结合而成的有机化合物(百科事典My Pedia；hitachi solutions business公司，2010年5月)，具体而言，是指糖的半缩醛性羟基或半缩酮性羟基被糖以外物质的原子或反应基团取代而成的化合物(生化学事典第4版；东京化学同人公司发行，2007年12月)。本发明的糖苷既可以是天然存在的也可以是人工合成的，除了O-苷以外还包括N-苷、S-苷、C-苷。

[0028] 本发明的附加有果糖的糖质的制造方法具有使在末端含有果糖残基的糖质及受体底物与以下A)～C)中的任一者接触的工序，

[0029] A)以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌、

[0030] (a)编码以下氨基酸序列(以下有时称为“规定的氨基酸序列”。)的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列、

[0031] (b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸、

[0032] B)含有上述以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌的组合物、

[0033] C)由上述以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得且含有上述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽。

[0034] 在此，将A)的“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”的一个实施方式示意性示于图1。本发明人等认为，如图1所示，以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的一个实施方式中，(a)核酸所编码的、含有预定的氨基酸序列的蛋白质部分与大肠杆菌的细胞膜结合，从而(b)核酸所编码的β-呋喃果糖苷酶部分在大肠杆菌的细胞表面表达。

[0035] 需要说明的是，在本发明中，“核酸”是指多个核苷酸通过磷酸二酯键结合而成的化合物，可以是脱氧核糖核酸(DNA)也可以是核糖核酸(RNA)。此外，在本发明中，“多肽”是指多个氨基酸通过肽键结合而成的化合物，对其序列长度没有限制，有时可以与蛋白质互换使用。

[0036] 在本发明中，“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸”是指使上述(a)核酸所编码

的氨基酸序列和上述(b)核酸所编码的氨基酸序列表达为1条多肽。在此，对该1条多肽中(a)核酸所编码的氨基酸序列和(b)核酸所编码的氨基酸序列的顺序没有限制，任一者可以为氨基末端侧，任一者可以为羧基末端侧。此外，该1条多肽既可以仅含有(a)核酸所编码的氨基酸序列及(b)核酸所编码的氨基酸序列，也可以在(a)核酸所编码的氨基酸序列和(b)核酸所编码的氨基酸序列之间、这些氨基酸序列的氨基末端和/或羧基末端插入或附加1个或多个其它氨基酸。

[0037] (a)的“与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列(预定的氨基酸序列)”是用于使含有(b)核酸所编码的氨基酸序列的β-呋喃果糖苷酶在大肠杆菌的细胞表面表达的锚定蛋白(以下有时简称为“锚定蛋白”。)的氨基酸序列。在此，“序列号6所示的PgsA蛋白”是来自枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的锚定蛋白，“序列号34所示的CapA蛋白”是来自巨大芽胞杆菌(Bacillus megaterium)DSM319株的锚定蛋白。在本发明中，如后述实施例4所示，可以将含有预定的氨基酸序列的蛋白质作为用于使β-呋喃果糖苷酶在大肠杆菌的细胞表面表达的锚定蛋白来使用。

[0038] 在本发明中，预定的氨基酸序列和其以外的氨基酸序列的同源性可以按照常规方法来确认，例如，可以使用FASTA(http://www.genome.JP/tools/fasta/)、基本局部比对搜索工具(Basic local alignment search tool(BLAST);http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)、位点特异性迭代BLAST(Position-Specific Iterated BLAST(PSI-BLAST);http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)等程序来确认。需要说明的是，“同源性”是指一致性，可以与“identity”互换使用。

[0039] 预定的氨基酸序列可以通过在序列号6或序列号34的氨基酸序列中在与序列号6或序列号34的氨基酸序列的同源性不小于45％的范围内缺失、置换、插入或附加1个或多个氨基酸而获得。此外，可以按照常规方法根据蛋白质信息资源(Protein Information Resource(PIR))、SWISS-PROT、TrEMBL、蛋白质研究基金会(Protein Research Foundation(PRF))、GenPept(NCBI蛋白质数据库)等氨基酸序列数据库，使用FASTA(http://www.genome.JP/tools/fasta/)、基本局部比对搜索工具(BLAST;http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)、位点特异性迭代BLAST(PSI-BLAST;http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)等程序进行序列号6或序列号34的氨基酸序列的同源检索而获得。

[0040] 在此，在本发明中，“在序列号6或序列号34的氨基酸序列中，在与序列号6或序列号34的氨基酸序列的同源性不小于45％的范围内缺失、置换、插入或附加1个或多个氨基酸”时的缺失、置换、插入或附加的氨基酸的个数可以列举例如1～200个、1～180个、1～160个、1～140个、1～120个、1～100个、1～80个，优选1～60个、更优选1～50个、进一步优选1～40个、更进一步优选1～30个。

[0041] 预定的氨基酸序列可以来自细菌、酵母、霉菌、植物等任意生物。在预定的氨基酸序列中，作为与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列具有45％以上的同源性的氨基酸序列，可以列举例如来自Bacillus tequiensis的锚定蛋白的氨基酸序列(美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)WP_024714260.1;同源性96％)、来自萎缩芽孢杆菌(Bacillus atrophaeus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI

WP_03326671.1;同源性86%)、来自暹逻芽孢杆菌(Bacillus siamensis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_016937733.1;同源性78%)、来自沙福芽孢杆菌(Bacillus sonorensis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_006639316.1;同源性66%)等。

[0042] 此外,作为预定的氨基酸序列中的、与序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列具有45%以上的同源性的氨基酸序列,可以列举例如来自弯曲芽孢杆菌(Bacillus flexus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_025908233.1;同源性73%)、来自炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_001253153.1;同源性53%)、来自蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_001996162.1;同源性53%)、来自内生芽胞杆菌(Bacillus endophyticus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBIWP_019393395.1;同源性52%)、来自苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_001170049.1;同源性51%)、来自巨大芽孢杆菌的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_013082091.1;同源性51%)、来自地衣芽孢杆菌(Bacillus lichenifomis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI AGS77947.1;同源性47%)、来自沙福芽孢杆菌(Bacillus safensis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_024423669.1;同源性47%)、来自短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_017360004.1;同源性47%)、来自同温层芽孢杆菌(Bacillus stratosphericus)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_007497516.1;同源性47%)、来自暹逻芽孢杆菌的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_016937733.1;同源性47%)、来自死谷芽孢杆菌(Bacillus vallismortis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_010328824.1;同源性46%)、来自莫海威芽孢杆菌(Bacillus mojavensis)的锚定蛋白的氨基酸序列(NCBI WP_010332115.1;同源性46%)等。

[0043] 本发明的“β-呋喃果糖苷酶”是具有如下活性的酶:识别在末端含有果糖残基的糖质中的果糖并将其水解的果糖水解活性、和将由水解而生成的果糖转移给受体底物的果糖转移活性。本发明的“β-呋喃果糖苷酶”可以是来自酵母、霉菌、植物等生物的野生型的β-呋喃果糖苷酶,也可以是含有对野生型的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列导入1或2个以上的氨基酸变异的氨基酸序列的β-呋喃果糖苷酶。需要说明的是,在本发明中,“β-呋喃果糖苷酶”有时与“果糖基转移酶”、“蔗糖酶”、“β-D-呋喃果糖苷酶”、“转化酶”、“invertase”或“invertin”互换使用。

[0044] 在此,在本发明中,“受体底物”是指可借助于β-呋喃果糖苷酶的果糖转移活性,接受果糖的转移,附加于果糖的物质。此外,“供体底物”是指可借助于β-呋喃果糖苷酶的果糖水解活性,接受果糖的水解,向受体底物提供果糖的物质。

[0045] 即,在本发明中,“在末端含有果糖残基的糖质”是指供体底物。作为本发明的“在末端含有果糖残基的糖质”,具体可以列举例如蔗糖等在末端含有果糖残基的二糖、蔗果三糖等在末端含有果糖残基的寡糖、在末端含有果糖残基的多糖以及在末端含有果糖残基的糖醇、在末端含有果糖残基的糖苷等。

[0046] 此外,如后述实施例6(1)及(2)所示那样,本发明的“受体底物”可以是单糖、二糖、寡糖、糖苷等糖质,也可以是氢醌等糖质以外的物质。根据本发明的附加有果糖的糖质的制造方法,例如若受体底物为单糖则可以制造二糖,若受体底物为二糖、寡糖,则可以制造寡糖,若受体底物为糖以外的物质则可以制造糖苷。

[0047] 需要说明的是，在本发明的附加有果糖的糖质的制造方法中，“在末端含有果糖残基的糖质”和“受体底物”可以是同一物质也可以是不同物质。

[0048] 作为本发明的“β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列”，具体可以列举例如来自印度拜叶林克氏菌印度亚种(Beijerinckia indica subsp.indica)NBRC3744的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列(序列号2)、来自瘤状伯克霍尔德菌STM815的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列(GenBank:ACC75109.1;序列号18)、来自白曲霉(Aspergillus kawachii)IFO4303的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列(GenBank:GAA88101.1;序列号22)等。

[0049] 在本发明中，编码上述(a)的预定的氨基酸序列、或上述(b)的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列(以下总称为“本发明的氨基酸序列”。)的核酸可以如下获得：从表达含有本发明的氨基酸序列的蛋白质的生物提取核酸，以该核酸为模板进行聚合酶链反应(PCR)，从而获得。此外，还可以以本发明的氨基酸序列为基础，根据表示密码子和氨基酸的对应关系的公知的遗传密码确定核酸的序列后，使用市售的各种核酸合成机来合成。

[0050] 本发明的“大肠杆菌”(Escherichia coli)只要能够以1个多肽形式表达上述(a)核酸及(b)核酸则可以为任意菌株。

[0051] 本发明的“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”可以按照常规方法将按照以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式设计的核酸导入大肠杆菌中而获得。作为这样的方法，可以列举例如后述实施例1(2)及实施例1(5)所示的方法。即，首先在1个载体的启动子序列和终止子序列之间插入(a)核酸及(b)核酸，获得重组载体。此时，若使(a)核酸和(b)核酸之间不含终止密码子，则导入了重组载体的大肠杆菌能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸。然后，将获得的重组载体导入大肠杆菌中并培养一定时间，可以获得以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌。

[0052] 然后，上述B)的、本发明的“含有以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌的组合物”只要含有以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌即可，对其形态没有限制，例如，可以为粉末状，也可以为液体状。上述B)的组合物可以通过例如将上述本发明的以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌溶菌、杀菌或灭菌而获得。在此，将大肠杆菌溶菌、杀菌或灭菌的方法可以列举通常用于细菌的溶菌方法、杀菌方法或灭菌方法，具体可以列举例如将大肠杆菌悬浮于高渗液的方法，对大肠杆菌进行破碎、磨碎、冻融、超声波处理或热处理的方法。此外，上述B)的组合物只要含有与以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌相当的成分即可，可以进行了盐析、溶剂沉淀、透析、超滤、凝胶过滤、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、离子交换色谱、亲和层析、疏水色谱、反相色谱、等电点电泳等任意处理，也可以未进行处理。

[0053] 其次，上述C)的、由本发明的“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得且含有上述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽”只要是由以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得、且含有上述(b)核酸所编码的氨基酸序列即可，可以是仅含有上述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽，也可以是含有在上述(b)核酸所编码的氨基酸序列的氨基末端和/或羧基末端附加有1个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。

[0054] 上述C)的多肽可以通过例如由以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌按照常规方法提取或纯化多肽而获得。作为提取或纯化多肽的方法，可以列举例如破碎、磨碎、在缓冲液中悬浮、冻融、超声波处理、离心分离、热处理、盐析、溶剂沉淀、透析、超滤、凝

胶过滤、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、离子交换色谱、亲和层析、疏水色谱、反相色谱、等电点电泳等方法。此外，为了更加简便，可以直接获取以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌来作为本发明的上述C)的多肽。即，上述C)的多肽既可以是与以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的细胞膜结合的状态，也可以是不与该大肠杆菌的细胞膜结合的状态。

[0055] 本发明的附加有果糖的糖质的制造方法中，作为使在末端含有果糖残基的糖质及受体底物与上述A)～C)中的任一者接触的方法，可以列举如下方法：例如，将上述A)～C)中的任一者添加到含有在末端含有果糖残基的糖质及受体底物的溶液中，在20℃～60℃下静置或振荡一定时间左右。

[0056] 本发明的附加有果糖的糖质的制造方法中，只要不损害本发明的特征则也可以具有其它工序，例如，可以具有利用色谱进行的附加有果糖的糖质的分离工序、煎糖等结晶化工序、干燥工序、洗涤工序、过滤工序、杀菌工序、添加食品添加剂的工序等。

[0057] 其次，本发明提供大肠杆菌。本发明的大肠杆菌为按照能够以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌、或以1个多肽形式表达下述(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌；

[0058] (a)编码以下氨基酸序列(预定的氨基酸序列)的核酸：与序列号6所示的PgsA蛋白的氨基酸序列或序列号34所示的CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列、

[0059] (b)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸。

[0060] 需要说明的是，在本发明的大肠杆菌部分，关于与上述的本发明的附加有果糖的糖质的制造方法相同的或相当的构成，省略重复的说明。

[0061] 在此，“按照能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”是指按照能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式来含有(a)核酸及(b)核酸、但尚未以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌。

[0062] 本发明的“按照能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”，可通过与上述的获得本发明的“以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”的方法同样的方法且使用在转录起始时需要某些诱导因子的诱导表达型的启动子序列、需要阻遏蛋白的解离的操纵基因序列而获得。

[0063] 即，在使用诱导表达型的启动子序列时，若在不提供诱导因子的条件下培养，则可以获得“按照能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”。作为这类诱导表达型的启动子序列，可以列举例如醇脱氢酶基因的启动子序列(诱导因子：醇，Waring RB等、Gene、第79卷、第119～130页、1989年)、α-淀粉酶基因的启动子序列(诱导因子：淀粉、麦芽糖等，Tada S等、Mol.Gen.Genet.、第229卷、第301～306页、1991年)、ThiA等来自曲霉属菌的启动子序列(诱导因子：硫胺素，Shoji JY等、FEMS Microbiol.Lett.、第244卷、第41～46页、2005年)等。

[0064] 此外，在使用需要阻遏蛋白的解离的操纵基因序列时，若在不提供阻遏蛋白的解离所必须的因子的条件下培养，则可以获得“按照能够以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的方式含有(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌”。作为这类操纵基因序列，可以列举例如lac操纵基因序列(阻遏蛋白解离所需要的因子：乳糖、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG))等。

[0065] 此外，本发明提供组合物。本发明的组合物为含有上述以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌的死菌的组合物。此外，本发明提供多肽。本发明的多肽是由上述以1个多肽形式表达(a)核酸及(b)核酸的大肠杆菌获得且含有上述(b)核酸所编码的氨基酸序列的多肽。需要说明的是，在本发明的组合物及多肽部分，关于与上述本发明的附加有果糖的糖质的制造方法相同的或相当的构成，省略重复的说明。

[0066] 以下基于各实施例对本发明进行说明。需要说明的是，本发明的技术范围不受这些实施例所示出的特征限定。

[0067] 实施例

[0068] ＜实施例1＞β-呋喃果糖苷酶表达体系的构建

[0069] (1)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸的获取

[0070] 对印度拜叶林克氏菌印度亚种NBRC3744(以下简记为“B.Indica”。)的β-呋喃果糖苷酶进行了克隆。具体而言，首先按照常规方法提取了B.Indica的基因组DNA。然后，使用下述序列号3及序列号4的引物在下述条件下进行聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction;PCR)，由此扩增来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA，按照常规方法进行测序，确定了全长碱基序列。将来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA的全长碱基序列示于序列号1，此外，将其所编码的来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列示于序列号2。

[0071] 《来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0072] 模板:B.Indica的基因组DNA

[0073] 正向引物:5'-ATGGCAAGTCGATCGTTTAATGTTTGTATAC-3'(序列号3)

[0074] 反向引物:5'-TTTACCAGACTCGAGTTACTGGCCGTTCGTGAC-3'(序列号4)

[0075] PCR用酶:KOD-Plus-(东洋纺公司)

[0076] 反应条件:以95℃下10秒、60℃下20秒及68℃下2分钟为1个循环，30个循环。

[0077] 然后，使用SignalP4.1server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)来预测β-呋喃果糖苷酶的信号序列。需要说明的是，序列号2中，信号序列相当于第1～28位。

[0078] (2)细胞表面表达体系的重组载体的制作

[0079] 在下述条件下进行PCR，从而扩增枯草芽孢杆菌的编码PgsA蛋白(GenBank:AB016245.1)的DNA。将获得的PCR产物按照常规方法用限制酶NdeI及BglII消化，将其作为DNA片段1。此外，对于PCR产物，按照常规方法进行测序并确认编码PgsA蛋白的DNA的碱基序列。将编码PgsA蛋白的DNA的碱基序列示于序列号5、将其所编码的PgsA蛋白的氨基酸序列示于序列号6。

[0080] 《编码PgsA蛋白的DNA扩增用PCR的条件》

[0081] 模板:枯草芽孢杆菌(IAM1026、ATCC9466)的基因组DNA

[0082] 正向引物(下划线表示NdeI位点):5'-AAACATATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATG-3'(序列号7)

[0083] 反向引物(下划线表示BglII位点):5'-AAAAGATCTTTTAGATTTTAGTTTGTCACTATG-3'(序列号8)

[0084] PCR用酶:KOD-Plus-(东洋纺公司)

[0085] 反应条件:以95℃下10秒、60℃下20秒及68℃下2分钟为1个循环，30个循环。

[0086] 然后,在下述条件下进行PCR,扩增来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA,按照常规方法用限制酶BamHI及XhoI消化,将其作为DNA片段2。

[0087] 《来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0088] 模板:本实施例1(1)的B.Indica的基因组DNA

[0089] 正向引物(下划线表示BamHI位点):5'-AAAGGATCCTCGGGTTACCCGATACCGACTCCGCATTCGGGACA-3'(序列号9)

[0090] 反向引物(下划线表示XhoI位点):5'-CCCCTCGAGTTACTGGCCGTTCGTGACACCATGGCCATTAAC-3'(序列号10)

[0091] PCR用酶:KOD-Plus-(东洋纺公司)

[0092] 反应条件:以95℃下10秒、60℃下20秒及68℃下2分钟为1个循环,20个循环。

[0093] 然后,使用DNA Ligation Kit Ver.2.1(宝生物(Takara Bio)公司)按照所附的说明书将DNA片段1及DNA片段2插入pCDFDuet-1质粒(Merck公司)的NdeI位点及XhoI位点,将其作为pCDF-pgsA-indica重组载体。

[0094] 此外,关于pCDF-pgsA-indica重组载体,在按照常规方法用限制酶NdeI及XhoI消化后,进行电泳而纯化,获得按照能够以1个多肽形式表达PgsA蛋白及来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的方式编码的DNA,将其作为DNA片段3。然后,同样地用Ligation high Ver.2(东洋纺公司)在用NdeI及XhoI消化过的pET42a(+)质粒(Merck公司)中插入DNA片段3,将其作为pET-pgsA-indica重组载体。

[0095] (3)菌体内表达体系的重组载体的制作

[0096] 在下述条件下以本实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体为模板进行PCR,从而扩增不含编码pgsA蛋白的DNA的DNA,将其作为DNA片段4。然后,用Ligation high Ver.2(东洋纺公司)进行DNA片段4的自身连接,将其作为pCDF-indica重组载体。

[0097] 《来自pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件,所述pCDFDuet-1质粒插入有来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA》

[0098] 模板:本实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0099] 正向引物:5'-CATATGTCGGGTTACCCGATACCGAC-3'(序列号11)

[0100] 反向引物:5'-TATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATA-3'(序列号12)

[0101] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0102] 反应条件:以98℃下10秒、59℃下30秒、68℃下2分40秒为1个循环,25个循环。

[0103] 此外,将pCDF-indica重组载体按照常规方法用限制酶NdeI及XhoI消化,从而获得来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA,将其作为DNA片段5。然后,同样地用Ligation high Ver.2(东洋纺公司)在用NdeI及XhoI消化后的pET42a(+)质粒(Merck公司)中插入DNA片段5,将其作为pET-indica重组载体。

[0104] (4)菌体内表达体系(可溶性)的重组载体的制作

[0105] 在下述条件下进行PCR,扩增来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA,将其作为DNA片段6。

[0106] 《来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0107] 模板:本实施例1(3)的pCDF-indica重组载体

[0108] 正向引物:5'-GATGGTTCAACTAGTTCGGGTTACCCGATACCG-3'(序列号13)

[0109] 反向引物:5'-GTGGTGGTGCTCGAGTTACTGGCCGTTCGTGA-3'(序列号14)

[0110] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0111] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下50秒为1个循环,25个循环。

[0112] 此外,在下述条件下进行PCR,扩增来自pET42a(+)质粒的DNA,将其作为DNA片段7。

[0113] 《来自pET42a(+)质粒的DNA扩增用PCR的条件》

[0114] 模板:pET42a(+)质粒(Merck公司)

[0115] 正向引物:5'-CTCGAGCACCACCACCACCACCACCACCACTAATT-3'(序列号15)

[0116] 反向引物:5'-ACTAGTTGAACCATCCGATTT-3'(序列号16)

[0117] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0118] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下2分钟50秒为1个循环,25个循环。

[0119] 然后,按照以1个多肽形式表达来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶和pET42a(+)质粒中所含有的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的方式,用In-Fusion HDCloning Kit(宝生物公司)将DNA片段6及DNA片段7连接,将其作为pET-GST-indica重组载体。需要说明的是,GST为可溶性蛋白质,据报道,通过使GST和目标蛋白以融合蛋白质形式来表达,可提高目标蛋白的可溶性。

[0120] (5)转化及转化体的培养

[0121] 将本实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体及pET-pgsA-indica重组载体、本实施例1(3)的pCDF-indica重组载体及pET-indica重组载体、以及本实施例1(4)的pET-GST-indica重组载体导入大肠杆菌BL21(DE3)株的感受态细胞(COSMO BIO公司)中,获得作为转化体的重组大肠杆菌。

[0122] 将其在37℃下平板培养一晚后,拾取重组大肠杆菌的克隆并接种到M9SEED培养基1mL中,在30℃、220rpm下振荡培养20小时。然后,将培养液10μL在M9Main培养基2mL中传代培养,在25℃、220rpm下振荡培养24小时。M9SEED培养基及M9Main培养基的组成如以下所示。需要说明的是,关于M9SEED培养基及M9Main培养基中的抗生素,对于利用pCDF-pgsA-indica重组载体及pCDF-indica重组载体转化的大肠杆菌,使用链霉素(终浓度50μg/mL);对于利用pET-pgsA-indica重组载体、pET-indica重组载体及pET-GST-indica重组载体转化的大肠杆菌,使用卡那霉素(终浓度30μg/mL)。

[0123] M9SEED培养基(共100mL);水72mL、5×M9盐20mL、20%酪蛋白氨基酸5mL、20%D-葡萄糖2mL、2mg/mL胸腺嘧啶1mL、50mM $CaCl_2$ 0.2mL、2.5M $MgCl_2$ 40μL、100mg/mL $FeSO_4$ 28μL、抗生素

[0124] M9Main培养基(共100mL);水67mL、5×M9盐20mL、20%酪蛋白氨基酸5mL、2mg/mL胸腺嘧啶1mL、50mM $CaCl_2$ 0.2mL、100mg/mL $FeSO_4$ 28μL、Overnight Express Autoinduction System 1(O.N.E.;Merck公司)Sol.1 2mL、O.N.E.Sol.2 5mL、O.N.E.Sol.3 100μL、抗生素

[0125] <实施例2>细胞表面表达体系的效果的研究

[0126] (1)酶反应

[0127] 准备实施例1(5)的重组大肠杆菌的培养液2mL,然后将培养液在12000rpm、4℃下离心分离5分钟,从而回收重组大肠杆菌,测定菌体的湿重。此外,调制含有30(w/w)%的蔗糖的0.04M的磷酸钠缓冲液(pH7.0),将其作为30%蔗糖溶液。在重组大肠杆菌的培养液2mL中添加30%蔗糖溶液350μL进行悬浮,将其在30℃、200rpm下振荡3小时,由此进行β-呋喃果

糖苷酶的酶反应，将其作为反应液。需要说明的是，如果大肠杆菌接触溶质浓度为30(w/w)％左右的溶液，则水分在渗透压作用下从菌体流出而发生溶菌。

[0128] (2)糖组成的确认

[0129] 在本实施例2(1)的反应液50μL中加入水950μL而进行稀释后，在100℃下加热10分钟。然后，在4℃、15000×g下离心分离10分钟，回收上清，用孔径0.45μm的过滤器过滤，将获得的滤液作为HPLC样品。然后，将HPLC样品在下述条件下供于HPLC，确认反应液中所含有的各糖(单糖：果糖及葡萄糖，二糖：蔗糖，三糖以上的寡糖：蔗果三糖、蔗果四糖等)的比例。关于各糖的比例，以面积百分率形式算出各峰的面积相对于检测到的全部峰的面积总和的比例。

[0130] 《HPLC的条件》

[0131] 柱：SHODEX SUGAR KS_802(8.0Φ×300mm)2根

[0132] 流动相：水

[0133] 流速：1.0mL/分钟

[0134] 注入量：20μL

[0135] 温度：50℃

[0136] 检测：差示折射率检测器(RID；昭和电工公司)

[0137] 然后，将酶反应中使用的蔗糖的质量(118.65mg；蔗糖溶液350μL中所含有的蔗糖的质量)乘以三糖以上的寡糖的面积百分率，算出三糖以上的寡糖的量，将其作为寡糖生成量。此外，将寡糖生成量除以菌体重量，以百分率形式算出单位重量的菌体的寡糖生成量，将其作为寡糖生成率。此外，将酶反应中使用的蔗糖的质量(118.65mg)乘以从100％中减去蔗糖的面积百分率而得的值，从而算出蔗糖消耗量。此外，将蔗糖消耗量除以菌体重量，以百分率形式算出单位重量的菌体的蔗糖消耗量，将其作为蔗糖消耗率。其结果如表1所示。

[0138] [表1]

[0139]

β-呋喃果糖苷酶的表达方法	重组载体	菌体重量(mg)	寡糖生成量(mg)	蔗糖消耗量(mg)	寡糖生成率(%)(寡糖生成量/菌体重量)×100	蔗糖消耗率(%)(蔗糖消耗量/菌体重量)×100
菌体内表达	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
细胞表面表达	pCDF-pgsA-indica	38.5	30.3	104.2	78.6	269.9
菌体内表达	pET-indica	45.7	12.4	34.4	27.1	75.3
菌体内表达(可溶性)	pET-GST-indica	41.0	4.6	18.1	11.3	44.2
细胞表面表达	pET-pgsA-indica	22.5	26.2	82.5	116.4	366.6

[0140] 如表1所示，利用pCDF-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液的寡糖生成率为11.9％，与此相对地，利用pCDF-pgsA-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为78.6％，寡糖生成率大为6.6倍以上。此外，利用pET-indica重组载体及pET-GST-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液的寡糖生成率分别为27.1％及11.3％，与此相对地，利用pET-pgsA-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为116.4％，寡糖生成率分别大为4.2倍以上、及10.3倍以上。

[0141] 即，可知在使用来自pCDF-Duet1质粒的重组载体及来自pET42a(+)质粒的重组载体中的任一者时，将在大肠杆菌的细胞表面表达β-呋喃果糖苷酶时与在菌体内表达β-呋喃果糖苷酶时、或在菌体内以可溶性蛋白质形式表达时相比，寡糖的生成效率显著提高。这些结果表明，不论转化中使用的载体的种类为何种，在以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶时，都能够极其高效地制造附加有果糖的糖质。

[0142] ＜实施例3＞β-呋喃果糖苷酶的来源的研究

[0143] 发明人还研究了:能否不受β-呋喃果糖苷酶的来源限制,均发挥通过以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶而能够高效地制造附加有果糖的糖质的这样的效果。具体而言,对属于与来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶同一个家族68的瘤状伯克霍尔德菌(Burkholderiaphymatum)STM815(以下简记为“Burk”。)的β-呋喃果糖苷酶、及属于家族32的白曲霉IFO4303(以下简记为“Kawachii”。)的β-呋喃果糖苷酶进行了研究。

[0144] (1)编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的核酸的获取

[0145] [1-1]来自Burk的β-呋喃果糖苷酶

[0146] 通过实施例1(1)中记载的方法进行了Burk的β-呋喃果糖苷酶的克隆及测序。但PCR的条件如下所述。将来自Burk的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA的全长碱基序列示于序列号17、将其所编码的来自Burk的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列示于序列号18。需要说明的是,序列号18中,信号序列相当于第1～35位。此外,将通过在下述条件下进行的PCR而扩增的来自Burk的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA作为DNA片段8。

[0147] 《来自Burk的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0148] 模板:Burk的基因组DNA

[0149] 正向引物:5’-AAACTAAAATCTAAAAGATCTCAGACTGCAACGCCAGGCTTCCCCG-3’(序列号19)

[0150] 反向引物:5’-GGTTTCTTTACCAGACTCGAGTTACTGGCTGTTGCCGCCCTGCCCGTTTCC-3’(序列号20)

[0151] PCR用酶:KOD-Plus-(东洋纺公司)

[0152] 反应条件:以94℃下15秒、58℃下20秒及68℃下2分钟为1个循环,21个循环。

[0153] [1-2]来自Kawachii的β-呋喃果糖苷酶

[0154] 然后,委托GenScript公司人工合成编码Kawachii的β-呋喃果糖苷酶(GenBank:GAA88101.1)的DNA,由此而获取。将来自Kawachii的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA的全长碱基序列示于序列号21、将其所编码的来自kawachii的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列示于序列号22。需要说明的是,序列号22中,信号序列相当于第1～24位。

[0155] (2)细胞表面表达体系的重组载体的制作

[0156] [2-1]来自Burk的β-呋喃果糖苷酶

[0157] 在下述条件下进行PCR,从而扩增来自插入有编码PgsA蛋白的DNA的pCDFDuet-1质粒的、且不含来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA的DNA,将其作为DNA片段9。

[0158] 《来自插入有编码PgsA蛋白的DNA的pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件》

[0159] 模板:实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0160] 正向引物:5’-TCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTT-3’(序列号23)

[0161] 反向引物:5’-TTTAGATTTTAGTTTGTCACTATGATCAAT-3’(序列号24)

[0162] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下2分25秒为1个循环,25个循环。

[0163] 然后,使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司),按照所附的说明书将本实施例3(1)[1-1]的DNA片段8和DNA片段9连接,将其作为pCDF-pgsA-burk重组载体。

[0164] [2-2]来自Kawachii的β-呋喃果糖苷酶

[0165] 在下述条件下进行PCR,从而扩增来自Kawachii的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA,将其作为DNA片段10。

[0166] 《来自Kawachii的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0167] 模板:本实施例3(1)[1-2]的来自Kawachii的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA

[0168] 正向引物:5'-AAATCTAAAAGATCCTCCGTGGTCATCGACTAC-3'(序列号25)

[0169] 反向引物:5'-TTTACCAGACTCGAGTCAATACTGACGATCCGGC-3'(序列号26)

[0170] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0171] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下50秒为1个循环,25个循环。

[0172] 此外,在下述条件下以实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体为模板进行PCR,从而扩增不含来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA的DNA,将其作为DNA片段11。

[0173] 《来自插入有编码PgsA蛋白的DNA的pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件》

[0174] 模板:实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0175] 正向引物:5'-CTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAA-3'(序列号27)

[0176] 反向引物:5'-GGATCTTTTAGATTTTAGTTTGTCACTATGATCAA-3'(序列号28)

[0177] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0178] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下2分25秒为1个循环,25个循环。

[0179] 然后,使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司),按照所附的说明书将DNA片段10及DNA片段11连接,将其作为pCDF-pgsA-kawachii重组载体。

[0180] (3)菌体内表达体系的重组载体的制作

[0181] [3-1]来自Burk的β-呋喃果糖苷酶

[0182] 在下述条件下以本实施例3(2)[2-1]的pCDF-pgsA-burk重组载体为模板进行PCR,从而扩增不含编码pgsA蛋白的DNA的DNA,将其作为DNA片段12。然后,使用Ligation high Ver.2(东洋纺公司),按照所附的说明书将DNA片段12自身连接,将其作为pCDF-burk重组载体。

[0183] 《来自pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件,所述pCDFDuet-1质粒插入有来自Burk的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA》

[0184] 模板:本实施例3(2)[2-1]的pCDF-pgsA-burk重组载体

[0185] 正向引物:5'-CATATGCAGACTGCAACGCCAGGCT-3'(序列号29)

[0186] 反向引物:5'-TATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATA-3'(序列号30)

[0187] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0188] 反应条件:以98℃下10秒、59℃下30秒、68℃下2分40秒为1个循环,25个循环。

[0189] [3-2]来自Kawachii的β-呋喃果糖苷酶

[0190] 在下述条件下以本实施例3(2)[2-2]的pCDF-pgsA-kawachii重组载体为模板进行PCR,从而扩增不含编码pgsA蛋白的DNA的DNA,将其作为DNA片段13。然后,使用Ligation high Ver.2(东洋纺公司),按照所附的说明书将DNA片段13自身连接,将其作为pCDF-kawachii重组载体。

[0191] 《来自pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件，所述pCDFDuet-1质粒插入有来自Kawachii的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA》

[0192] 模板：本实施例3(2)[2-2]的pCDF-pgsA-kawachii重组载体

[0193] 正向引物：5'-CATATGTCCGTGGTCATCGACTAC-3'(序列号31)

[0194] 反向引物：5'-TATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATA-3'(序列号32)

[0195] PCR用酶：KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0196] 反应条件：以98℃下10秒、59℃下30秒、68℃下2分钟40秒为1个循环，25个循环。

[0197] (4)转化及转化体的培养

[0198] 将本实施例3(2)[2-1]的pCDF-pgsA-burk重组载体、本实施例3(2)[2-2]的pCDF-pgsA-kawachii重组载体、本实施例3(3)[3-1]的pCDF-burk重组载体及本实施例3(3)[3-2]的pCDF-kawachii重组载体通过实施例1(5)中记载的方法导入大肠杆菌，对获得的重组大肠杆菌进行培养。

[0199] (5)酶反应及寡糖量的测定

[0200] 使用本实施例3(4)的重组大肠杆菌的培养液，利用实施例2(1)中记载的方法进行β-呋喃果糖苷酶的酶反应。然后利用实施例2(2)中记载的方法测定反应液中所含有的各糖的比例，算出寡糖生成量、寡糖生成率、蔗糖消耗量及蔗糖消耗率。其结果如表2所示。为了进行比较，表2中一并示出了利用表1中记载的pCDF-indica重组载体及pCDF-pgsA-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液的结果。

[0201] [表2]

[0202]

β-FFase（家族分类）	β-呋喃果糖苷酶的表达方法	重组载体	菌体重量(mg)	寡糖生成量(mg)	蔗糖消耗量(mg)	寡糖生成率(%)（寡糖生成量/菌体重量)×100	蔗糖消耗率(%)（蔗糖消耗量/菌体重量)×100
Indica（家族68）	菌体内表达	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
Indica（家族68）	细胞表面表达	pCDF-pgsA-indica	38.8	30.2	104.2	78.6	269.9
Burk（家族68）	菌体内表达	pCDF-burk	51.9	19.2	89.6	37.0	172.6
Burk（分类68）	细胞表面表达	pCDF-pgsA-burk	16.3	25.5	92.6	156.7	568.0
Kawachi（家族32）	菌体内表达	pCDF-kawachi	54.7	18.9	105.6	34.5	192.1
Kawachi（家族32）	细胞表面表达	pCDF-pgsA-kawachi	29.0	66.7	102.6	245.2	368.0

[0203] 如表2所示，利用pCDF-burk重组载体转化的大肠杆菌的反应液的寡糖生成率为37.0％，与此相对地，利用pCDF-pgsA-burk重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为156.7％，寡糖生成率大为4.2倍以上。此外，利用pCDF-kawachii重组载体转化的大肠杆菌的反应液的寡糖生成率为34.5％，与此相对地，利用pCDF-pgsA-kawachii重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为245.2％，寡糖生成率大为7.1倍以上。

[0204] 即，可以获知：使来自Burk的β-呋喃果糖苷酶及来自Kawachii的β-呋喃果糖苷酶在大肠杆菌的细胞表面表达时，与来自B.indica的β-呋喃果糖苷酶同样地，寡糖生成效率显著高于在菌体内表达的情况。这些结果表明，与用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白融合而以1个多肽形式表达时，不受β-呋喃果糖苷酶的来源或家族的差异限制，能够极其高

效地制造附加有果糖的糖质。

[0205] ＜实施例4＞锚定蛋白的研究

[0206] 发明人还研究了:能否不受锚定蛋白的种类限制,均发挥通过以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶而能够高效地制造附加有果糖的糖质的这样的效果。具体而言,以PgsA蛋白的氨基酸序列为基础,使用基本局部比对搜索工具(BLAST)进行检索,提取下述(一)及(二)的锚定蛋白,对这些进行研究。

[0207] (一)与PgsA蛋白的氨基酸序列的同源性为45%的巨大芽孢杆菌DSM319株的CapA蛋白、

[0208] (二)与PgsA蛋白的氨基酸序列的同源性为32%、与CapA蛋白的氨基酸序列的同源性为36%的短短芽孢杆菌(Brevibacillus brevis)NBRC100599株的蛋白质(geninfo identifierr(GI)号为226313341;以下称为“brev蛋白”。)。

[0209] (1)细胞表面表达体系的重组载体的制作

[0210] [1-1]编码CapA蛋白的DNA的扩增

[0211] 对于编码CapA蛋白的DNA序列,设计以在大肠杆菌中最适的密码子编码的碱基序列,将其作为capA_opti基因。将capA_opti基因的碱基序列示于序列号33、将其所编码的氨基酸序列示于序列号34。然后,人工合成capA_opti基因的DNA,以其为模板在下述条件下进行PCR,从而扩增编码CapA蛋白的DNA,将其作为DNA片段14。

[0212] 《编码CapA蛋白的DNA扩增用PCR的条件》

[0213] 模板:人工合成的capA_opti基因的DNA

[0214] 正向引物:5'-TAAGAAGGAGATATACATATGAAAGAAAAGAAACTGAACTTCCAAG-3'(序列号35)

[0215] 反向引物:5'-CGGGTAACCCGATTGAGATCTATTTGCCTGGGCTTCGTTCTTTTTG-3'(序列号36)

[0216] PCR用酶:KOD-Plus-(东洋纺公司)

[0217] 反应条件:以94℃下15秒、58℃下20秒及68℃下2分钟为1个循环,21个循环。

[0218] [1-2]编码brev蛋白的DNA的扩增

[0219] 按照常规方法提取短短芽孢杆菌NBRC100599株的基因组DNA。然后,在下述条件下进行PCR,从而扩增编码brev蛋白的DNA,将其作为DNA片段15。此外,按照常规方法对PCR产物进行测序,确定了编码brev蛋白的DNA的全长碱基序列。将编码brev蛋白的DNA的全长碱基序列示于序列号37,此外,将其所编码的brev蛋白的氨基酸序列示于序列号38。

[0220] 《编码brev蛋白的DNA扩增用PCR的条件》

[0221] 模板:短短芽孢杆菌NBRC100599株的基因组DNA

[0222] 正向引物:5'-GAAGGAGATATACATATGAACGAGAACAGATCAAG-3'(序列号39)

[0223] 反向引物:5'-GTAACCCGAGGATCTGGGGGCAGTCTCCACCGC-3'(序列号40)

[0224] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0225] 反应条件:以98℃下10秒、68℃下1分钟10秒为1个循环,45个循环。

[0226] [1-3]重组载体的制作

[0227] 〈1-3-1〉CapA蛋白

[0228] 在下述条件下以实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体为模板进行PCR,从而

扩增不含编码pgsA蛋白的DNA的、来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA，将其作为DNA片段16。然后，使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司)，按照所附的说明书将本实施例4(1)[1-1]的DNA片段14和DNA片段16连接，将其作为pCDF-capA_opti-indica重组载体。

[0229] 《来自pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件，所述pCDFDuet-1质粒插入有来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA》

[0230] 模板：实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0231] 正向引物：5'-AGATCTCAATCGGGTTACCCGATACCGAC-3'(序列号41)

[0232] 反向引物：5'-CATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAAC-3'(序列号42)

[0233] PCR用酶：KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0234] 反应条件：以98℃下10秒、68℃下3分钟20秒为1个循环，25个循环。

[0235] 〈1-3-2〉brev蛋白

[0236] 在下述条件下以实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体为模板进行PCR，从而扩增不含编码PgsA蛋白的DNA的DNA，将其作为DNA片段17。然后，使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司)，按照所附的说明书将本实施例4(1)[1-2]的DNA片段15和DNA片段17连接，将其作为pCDF-brev-indica重组载体。

[0237] 《来自pCDFDuet-1质粒的DNA扩增用PCR的条件，所述pCDFDuet-1质粒插入有来自B.Indica的编码β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA》

[0238] 模板：实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0239] 正向引物：5'-AGATCCTCGGGTTACCCGATACCGA-3'(序列号43)

[0240] 反向引物：5'-ATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACT-3'(序列号44)

[0241] PCR用酶：KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0242] 反应条件：以98℃下10秒、68℃下3分钟20秒为1个循环，25个循环。

[0243] (2)酶反应及糖组成的确认

[0244] 将本实施例4(1)的pCDF-capA_opti-indica重组载体及pCDF-brev-indica重组载体通过实施例1(5)所述的方法导入大肠杆菌，对获得的重组大肠杆菌进行培养。然后，使用这些重组大肠杆菌的培养液，利用实施例2(1)中记载的方法进行β-呋喃果糖苷酶的酶反应。然后利用实施例2(2)中记载的方法测定反应液中所含有的各糖的比例，算出寡糖生成量、寡糖生成率、蔗糖消耗量及蔗糖消耗率。其结果如表3所示。为了进行比较，表3中一并示出了利用表1中记载的pCDF-indica重组载体及pCDF-pgsA-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液的结果。

[0245] [表3]

[0246]

锚定蛋白	重组载体	菌体重量(mg)	寡糖生成量(mg)	蔗糖消耗量(mg)	寡糖生成率(%)(寡糖生成量/菌体重量)×100	蔗糖消耗率(%)(蔗糖消耗量/菌体重量)×100
无(菌体内表达体系)	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
PgsA	pCDF-pgsA-indica	38.8	30.3	104.2	78.8	269.9
CapA	pCDF-capA_opti-indica	24.4	7.6	31.9	312.2	1306.9
brev	pCDF-brev-indica	53.1	1	3	1.0	5.0

[0247] 如表3所示，利用pCDF-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液的寡糖生成率为11.9％，与此相对地，利用pCDF-pgsA-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为78.6％、利用pCDF-capA_opti-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液则为312.2％、利用pCDF-brev-indica重组载体转化的大肠杆菌的反应液为1.0％。即，与使用pCDF-indica重组载体时相比，使用pCDF-pgsA-indica重组载体时的寡糖生成率大为6.6倍以上、使用pCDF-capA_opti-indica重组载体时的寡糖生成率大为26.2倍以上，而使用pCDF-brev-indica重组载体时小为约0.08倍。

[0248] 即，可以获知：在利用brev蛋白使β-呋喃果糖苷酶在大肠杆菌的细胞表面表达时，与在菌体内表达时相比，寡糖的生成效率变小；而利用PgsA蛋白、CapA蛋白使β-呋喃果糖苷酶在大肠杆菌的细胞表面表达时，与在菌体内表达时相比，寡糖的生成效率显著提高。这些结果表明，通过以1个多肽形式表达特定锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶，从能够高效地制造附加有果糖的糖质，所述特定锚定蛋白含有与PgsA蛋白的氨基酸序列或CapA蛋白的氨基酸序列中的任一者具有45％以上的同源性的氨基酸序列。

[0249] ＜实施例5＞宿主的研究

[0250] 发明人还研究了：能否不受宿主的种类影响，均发挥以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶而高效地制造附加有果糖的糖质这样的效果。具体而言，对以作为PgsA蛋白的来源的枯草芽孢杆菌及作为CapA蛋白的来源的巨大芽孢杆菌为宿主的情况进行了研究。

[0251] (1)以枯草芽孢杆菌为宿主的情况

[0252] [1-1]重组载体的制作

[0253] 在下述条件下进行PCR，从而扩增编码PgsA蛋白及来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA，将其作为DNA片段18。

[0254] 《编码PgsA蛋白及来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0255] 模板：实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体

[0256] 正向引物：5'-AAGGAGGAAGGATCAATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATG-3'(序列号45)

[0257] 反向引物：5'-CCCGGGGACGTCGACTTACTGGCCGTTCGTGACACCATGG-3'(序列号46)

[0258] PCR用酶：KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0259] 反应条件：以95℃下20秒、50℃下30秒、68℃下2分钟为1个循环，25个循环。

[0260] 此外，以作为枯草芽孢杆菌用分泌表达载体的pHT43质粒(MoBiTec公司)的碱基序列为基础，设计下述序列号47及序列号48的引物，在下述条件下进行PCR，从而扩增来自

pHT43质粒的DNA，将其作为DNA片段19。

[0261] 《来自pHT43质粒的DNA扩增用PCR的条件》

[0262] 模板：pHT43质粒(MoBiTec公司)

[0263] 正向引物：5'-GTCGACGTCCCCGGGGCAGCCCGCCTAATG-3'(序列号47)

[0264] 反向引物：5'-TGATCCTTCCTCCTTTAATTGGGAATTGTT-3'(序列号48)

[0265] PCR用酶：KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0266] 反应条件：以95℃下20秒、68℃下5分、68℃下5分钟为1个循环，25个循环。

[0267] 然后，使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司)，按照所附的说明书将DNA片段18和DNA片段19连接，将其作为pHT43-pgsA-indica重组载体。

[0268] [1-2]转化体的制作

[0269] 将本实施例5(1)[1-1]的pHT43-pgsA-indica重组载体通过实施例1(5)中记载的方法导入大肠杆菌，并对重组大肠杆菌进行培养后，从重组大肠杆菌回收pHT43-pgsA-indica重组载体。将回收的pHT43-pgsA-indica重组载体及pHT43质粒(MoBiTec公司)利用电穿孔法导入枯草芽孢杆菌RIK1285株(B.subtilis Secretory Protein Expression System；TAKARA公司)，获得转化体，将其作为重组枯草芽孢杆菌。电穿孔法使用GENE PULSER II(Bio-Rad公司)并按照以下〈1〉～〈8〉的步骤进行。

[0270] 〈1〉从枯草芽孢杆菌RIK1285(B.subtilis Secretory Protein ExpressionSystem；TAKARA公司)的甘油菌中取出适量菌涂布在LB平板上，在37℃培养一晚(约16小时)后，拾取单个菌落，接种到装有25mL的LB培养基的容量250mL的烧瓶中，在28℃进行一晚(约16小时)的前培养，将其作为前培养液。

[0271] 〈2〉调制添加有终浓度0.5M的山梨醇的LB培养基，将其作为主培养培养基。在装有50mL的主培养培养基的容量250mL的三角烧瓶中加入前培养液5mL，在37℃、220rpm下进行主培养，将其作为主培养液。主培养进行至浊度值达到稳定期(OD600＝0.85～0.95)为止。

[0272] 〈3〉将装有主培养液的三角烧瓶在冰中放置10分钟以上，然后在5000×g、4℃下离心分离10分钟。除去上清后，用冰冷的溶液A(0.5M山梨醇、0.5M甘露醇、0.5M海藻糖、10％甘油)洗涤菌体4次。

[0273] 〈4〉然后，将菌体悬浮于适当量的溶液A中后，分成各60μL后保存于-80℃下，将其作为电穿孔法用菌体。

[0274] 〈5〉将电穿孔法用菌体在冰中溶解，分别加入适当量的作为样品的pHT43-pgsA-indica重组载体、作为对照的pHT43质粒(MoBiTec公司)后，转移到预先用冰冷却的0.1cm间隔的透明试管(Cuvette)中，放置1～1.5分钟。

[0275] 〈6〉以22KV/cm(25μF、200Ω)施加脉冲后，加入溶液B(含有0.5M的山梨醇及0.38M的甘露醇的LB培养基)1mL，在37℃平稳地进行3小时的振荡培养。

[0276] 〈7〉将该培养液以3500rpm离心分离5分钟，除去上清。加入100μL的溶液B悬浮，涂布在含有终浓度5μg/mL的氯霉素的LB平板上，在37℃培养一晚。

[0277] 〈8〉将LB平板上出现的菌落加入含有终浓度5μg/mL的氯霉素及终浓度1mM的异丙基-β-硫代半乳糖苷(IPTG)的L培养基1mL中，在30℃、220rpm下旋转培养24小时，将其作为重组枯草芽孢杆菌培养液。

[0278] [1-4]酶反应及糖组成的确认

[0279] 调制含有45(w/w)%的蔗糖的0.04M的磷酸钾缓冲液，将其作为45%蔗糖溶液。将本实施例5(1)[1-2]〈8〉的重组枯草芽孢杆菌的培养液在4℃、3500rpm下离心分离10分钟，回收菌体，悬浮于500μL的45%蔗糖溶液，将其在30℃、220rpm下振荡24小时，由此进行β-呋喃果糖苷酶的酶反应。然后，用50%乙腈水溶液将反应液稀释至25倍，作为HPLC样品。然后，将HPLC样品在下述条件下供于HPLC，确认糖组成。其结果如图2所示。

[0280] 《HPLC分析条件》

[0281] 柱:Cosmosil Sugar-D 4.6×150mm

[0282] 洗提液:乙腈水溶液(0～9分钟:72.5～57.5%;9～11分钟:72.5)%)

[0283] 柱温度:25℃

[0284] 流速:1.5mL/分钟

[0285] 注入量:1.5μL

[0286] 检测:电雾式检测器(CAD;Thermo Fisher Scientific公司)

[0287] 如图2所示，利用pHT43-pgsA-indica重组载体转化的重组枯草芽孢杆菌的反应液与利用pHT43质粒转化的重组枯草芽孢杆菌(对照)的反应液的HPLC谱图的形状基本相同，二者都基本没有确认到三糖以上的寡糖或葡萄糖、果糖的生成。由该结果可以获知，在枯草芽孢杆菌中以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶时，不能高效地制造附加有果糖的糖质。

[0288] (2)以巨大芽孢杆菌为宿主的情况

[0289] [2-1]重组载体的制作

[0290] 在下述条件下进行PCR，从而扩增编码CapA蛋白及来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA，将其作为DNA片段20。

[0291] 《编码CapA蛋白及来自B.Indica的β-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列的DNA扩增用PCR的条件》

[0292] 模板:实施例4(1)的pCDF-capA_opti-indica重组载体

[0293] 正向引物:5'-AGGGGGAAATGACAAATGAAAGAAAAGAAACTGAACTTCC-3'(序列号49)

[0294] 反向引物:5'-ACTAGTTTGGACCATTTACTGGCCGTTCGTGACACCATGG-3'(序列号50)

[0295] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0296] 反应条件:以94℃下15秒、58℃下20秒、68℃下3分钟为1个循环，21个循环。

[0297] 此外，以作为巨大芽孢杆菌用表达载体的pWH1520质粒(MoBiTec公司)的碱基序列为基础，设计下述序列号51及序列号52的引物，在下述条件下进行PCR，从而扩增来自pWH1520质粒的DNA，将其作为DNA片段21。

[0298] 《pWH1520质粒的DNA扩增用PCR的条件》

[0299] 模板:pWH1520质粒(MoBiTec公司)

[0300] 正向引物:5'-ATGGTCCAAACTAGTACTAATAAAATTAAT-3'(序列号51)

[0301] 反向引物:5'-TTGTCATTTCCCCCTTTGATTTAAGTGAAC-3'(序列号52)

[0302] PCR用酶:KOD-Plus-Neo(东洋纺公司)

[0303] 反应条件:以94℃下15秒、68℃下9分钟为1个循环，35个循环。

[0304] 然后，使用In-Fusion HD Cloning Kit(宝生物公司)，按照所附的说明书将DNA片段20和DNA片段21连接，将其作为pWH1520-capA_opti-indica重组载体。

[0305] [2-2]转化体的制作

[0306] 将本实施例5(2)[2-1]的pWH1520-capA_opti-indica重组载体通过实施例1(5)中记载的方法导入大肠杆菌，并对重组大肠杆菌进行培养后，由重组大肠杆菌回收pWH1520-capA_opti-indica重组载体。将回收的pWH1520-capA_opti-indica重组载体和作为对照的pWH1520质粒(MoBiTec公司)利用原生质体法分别导入巨大芽孢杆菌中，获得转化体，将其作为重组巨大芽孢杆菌。原生质体法使用巨大芽孢杆菌Protoplast(Mobitec公司)按照所附的说明书进行。将获得的重组巨大芽孢杆菌在加入到含有终浓度10μg/mL的四环素的LB培养基1mL，在30℃、220rpm下旋转培养6小时，然后在培养基中添加木糖以使其终浓度为0.5(w/w)％，在相同条件下再旋转培养18小时，将其作为重组巨大芽孢杆菌培养液。

[0307] [2-3]酶反应及糖组成的确认

[0308] 使本实施例5(2)[2-2]的重组巨大芽孢杆菌培养液通过本实施例5(1)[1-4]中记载的方法进行酶反应后，进行反应液的糖组成的确认。其结果如图3所示。

[0309] 如图3所示，利用pWH1520-capA_opti-indica重组载体转化的重组巨大芽孢杆菌的反应液与利用pWH1520质粒转化的重组巨大芽孢杆菌的反应液的HPLC谱图的形状基本相同，二者都基本没有确认到三糖以上的寡糖或葡萄糖、果糖的生成。由该结果可以获知，在巨大芽孢杆菌中以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶时，不能高效地制造附加有果糖的糖质。

[0310] 由以上的本实施例5(1)[1-4]及(2)[2-3]的结果可以获知，虽然PgsA蛋白来自枯草芽孢杆菌、CapA蛋白来自巨大芽孢杆菌，但以这些为宿主，以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶时，不能高效地制造附加有果糖的糖质。

[0311] 此外，一直以来在蛋白质的表达中常用的酵母具有内源性的β-呋喃果糖苷酶(http://www.mfc.co.JP/product/kouso/invertase/)，因此在导入外源的β-呋喃果糖苷酶制造附加有果糖的糖质时，需要使用使该内源性β-呋喃果糖苷酶的活性(蔗糖的同化性)缺失的变异株(例如日本专利第3628336号、第24页(3))，作为利用β-呋喃果糖苷酶的附加有果糖的糖质的制造方法的宿主缺乏通用性、易操作性。

[0312] 综上可以获知，作为利用以1个多肽形式表达用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白和β-呋喃果糖苷酶的微生物进行的、附加有果糖的糖质的制造方法中的宿主，大肠杆菌是最合适的。

[0313] ＜实施例6＞受体底物的研究

[0314] 对于能够借助与用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白融合从而以1个多肽形式在大肠杆菌中表达的β-呋喃果糖苷酶，接受果糖的转移的物质(受体底物)也进行了研究。具体而言，对于单糖、二糖和糖苷、以及作为糖质以外的物质的氢醌是否能够作为受体底物进行了研究。

[0315] (1)单糖、二糖及糖苷

[0316] [1-1]酶反应

[0317] 将利用实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体转化的实施例1(5)的重组大肠杆菌的培养液在12000rpm、4℃下离心分离5分钟收集菌体后，准备了按照菌体湿重计约10mg的量。此外，准备作为果糖残基的供体底物的蔗糖(砂糖；三井制糖公司)、作为受体底物的单糖(D(+)-木糖(和光纯药公司)及L(+)-阿拉伯糖(和光纯药公司))、二糖(蜜二糖(和

光纯药公司)及乳糖一水合物(和光纯药公司))以及糖苷(α-甲基-D(+)-葡糖苷(和光纯药公司)),调制组成如表4所示的底物溶液No.1～5。使用0.04M磷酸钠缓冲液(pH7.0)作为底物溶液的溶剂。对于10mg的湿菌体分别添加底物溶液No.1～5各200μL而悬浮,将其在40℃、200rpm下振荡1小时,从而进行β-呋喃果糖苷酶的酶反应,获得反应液。将添加底物溶液No.1～5而获得的反应液分别作为反应液No.1～5。

[0318] [表4]

[0319]

	底物溶液 No.1	底物溶液 No.2	底物溶液 No.3	底物溶液 No.4	底物溶液 No.5
溶剂(w/w)%	0.04M 的磷酸钠缓冲液 (pH7.0)				
供体底物 (w/w)%	蔗糖: 50.8	蔗糖: 50.6	蔗糖: 49.1	蔗糖: 66.8	蔗糖: 52.1
受体底物 (w/w)%	D(+)-木糖:49.2	L(+)-阿拉伯糖: 49.4	蜜二糖: 50.9	乳糖一水合物: 33.2	α-甲基-D(+)-葡糖苷: 47.9
底物浓度 (w/w)%	33.3	33.3	33.3	27.3	33.3

[0320] [1-2]糖组成的确认

[0321] 在本实施例6(1)[1-1]的反应液No.1～5各50μL中加入水450μL及乙腈500μL而稀释后,在70℃下加热10分钟。然后,在25℃、15000×g下离心分离10分钟而回收上清,用孔径0.45μm的过滤器过滤,将获得的滤液作为HPLC样品。将其在下述条件下供于HPLC,测定反应液中所含有的各糖的比例。关于各糖的比例,以面积百分率形式算出各峰的面积相对于检测到的全部峰的面积总和的比例。其结果如表5所示。

[0322] 《HPLC的条件》

[0323] 柱:TOSOH TSKgel Amide80粒径5μm(4.6φ×250mm)

[0324] 洗提液:乙腈水溶液(反应液No.1～2及5的HPLC样品:78%;反应液No.3～4的HPLC样品:70%)

[0325] 柱温度:70℃

[0326] 流速:1.0mL/分钟

[0327] 注入量:20μL

[0328] 检测:差示折射率检测器(RID;昭和电工公司)

[0329] [表5]

[0330]

	寡糖的比例(%)						
	来自受体底物		来自供体底物				其它
	受体底物	来自受体底物的寡糖	D(+)-果糖	D(+)-葡萄糖	蔗糖	来自蔗糖的寡糖	
反应液No.1	D(+)-木糖 41.4	18.1	7.0	26.2	6.6	0.7	-
反应液No.2	L(+)-阿拉伯糖 39.5	27.9	3.2	24.9	4.5	-	-
反应液No.3	蜜二糖 39.2	20.8	4.5	21.1	11.9	2.3	0.2
反应液No.4	乳糖一水合物 20.3	18.9	8.1	24.4	25.0	3.6	1.1
反应液No.5	α-甲基-D(+)-葡糖苷 42.8	16.4	6.3	23.1	11.3	1.0	-

[0331] 如表5所示，可以确认：反应液No.1～5均含有来自受体底物的寡糖。即，可以获知：反应液No.1～5中，果糖残基转移至D(+)-木糖、L(+)-阿拉伯糖、蜜二糖、乳糖一水合物及α-甲基-D(+)-葡糖苷而生成寡糖。这些结果表明，糖质可以成为与用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白融合从而以1个多肽形式在大肠杆菌中表达的β-呋喃果糖苷酶的受体底物。

[0332] (2)氢醌

[0333] [2-1]酶反应

[0334] 对于利用实施例1(2)的pCDF-pgsA-indica重组载体转化的实施例1(5)的重组大肠杆菌的培养液，准备了按照菌体的湿重计为约10mg的量。此外，分别准备作为果糖残基的供体底物的蔗糖(砂糖；三井制糖公司)、作为受体底物的氢醌(和光纯药公司)。在50mM的乙酸缓冲液(pH6.0)1mL中溶解蔗糖342mg(终浓度1M)及氢醌28mg(终浓度0.25M)，将其作为底物溶液。对于10mg的湿菌体添加500μL的底物溶液而悬浮，然后在40℃、200rpm下振荡1小时，从而进行β-呋喃果糖苷酶的酶反应，将该样品作为反应液。此外，准备下述组成的对照溶液No.1～3，同样地在40℃、200rpm下振荡1小时。获得对照反应液No.1～3。

[0335] 对于对照溶液No.1：10mg的湿菌体，添加50mM乙酸缓冲液(pH6.0)500μL。

[0336] 对照溶液No.2：仅底物溶液(不含湿菌体)。

[0337] 对照溶液No.3：对于10mg的湿菌体，添加含有终浓度1M的蔗糖的50mM乙酸缓冲液(pH6.0)500μL。

[0338] [2-2]反应液中所含有的物质的确认

[0339] 对于本实施例6(2)[2-1]的样品反应液及对照反应液No.1～3，利用本实施例6(1)[1-2]中记载的方法进行HPLC，确认反应液中所含有的物质。其中，HPLC的条件如下所述。其结果如图4所示。需要说明的是，在280nm的UV检测中，主要检测氢醌及来自于氢醌的产物，在ELSD中主要检测糖及来自于糖的产物。

[0340] 《HPLC的条件》

[0341] 柱：Imtakt Unison UK-Amino

[0342] 洗提液:乙腈水溶液(0～30分钟;98～70%梯度)

[0343] 柱温度:60℃

[0344] 流速:0.4mL/分钟

[0345] 注入量:1μL

[0346] 检测:UV检测器(280nm)及蒸发光散射检测器(ELSD)

[0347] 如图4的最上段的HPLC谱图中的箭头所示,仅在样品反应液中,在保持时间约12分钟、约19分钟及约24分钟处确认到峰。在同样的保持时间,对照反应液No.1中没有检测到峰,因此可知不是来自菌体,在对照反应液No.2中没有检测到峰,因此可知不是氢醌或蔗糖,在对照反应液No.3中没有检测到峰,因此可知不是蔗糖在β-呋喃果糖苷酶作用下生成的产物(葡萄糖、果糖、蔗果三糖等寡糖等)。即,可以获知:在样品反应液中,果糖转移到氢醌而生成了糖苷。这些结果表明,糖质以外的物质也可以成为与用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白融合从而以1个多肽形式在大肠杆菌中表达的β-呋喃果糖苷酶的受体底物。

[0348] 以上的本实施例6(1)[1-2]及(2)[2-2]的结果表明:在与用于使蛋白在细胞表面表达的锚定蛋白融合从而以1个多肽形式在大肠杆菌中表达的β-呋喃果糖苷酶作用下,能够以糖质、糖质以外的物质作为受体底物,来制造附加有果糖的糖质。

[0001]

序列表

<110> 物产食品科技股份有限公司
日本迈科洛生物制药有限公司

<120> 附加有果糖的糖质的制造方法

<130> PCT0656

<150> JP 2013-273402
<151> 2013-12-27

<150> JP 2014-158037
<151> 2014-08-01

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1605
<212> DNA
<213> 印度拜叶林克氏菌

<400> 1
atggcaagtc gatcgtttaa tgtttgtata cgtagcctca tcgcgggctc gcttctgact 60

gccacagcac tgtccgctca ggctcaatcg ggttacccga taccgactcc gcattcggga 120

caagcctatg atccatttgc agattttacc gccaaatgga cgcgcgccaa tgcccgtcaa 180

atcaaggcgc aatcacatgt cccggtgtca cccgatcaga attcgctgcc gctcaatctg 240

acgatgcccg atatccctgc cgatttcccg caaaccaacc cggacgtgtg ggtgtgggat 300

acgtggcctc tcgccgatgt gcatggcaat cagctgagct tccaggggtg ggaggtcatt 360

ttctcgctga ccgctgatcc gcatgccggt tatgttttcg atgatcgcca cgttcacgca 420

cgtatcggct tcttttatcg caaggccgga attcccgcga accagcgccc gattgatggc 480

ggctggatct atggcgggca tttgttcccg gatggtagca gcgtcaaagt cttcggtaac 540

gtccccatga cgcaaaacgc ggaatggtcc ggcggcgccc gcttcgtggg cggcccttat 600

gctgatggcc cgcaacacgc ctacctgaag aacaacaacg tcagcctcta ttacacggcg 660

acatcgttca accgtaatgc tcagggcggt aacatcacac cgccgatcgc catcatctcg 720

cgcgcggatg gacaaattca agcagatgat aagcatgtgt ggttcacggg attcgatcaa 780

catctcccgc tgctcgcacc cgacggcaaa tattatcaga ccggtcagca gaacgagttc 840

ttctccttcc gcgatcccta tgtcttcctt gaccccgctc atccgggcaa gaccttcatg 900

gtcttcgaag gcaataccgc cgtgcagcgc ggctcccgct cctgcaccga ggcagatctc 960

[0002]

ggatattctc ccaatgaccc gaacaaagaa gacctgaatg cggtcatgga ctccggagcc 1020

atttaccaaa tggccaatgt cggtcttgcc gtggcgacga acgatgaact gacgcagtgg 1080

aagttcctgc cgccgatcct gtccggtaat tgcgtgaacg atcagaccga acgtcctcag 1140

atctatctga aggatggaaa atattacctg ttcacgatca gccaccgcac gacctatgcg 1200

gcgggcgtcg atgggccgga cggcgtctat ggcttcgtcg gtgatggcat tcgcagcgac 1260

ttcattcccc tgaatggcct cagcggtctc acgctcggca acccgaccga tctctatcag 1320

ccggccggcg ctccttacgc cttgaatcca aaccaaaatc ctcggacgtt ccagtcctat 1380

tcgcattatg tcatgccggg cggcctcgtt gaatcgttta tcgatgccat cggccctcgt 1440

cgcggtggcg cgctggctcc gacggtgaag atcaacatca acggaacttc taccatcctc 1500

gacaggacct atggcaatgc cggattgggt ggctatggcg acatcccggc caatcttccc 1560

gcgcttggcc aagttaatgg ccatggtgtc acgaacggcc agtaa 1605

<210> 2
<211> 534
<212> PRT
<213> 印度拜叶林克氏菌

<400> 2

Met Ala Ser Arg Ser Phe Asn Val Cys Ile Arg Ser Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

Ser Leu Leu Thr Ala Thr Ala Leu Ser Ala Gln Ala Gln Ser Gly Tyr
20 25 30

Pro Ile Pro Thr Pro His Ser Gly Gln Ala Tyr Asp Pro Phe Ala Asp
35 40 45

Phe Thr Ala Lys Trp Thr Arg Ala Asn Ala Arg Gln Ile Lys Ala Gln
50 55 60

Ser His Val Pro Val Ser Pro Asp Gln Asn Ser Leu Pro Leu Asn Leu
65 70 75 80

Thr Met Pro Asp Ile Pro Ala Asp Phe Pro Gln Thr Asn Pro Asp Val
85 90 95

Trp Val Trp Asp Thr Trp Pro Leu Ala Asp Val His Gly Asn Gln Leu
100 105 110

Ser Phe Gln Gly Trp Glu Val Ile Phe Ser Leu Thr Ala Asp Pro His
115 120 125

Ala Gly Tyr Val Phe Asp Asp Arg His Val His Ala Arg Ile Gly Phe
130 135 140

Phe Tyr Arg Lys Ala Gly Ile Pro Ala Asn Gln Arg Pro Ile Asp Gly
145 150 155 160

Gly Trp Ile Tyr Gly Gly His Leu Phe Pro Asp Gly Ser Ser Val Lys
165 170 175

Val Phe Gly Asn Val Pro Met Thr Gln Asn Ala Glu Trp Ser Gly Gly
180 185 190

Ala Arg Phe Val Gly Gly Pro Tyr Ala Asp Gly Pro Gln His Ala Tyr
195 200 205

Leu Lys Asn Asn Asn Val Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Thr Ser Phe Asn
210 215 220

[0003]

Arg Asn Ala Gln Gly Gly Asn Ile Thr Pro Pro Ile Ala Ile Ile Ser
225 230 235 240

Arg Ala Asp Gly Gln Ile Gln Ala Asp Asp Lys His Val Trp Phe Thr
245 250 255

Gly Phe Asp Gln His Leu Pro Leu Leu Ala Pro Asp Gly Lys Tyr Tyr
260 265 270

Gln Thr Gly Gln Gln Asn Glu Phe Phe Ser Phe Arg Asp Pro Tyr Val
275 280 285

Phe Leu Asp Pro Ala His Pro Gly Lys Thr Phe Met Val Phe Glu Gly
290 295 300

Asn Thr Ala Val Gln Arg Gly Ser Arg Ser Cys Thr Glu Ala Asp Leu
305 310 315 320

Gly Tyr Ser Pro Asn Asp Pro Asn Lys Glu Asp Leu Asn Ala Val Met
325 330 335

Asp Ser Gly Ala Ile Tyr Gln Met Ala Asn Val Gly Leu Ala Val Ala
340 345 350

Thr Asn Asp Glu Leu Thr Gln Trp Lys Phe Leu Pro Pro Ile Leu Ser
355 360 365

Gly Asn Cys Val Asn Asp Gln Thr Glu Arg Pro Gln Ile Tyr Leu Lys
370 375 380

Asp Gly Lys Tyr Tyr Leu Phe Thr Ile Ser His Arg Thr Thr Tyr Ala
385 390 395 400

Ala Gly Val Asp Gly Pro Asp Gly Val Tyr Gly Phe Val Gly Asp Gly
405 410 415

Ile Arg Ser Asp Phe Ile Pro Leu Asn Gly Leu Ser Gly Leu Thr Leu
420 425 430

Gly Asn Pro Thr Asp Leu Tyr Gln Pro Ala Gly Ala Pro Tyr Ala Leu
435 440 445

[0004]

Asn Pro Asn Gln Asn Pro Arg Thr Phe Gln Ser Tyr Ser His Tyr Val
450 455 460

Met Pro Gly Gly Leu Val Glu Ser Phe Ile Asp Ala Ile Gly Pro Arg
465 470 475 480

Arg Gly Gly Ala Leu Ala Pro Thr Val Lys Ile Asn Ile Asn Gly Thr
485 490 495

Ser Thr Ile Leu Asp Arg Thr Tyr Gly Asn Ala Gly Leu Gly Gly Tyr
500 505 510

Gly Asp Ile Pro Ala Asn Leu Pro Ala Leu Gly Gln Val Asn Gly His
515 520 525

Gly Val Thr Asn Gly Gln
530

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 正向引物

<400> 3
atggcaagtc gatcgtttaa tgtttgtata c 31

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 4
tttaccagac tcgagttact ggccgttcgt gac 33

<210> 5
<211> 1143
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌

<400> 5
atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60

aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgctttc 120

atgtgggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca 180

gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 240

ggggcagaca gtatttttca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca 300

ggaaactttg aaaacccggt aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt 360

catctgcaga cgaataagga atcagtgaaa gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc 420

aacagcgcca acaaccacgc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttgga 480

gaatttgcga agcaaaatct tgatatcgtt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa 540

aagaaaattt cgtaccagaa agtcaacggg gtaacgattg cgacgcttgg ctttaccgat 600

gtgtccggga aaggtttcgc ggctaaaaag aatacgccgg gcgtgctgcc cgcagatcct 660

gaaatcttca tccctatgat ttcagaagcg aaaaaacatg cggacattgt tgttgtgcag 720

tcacactggg gacaagagta tgacaatgat ccaaatgacc gccagcgcca gcttgcaaga 780

gccatgtctg atgcgggagc tgacatcatc gtcggccatc acccgcacgt cttagaaccg 840

attgaagtat ataacggaac cgtcattttc tacagcctcg gcaactttgt ctttgaccaa 900

ggctggacga gaacaagaga cagtgcactg gttcagtatc acctgaagaa aaatggaaca 960

[0006]

ggacgctttg aagtgacacc gatcgatatc catgaagcga cacctgcgcc tgtgaaaaaa 1020

gacagcctta aacagaaaac cattattcgc gaactgacga aagactctaa tttcgcttgg 1080

aaagtagaag acggaaaact gacgtttgat attgatcata gtgacaaact aaaatctaaa 1140

taa 1143

<210> 6
<211> 380
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌

<400> 6

Met Lys Lys Glu Leu Ser Phe His Glu Lys Leu Leu Lys Leu Thr Lys
1 5 10 15

Gln Gln Lys Lys Lys Thr Asn Lys His Val Phe Ile Ala Ile Pro Ile
20 25 30

Val Phe Val Leu Met Phe Ala Phe Met Trp Ala Gly Lys Ala Glu Thr
35 40 45

Pro Lys Val Lys Thr Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ser Ala Ser Phe Val
50 55 60

Gly Asp Ile Met Met Gly Arg Tyr Val Glu Lys Val Thr Glu Gln Lys
65 70 75 80

Gly Ala Asp Ser Ile Phe Gln Tyr Val Glu Pro Ile Phe Arg Ala Ser
85 90 95

Asp Tyr Val Ala Gly Asn Phe Glu Asn Pro Val Thr Tyr Gln Lys Asn
100 105 110

Tyr Lys Gln Ala Asp Lys Glu Ile His Leu Gln Thr Asn Lys Glu Ser
115 120 125

Val Lys Val Leu Lys Asp Met Asn Phe Thr Val Leu Asn Ser Ala Asn
130 135 140

Asn His Ala Met Asp Tyr Gly Val Gln Gly Met Lys Asp Thr Leu Gly
145 150 155 160

Glu Phe Ala Lys Gln Asn Leu Asp Ile Val Gly Ala Gly Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Asp Ala Lys Lys Lys Ile Ser Tyr Gln Lys Val Asn Gly Val Thr
180 185 190

Ile Ala Thr Leu Gly Phe Thr Asp Val Ser Gly Lys Gly Phe Ala Ala
195 200 205

Lys Lys Asn Thr Pro Gly Val Leu Pro Ala Asp Pro Glu Ile Phe Ile
210 215 220

Pro Met Ile Ser Glu Ala Lys Lys His Ala Asp Ile Val Val Val Gln
225 230 235 240

Ser His Trp Gly Gln Glu Tyr Asp Asn Asp Pro Asn Asp Arg Gln Arg
245 250 255

Gln Leu Ala Arg Ala Met Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ile Ile Val Gly
260 265 270

His His Pro His Val Leu Glu Pro Ile Glu Val Tyr Asn Gly Thr Val
[0007] 275 280 285

Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Val Phe Asp Gln Gly Trp Thr Arg
290 295 300

Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Gln Tyr His Leu Lys Lys Asn Gly Thr
305 310 315 320

Gly Arg Phe Glu Val Thr Pro Ile Asp Ile His Glu Ala Thr Pro Ala
325 330 335

Pro Val Lys Lys Asp Ser Leu Lys Gln Lys Thr Ile Ile Arg Glu Leu
340 345 350

Thr Lys Asp Ser Asn Phe Ala Trp Lys Val Glu Asp Gly Lys Leu Thr
355 360 365

Phe Asp Ile Asp His Ser Asp Lys Leu Lys Ser Lys
370 375 380

<210> 7
<211> 31

[0008]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 7
aaacatatga aaaaagaact gagctttcat g 31

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 8
aaaagatctt ttagatttta gtttgtcact atg 33

<210> 9
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 9
aaaggatcct cgggttaccc gataccgact ccgcattcgg gaca 44

<210> 10
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 10
cccctcgagt tactggccgt tcgtgacacc atggccatta ac 42

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 11
catatgtcgg gttacccgat accgac 26

[0009]

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 12
tatatctcct tcttatactt aactaata 28

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 13
gatggttcaa ctagttcggg ttacccgata ccg 33

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 14
gtggtggtgc tcgagttact ggccgttcgt ga 32

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 15
ctcgagcacc accaccacca ccaccaccac taatt 35

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

[0010]

<400> 16
actagttgaa ccatccgatt t 21

<210> 17
<211> 1596
<212> DNA
<213> 瘤状伯克霍尔德菌STM815

<400> 17
atgaacgttg gccaccaccc gcgggtcccc cggatcaccc cccggctgcg cgcgcacttc 60

ctgtcggcag cggtgctgtc ggctgttgcc ctaccggcgc tggctcagac tgcaacgcca 120

ggcttccccg cgccgacgcc gcactcgcag caggcatacg accccgagag cagtttcacg 180

atgcgctgga cccgtgccga catccgtcag atcaaggcgc agtcgcatgc cgcgacggcg 240

gcggacaaga actcgctgcc gctttcgctg accatgccgg acatcccgca ggatttcccg 300

ctgatcaatc cgaacgtctg ggtgtgggac acgtggccgc tggccgacat gcgggcgaac 360

cagctggcgt acaagggctg ggaggtgatc ttttcgctga cggccgatcc gcatgccggc 420

tatacgttcg acgaccgtca cgttcacgcg cgcatcggct tcttctaccg ccgcgcgggc 480

attcccgcat cgcagcgacc cgcgaacggc ggctggacct ggggcggcca tctgttcccg 540

gacggtgcga gcgtcaaggt attcggcacg tcgccgatga ccgacaacgc cgaatggtcg 600

ggctcggcgc gtctcacgca cggcgacaac gtcagcctct actacaccgc gacgtcgttc 660

aaccgttcgg ccccccggcgg cgccgacatt acgccgccgc aggcgatcat cacgcgcgcc 720

gacggtcaca tccacgccga cgacagtcat gtgtggttct caggcttcga cgatcaccag 780

gcattgctca agccggacgg cacctactac cagaccggcg agcagaacac ctacttctca 840

taccgggatc cgttcgtgtt catcgatccc gcgcatccag gcaagaccta catggtgttc 900

gaaggcaaca cgggcggtcc gcgcggcgcg cgcacctgta cggaagccga cctcggctat 960

gcgccgaacg atccgcaacg ggaagacctg aacgcggtga tgaactcggg cgcggcgtat 1020

cagaaggcca atgttggtct cgcggtcgcg acgaatccgc aactgaccga atggaagttc 1080

ctgccaccga tcctgtcggc gaactgcgtc gatgatcaga ccgagcgccc gcagatttac 1140

ctgaaggacg gcaagtacta cctgttcacg atcagccacc gcacaacgat ggcagcaggc 1200

gttgacggac cggacggtgt ctacggcttc gtcggcaacg gcatccgcag cgacttcttg 1260

ccgctgaacg gcggcagcgg cctcgtactc ggcaacccga ccgacttttc cgccccggcg 1320

ggtgcgccgt acgcgcagga cccgaaccag aacccgcgcg agttccagtc gtactcgcac 1380

tacgtgatgc cgggtggtct cgtcgagtcg tttatcgatg caatcggctc gcggcgcggc 1440

[0011]

ggcacgcttg cgccgaccgt caagatcaac atcaacggtg acacgacggt cgtggaccgg 1500

acgtatggca agggcggtct cggcggctac ggcgacattc ccgcaaacca gtcggcgccc 1560

ggcaatggaa acgggcaggg cggcaacagc cagtaa 1596

<210> 18
<211> 531
<212> PRT
<213> 瘤状伯克霍尔德菌STM815

<400> 18

Met Asn Val Gly His His Pro Arg Val Pro Arg Ile Thr Pro Arg Leu
1 5 10 15

Arg Ala His Phe Leu Ser Ala Ala Val Leu Ser Ala Val Ala Leu Pro
20 25 30

Ala Leu Ala Gln Thr Ala Thr Pro Gly Phe Pro Ala Pro Thr Pro His
35 40 45

Ser Gln Gln Ala Tyr Asp Pro Glu Ser Ser Phe Thr Met Arg Trp Thr
50 55 60

Arg Ala Asp Ile Arg Gln Ile Lys Ala Gln Ser His Ala Ala Thr Ala
65 70 75 80

Ala Asp Lys Asn Ser Leu Pro Leu Ser Leu Thr Met Pro Asp Ile Pro
85 90 95

Gln Asp Phe Pro Leu Ile Asn Pro Asn Val Trp Val Trp Asp Thr Trp
100 105 110

Pro Leu Ala Asp Met Arg Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Lys Gly Trp Glu
115 120 125

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

Asp Arg His Val His Ala Arg Ile Gly Phe Phe Tyr Arg Arg Ala Gly
145 150 155 160

Ile Pro Ala Ser Gln Arg Pro Ala Asn Gly Gly Trp Thr Trp Gly Gly
165 170 175

His Leu Phe Pro Asp Gly Ala Ser Val Lys Val Phe Gly Thr Ser Pro
180 185 190

Met Thr Asp Asn Ala Glu Trp Ser Gly Ser Ala Arg Leu Thr His Gly
195 200 205

Asp Asn Val Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Thr Ser Phe Asn Arg Ser Ala
210 215 220

Pro Gly Gly Ala Asp Ile Thr Pro Pro Gln Ala Ile Ile Thr Arg Ala
225 230 235 240

Asp Gly His Ile His Ala Asp Asp Ser His Val Trp Phe Ser Gly Phe
245 250 255

Asp Asp His Gln Ala Leu Leu Lys Pro Asp Gly Thr Tyr Tyr Gln Thr
260 265 270

Gly Glu Gln Asn Thr Tyr Phe Ser Tyr Arg Asp Pro Phe Val Phe Ile
275 280 285

[0012]

Asp Pro Ala His Pro Gly Lys Thr Tyr Met Val Phe Glu Gly Asn Thr
290 295 300

Gly Gly Pro Arg Gly Ala Arg Thr Cys Thr Glu Ala Asp Leu Gly Tyr
305 310 315 320

Ala Pro Asn Asp Pro Gln Arg Glu Asp Leu Asn Ala Val Met Asn Ser
325 330 335

Gly Ala Ala Tyr Gln Lys Ala Asn Val Gly Leu Ala Val Ala Thr Asn
340 345 350

Pro Gln Leu Thr Glu Trp Lys Phe Leu Pro Pro Ile Leu Ser Ala Asn
355 360 365

Cys Val Asp Asp Gln Thr Glu Arg Pro Gln Ile Tyr Leu Lys Asp Gly
370 375 380

Lys Tyr Tyr Leu Phe Thr Ile Ser His Arg Thr Thr Met Ala Ala Gly
385 390 395 400

[0013]

```
Val Asp Gly Pro Asp Gly Val Tyr Gly Phe Val Gly Asn Gly Ile Arg
                405                 410                 415

Ser Asp Phe Leu Pro Leu Asn Gly Gly Ser Gly Leu Val Leu Gly Asn
            420                 425                 430

Pro Thr Asp Phe Ser Ala Pro Ala Gly Ala Pro Tyr Ala Gln Asp Pro
        435                 440                 445

Asn Gln Asn Pro Arg Glu Phe Gln Ser Tyr Ser His Tyr Val Met Pro
    450                 455                 460

Gly Gly Leu Val Glu Ser Phe Ile Asp Ala Ile Gly Ser Arg Arg Gly
465                 470                 475                 480

Gly Thr Leu Ala Pro Thr Val Lys Ile Asn Ile Asn Gly Asp Thr Thr
                485                 490                 495

Val Val Asp Arg Thr Tyr Gly Lys Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Gly Asp
            500                 505                 510

Ile Pro Ala Asn Gln Ser Ala Pro Gly Asn Gly Asn Gly Gln Gly Gly
        515                 520                 525

Asn Ser Gln
    530
```

<210> 19
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 19
aaactaaaat ctaaaagatc tcagactgca acgccaggct tccccg 46

<210> 20
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

[0014]

<400> 20
ggtttcttta ccagactcga gttactggct gttgccgccc tgcccgtttc c 51

<210> 21
<211> 1887
<212> DNA
<213> 白曲霉

<400> 21
atgaagcttc aaacggcttc cgtactgctc ggcagtgctg ctgctgcctc tccttcaatg 60

cagacgcggg cctccgtggt catcgactac aatgtcgctc ctccaaacct ctccaccctg 120

cccaatggct ccctcttcga aacatggcgg ccccgcgccc acgtcctgcc cccaaacggc 180

cagatcggtg atccctgcct gcattacacc gatcccgcca cgggcctctt ccacgtcggc 240

ttccttcacg atggcagcgg catctccagt gccaccaccg atgacctagc cacctaccaa 300

gacctcaacc aaggcaacca agtcattgtc cctgggggca tcaacgaccc cgtcgctgtc 360

ttcgacggct ccgtcatccc caacggcatc aacggcctcc ccaccctcct ctacacctcc 420

gtctcctacc tccccatcca ctggtcgatc ccctacaccc gcggcagtga gactcaatcc 480

ctcgccgtct cctccgacgg cggcagcaac ttcaccaagc tcgaccaggg ccccgtcatc 540

cctggccctc ccttcgccta caacgtcacc gcattccggg acccctacgt cttccaaaac 600

cccactcttg actccctcct ccacagcaag aacaacacct ggtacaccgt catctccggt 660

ggtctgcacg aaaagggccc cgctcaattc ctctaccgcc agtacgactc ggactttcag 720

tactgggagt acctcggcca atggtggcac gaacccacca actccacctg gggtaacggc 780

acctgggccg gccgctgggc cttcaacttt gagaccggca acgtcttcag tctcgacgag 840

tacggataca acccccacgg ccagatcttc accaccatcg gcactgaggg ctctgacctg 900

cccgtcgtgc cccagctcac cagcatccac gacatgctct gggtgtccgg tacagtctct 960

cgcaatggct ctgtctcgtt caaccccaac atggcgggct tcctcgactg gggcttctcc 1020

tcttacgctg ctgccggaaa ggttctcccc tcgacttctc tgccttccac gaagagcggc 1080

gccccggatc gcttcatctc ctacgtctgg ctgtccggtg acctgttcga acaggccgaa 1140

gggttcccca cgaaccagca gaattggacc ggtacgctgc tgcttccgcg tgagttgcgc 1200

gtgctgtata tccccaatgt ggtggacaat gctctggccc gggagtctgg tgcctcgtgg 1260

caggtcgtga gcagcgatgg cagtgcgggc accgtcgagc tgcagacgct gggtatctcc 1320

attgcccggg agaccaaggc cgcgttgctg tcgggaacgt cgttcactga gtccggccgc 1380

accctgaaca gcagtggtgt tgttccgttc aagcgctcgc catccgagaa gttcttcgtt 1440

[0015]

ctgtccgcac agctgtcctt ccctgcttcg gctaggggat cgggacttaa gagtgggttc 1500

cagatcctct catcggagca cgagagtacc actgtgtact accagttctc gaatgagtcg 1560

attatcgtgg atcgtagcaa cactagtgct gcggcgcgca cgactgatgg tatcgatagc 1620

agtgcggaag ctggcaagtt gcgtctgttt gacgtgctga atggcggcga gcaggccatt 1680

gagacgctag atttgactct cgtggtggat aactccgtgt tggaggtgta tgccaatggt 1740

cggtttgcgt tgagtacctg ggttcgttcc tggtacgcca actccactaa catcagcttc 1800

ttccataatg gcgtgggtgg tgttgcgttc tccaaagtga ctgtgtccga gggcttgtat 1860

gatgcttggc cggatcgtca gtattga 1887

<210> 22
<211> 628
<212> PRT
<213> 白曲霉

<400> 22

Met Lys Leu Gln Thr Ala Ser Val Leu Leu Gly Ser Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ser Met Gln Thr Arg Ala Ser Val Val Ile Asp Tyr Asn Val
20 25 30

Ala Pro Pro Asn Leu Ser Thr Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Glu Thr
35 40 45

Trp Arg Pro Arg Ala His Val Leu Pro Pro Asn Gly Gln Ile Gly Asp
50 55 60

Pro Cys Leu His Tyr Thr Asp Pro Ala Thr Gly Leu Phe His Val Gly
65 70 75 80

Phe Leu His Asp Gly Ser Gly Ile Ser Ser Ala Thr Thr Asp Asp Leu
85 90 95

Ala Thr Tyr Gln Asp Leu Asn Gln Gly Asn Gln Val Ile Val Pro Gly
100 105 110

Gly Ile Asn Asp Pro Val Ala Val Phe Asp Gly Ser Val Ile Pro Asn
115 120 125

Gly Ile Asn Gly Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Val Ser Tyr Leu
130 135 140

Pro Ile His Trp Ser Ile Pro Tyr Thr Arg Gly Ser Glu Thr Gln Ser
145 150 155 160

Leu Ala Val Ser Ser Asp Gly Gly Ser Asn Phe Thr Lys Leu Asp Gln
165 170 175

Gly Pro Val Ile Pro Gly Pro Pro Phe Ala Tyr Asn Val Thr Ala Phe
180 185 190

Arg Asp Pro Tyr Val Phe Gln Asn Pro Thr Leu Asp Ser Leu Leu His
195 200 205

Ser Lys Asn Asn Thr Trp Tyr Thr Val Ile Ser Gly Gly Leu His Glu
210 215 220

Lys Gly Pro Ala Gln Phe Leu Tyr Arg Gln Tyr Asp Ser Asp Phe Gln
225 230 235 240

[0016] Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly Gln Trp Trp His Glu Pro Thr Asn Ser Thr
245 250 255

Trp Gly Asn Gly Thr Trp Ala Gly Arg Trp Ala Phe Asn Phe Glu Thr
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Leu Asp Glu Tyr Gly Tyr Asn Pro His Gly Gln
275 280 285

Ile Phe Thr Thr Ile Gly Thr Glu Gly Ser Asp Leu Pro Val Val Pro
290 295 300

Gln Leu Thr Ser Ile His Asp Met Leu Trp Val Ser Gly Thr Val Ser
305 310 315 320

Arg Asn Gly Ser Val Ser Phe Asn Pro Asn Met Ala Gly Phe Leu Asp
325 330 335

Trp Gly Phe Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gly Lys Val Leu Pro Ser Thr
340 345 350

Ser Leu Pro Ser Thr Lys Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ile Ser Tyr

355 360 365

Val Trp Leu Ser Gly Asp Leu Phe Glu Gln Ala Glu Gly Phe Pro Thr
370 375 380

Asn Gln Gln Asn Trp Thr Gly Thr Leu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Arg
385 390 395 400

Val Leu Tyr Ile Pro Asn Val Val Asp Asn Ala Leu Ala Arg Glu Ser
405 410 415

Gly Ala Ser Trp Gln Val Val Ser Ser Asp Gly Ser Ala Gly Thr Val
420 425 430

Glu Leu Gln Thr Leu Gly Ile Ser Ile Ala Arg Glu Thr Lys Ala Ala
435 440 445

Leu Leu Ser Gly Thr Ser Phe Thr Glu Ser Gly Arg Thr Leu Asn Ser
450 455 460

[0017] Ser Gly Val Val Pro Phe Lys Arg Ser Pro Ser Glu Lys Phe Phe Val
465 470 475 480

Leu Ser Ala Gln Leu Ser Phe Pro Ala Ser Ala Arg Gly Ser Gly Leu
485 490 495

Lys Ser Gly Phe Gln Ile Leu Ser Ser Glu His Glu Ser Thr Thr Val
500 505 510

Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser Ile Ile Val Asp Arg Ser Asn Thr
515 520 525

Ser Ala Ala Ala Arg Thr Thr Asp Gly Ile Asp Ser Ser Ala Glu Ala
530 535 540

Gly Lys Leu Arg Leu Phe Asp Val Leu Asn Gly Gly Glu Gln Ala Ile
545 550 555 560

Glu Thr Leu Asp Leu Thr Leu Val Val Asp Asn Ser Val Leu Glu Val
565 570 575

Tyr Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu Ser Thr Trp Val Arg Ser Trp Tyr
580 585 590

[0018]

Ala Asn Ser Thr Asn Ile Ser Phe Phe His Asn Gly Val Gly Gly Val
595 600 605

Ala Phe Ser Lys Val Thr Val Ser Glu Gly Leu Tyr Asp Ala Trp Pro
610 615 620

Asp Arg Gln Tyr
625

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 23
tctggtaaag aaaccgctgc tgcgaaattt 30

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 24
tttagatttt agtttgtcac tatgatcaat 30

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 25
aaatctaaaa gatcctccgt ggtcatcgac tac 33

<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

[0019]

<400> 26
tttaccagac tcgagtcaat actgacgatc cggc 34

<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 27
ctcgagtctg gtaaagaaac cgctgctgcg aaa 33

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 28
ggatctttta gattttagtt tgtcactatg atcaa 35

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 29
catatgcaga ctgcaacgcc aggct 25

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 30
tatatctcct tcttatactt aactaata 28

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

[0020]

<220>
<223> 正向引物

<400> 31
catatgtccg tggtcatcga ctac 24

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 32
tatatctcct tcttatactt aactaata 28

<210> 33
<211> 1197
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> capA_opti基因

<400> 33
atgaaagaaa agaaactgaa cttccaagaa aaggtcctga tgtttattaa gaaaaccaag 60

ccgacgacgg gcaagcaagc actgattctg acgccgatcc tgattgttat cctggctctg 120

tcgggctgga tggaacgtag cgatgcgctg gaaaacccgg aaaccgccaa tccggaagca 180

aacaatgatc tgaccatgac gatggtgggc gacattatga tgggtcgtca tgtgcgcgaa 240

gttaccgaac gttatggcga agattttgtc ttccgcaacg tggaaccgtt tttcaaaaat 300

agcgactatg tgtctggtaa ctacgaaacg ccgattctga ccaatgatgt tgactcctat 360

aaagcgatgg aaaagggcat ccatctgtac tcaaaaccgg ctgatctggc gaccgtgaag 420

aatgctggtt ttgacgttct gaacctggcg aacaatcaca gtatggatta ttccgctaaa 480

ggcctggaag acacgattag caccttttgaa gcaaataagc tggatttcgt gggcgctggt 540

cgtaactctg aagaagcgaa acatatcagt tacaaggatg ccgacggcat tcgcatcgca 600

acggttggtt ttaccgatgt ccactcagac ggcatgtcgg ccggtaaaaa caatccgggt 660

attctgaagg cagatccgga cctgattttc tcgaccatcc agcaagcaaa agctaatgcg 720

gatctggtgg ttgtcaacgc ccattggggc gaagaatatg acgcacagcc gagtccgcgc 780

caagaaggtc tggccaaagc aatggtcgat gctggcgcgg acattatcat tggtcatcac 840

[0021]

ccgcacgtgc tgcagagcta tgatgtgtac aaaggtagcg ttatctttta ttctctgggc 900

aacttcatct tcgatcaggg ttggagctct acgaagaata ccgccatggt gcaataccat 960

ctgaacaaac agggccaagc taagattgat gttatcccga tggtcattaa agcgggtacc 1020

ccgacgccga ccgataatcc gtggcgtatg aaacgcatct ataacgacct gaataagttt 1080

agttccaacc cggaactgct ggaaaaagaa cgtaacaagt tcgaactgaa tctggatcat 1140

tcccgtatca ttaaacacgc ggaagaacgc aaaaagaacg aagcccaggc aaattaa 1197

<210> 34
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> capA_opti基因所编码的CapA蛋白

<400> 34

Met Lys Glu Lys Lys Leu Asn Phe Gln Glu Lys Val Leu Met Phe Ile
1 5 10 15

Lys Lys Thr Lys Pro Thr Thr Gly Lys Gln Ala Leu Ile Leu Thr Pro
20 25 30

Ile Leu Ile Val Ile Leu Ala Leu Ser Gly Trp Met Glu Arg Ser Asp
35 40 45

Ala Leu Glu Asn Pro Glu Thr Ala Asn Pro Glu Ala Asn Asn Asp Leu
50 55 60

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

Val Thr Glu Arg Tyr Gly Glu Asp Phe Val Phe Arg Asn Val Glu Pro
85 90 95

Phe Phe Lys Asn Ser Asp Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Glu Thr Pro Ile
100 105 110

Leu Thr Asn Asp Val Asp Ser Tyr Lys Ala Met Glu Lys Gly Ile His
115 120 125

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

Asp Val Leu Asn Leu Ala Asn Asn His Ser Met Asp Tyr Ser Ala Lys
145 150 155 160

Gly Leu Glu Asp Thr Ile Ser Thr Phe Glu Ala Asn Lys Leu Asp Phe
165 170 175

Val Gly Ala Gly Arg Asn Ser Glu Glu Ala Lys His Ile Ser Tyr Lys
180 185 190

Asp Ala Asp Gly Ile Arg Ile Ala Thr Val Gly Phe Thr Asp Val His
195 200 205

Ser Asp Gly Met Ser Ala Gly Lys Asn Asn Pro Gly Ile Leu Lys Ala
210 215 220

Asp Pro Asp Leu Ile Phe Ser Thr Ile Gln Gln Ala Lys Ala Asn Ala
225 230 235 240

Asp Leu Val Val Val Asn Ala His Trp Gly Glu Glu Tyr Asp Ala Gln
245 250 255

[0022]

Pro Ser Pro Arg Gln Glu Gly Leu Ala Lys Ala Met Val Asp Ala Gly
260 265 270

Ala Asp Ile Ile Ile Gly His His Pro His Val Leu Gln Ser Tyr Asp
275 280 285

Val Tyr Lys Gly Ser Val Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Ile Phe
290 295 300

Asp Gln Gly Trp Ser Ser Thr Lys Asn Thr Ala Met Val Gln Tyr His
305 310 315 320

Leu Asn Lys Gln Gly Gln Ala Lys Ile Asp Val Ile Pro Met Val Ile
325 330 335

Lys Ala Gly Thr Pro Thr Pro Thr Asp Asn Pro Trp Arg Met Lys Arg
340 345 350

Ile Tyr Asn Asp Leu Asn Lys Phe Ser Ser Asn Pro Glu Leu Leu Glu
355 360 365

[0023]

Lys Glu Arg Asn Lys Phe Glu Leu Asn Leu Asp His Ser Arg Ile Ile
370 375 380

Lys His Ala Glu Glu Arg Lys Lys Asn Glu Ala Gln Ala Asn
385 390 395

<210> 35
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 35
taagaaggag atatacatat gaaagaaaag aaactgaact tccaag 46

<210> 36
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 36
cgggtaaccc gattgagatc tatttgcctg ggcttcgttc tttttg 46

<210> 37
<211> 1170
<212> DNA
<213> 短短芽孢杆菌

<400> 37
atgaacgaga acagatcaag ccggatacat gctcggcgca aacgctcacg cagaaaatgg 60

gcacgtgtgg gaaagagcac gctcctcttt agcctgttgg ccatcttcgt cgtcggaacc 120

tactacttat ttcaaactgc catggatgga gaacatgcca acccgaacac ccagcctgct 180

cctgatgata ccgcgaacca aaagtcttcc gtgcagctca cctttgtcgg tgacatcatg 240

atgtcaggaa acgttgagaa aaccttactt gcaaacagct atgactaccc atacaaacat 300

gtaagctcgc tctttttgca agatgatatc accattgcca atttggagac gccgatcacc 360

gacacaggtg ttgctgctca aaacaaggag tatgtttaca agtcatcgcc acttgctgtt 420

cctgccatga aaaacgctgg gattgatgtg gtgaatctgg ccaataacca ctccatggac 480

caaggcgttc cgggattgct ggataccttt gaagctttgg acgaaaaccg tatagaatac 540

[0024]

gtcggtgccg gtaaggatgc aagccgtgcc tattcacctg ttttcctaga aaagaacggc 600

atcaagatcg cgattctcgg cttcagcagg gtcattcccg aaacgagctg gtttgcaggg 660

aattcccagc caggtatggc cgcttcctat gatcctacac tggcagtgaa agcgatccag 720

gatgcgaaca gccaagcgga tctcgtggtg gtgattgcac actggggcaa agaacgctcc 780

gattatcctg tcgatcatca aaaggagctg tctcgtgcct acatcgatgc tggtgcagat 840

ttgattgtcg gcggtcatcc ccacgtactg caaggctttg aacgttacaa cgacaaatgg 900

attgcgtaca gtcttggcaa tttcattttc acacgtgcaa acgaacccaa gacttgggaa 960

acgatggtcc tacaagcaaa ctgctccaaa agtggtgatt gtgagctaac gatgcttcca 1020

tttcatgcag aattaggaca agctgtaccc atgaatgaaa gcaacggcgc tgccctgtta 1080

aaacgcattg aatccatttc tgagcaagtc gacatacaaa gtgacggacg tgtgcagcca 1140

catgcaaagg cggtggagac tgccccctga 1170

<210> 38
<211> 389
<212> PRT
<213> 短短芽孢杆菌

<400> 38

Met Asn Glu Asn Arg Ser Ser Arg Ile His Ala Arg Arg Lys Arg Ser
1 5 10 15

Arg Arg Lys Trp Ala Arg Val Gly Lys Ser Thr Leu Leu Phe Ser Leu
20 25 30

Leu Ala Ile Phe Val Val Gly Thr Tyr Tyr Leu Phe Gln Thr Ala Met
35 40 45

Asp Gly Glu His Ala Asn Pro Asn Thr Gln Pro Ala Pro Asp Asp Thr
50 55 60

Ala Asn Gln Lys Ser Ser Val Gln Leu Thr Phe Val Gly Asp Ile Met
65 70 75 80

Met Ser Gly Asn Val Glu Lys Thr Leu Leu Ala Asn Ser Tyr Asp Tyr
85 90 95

Pro Tyr Lys His Val Ser Ser Leu Phe Leu Gln Asp Asp Ile Thr Ile
100 105 110

Ala Asn Leu Glu Thr Pro Ile Thr Asp Thr Gly Val Ala Ala Gln Asn
115 120 125

Lys Glu Tyr Val Tyr Lys Ser Ser Pro Leu Ala Val Pro Ala Met Lys
130 135 140

Asn Ala Gly Ile Asp Val Val Asn Leu Ala Asn Asn His Ser Met Asp
145 150 155 160

Gln Gly Val Pro Gly Leu Leu Asp Thr Phe Glu Ala Leu Asp Glu Asn
165 170 175

Arg Ile Glu Tyr Val Gly Ala Gly Lys Asp Ala Ser Arg Ala Tyr Ser
180 185 190

Pro Val Phe Leu Glu Lys Asn Gly Ile Lys Ile Ala Ile Leu Gly Phe
195 200 205

Ser Arg Val Ile Pro Glu Thr Ser Trp Phe Ala Gly Asn Ser Gln Pro
210 215 220

[0025]

Gly Met Ala Ala Ser Tyr Asp Pro Thr Leu Ala Val Lys Ala Ile Gln
225 230 235 240

Asp Ala Asn Ser Gln Ala Asp Leu Val Val Val Ile Ala His Trp Gly
245 250 255

Lys Glu Arg Ser Asp Tyr Pro Val Asp His Gln Lys Glu Leu Ser Arg
260 265 270

Ala Tyr Ile Asp Ala Gly Ala Asp Leu Ile Val Gly Gly His Pro His
275 280 285

Val Leu Gln Gly Phe Glu Arg Tyr Asn Asp Lys Trp Ile Ala Tyr Ser
290 295 300

Leu Gly Asn Phe Ile Phe Thr Arg Ala Asn Glu Pro Lys Thr Trp Glu
305 310 315 320

Thr Met Val Leu Gln Ala Asn Cys Ser Lys Ser Gly Asp Cys Glu Leu
325 330 335

[0026]

Thr Met Leu Pro Phe His Ala Glu Leu Gly Gln Ala Val Pro Met Asn
340 345 350

Glu Ser Asn Gly Ala Ala Leu Leu Lys Arg Ile Glu Ser Ile Ser Glu
355 360 365

Gln Val Asp Ile Gln Ser Asp Gly Arg Val Gln Pro His Ala Lys Ala
370 375 380

Val Glu Thr Ala Pro
385

<210> 39
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 39
gaaggagata tacatatgaa cgagaacaga tcaag 35

<210> 40
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 40
gtaacccgag gatctggggg cagtctccac cgc 33

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 41
agatctcaat cgggttaccc gataccgac 29

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

[0027]

<220>
<223> 反向引物

<400> 42
catatgtata tctccttctt atacttaac 29

<210> 43
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 43
agatcctcgg gttacccgat accga 25

<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 44
atgtatatct ccttcttata cttaact 27

<210> 45
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 45
aaggaggaag gatcaatgaa aaaagaactg agctttcatg 40

<210> 46
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 46
cccggggacg tcgacttact ggccgttcgt gacaccatgg 40

<210> 47
<211> 30

[0028]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 47
gtcgacgtcc ccggggcagc ccgcctaatg 30

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 48
tgatccttcc tcctttaatt gggaattgtt 30

<210> 49
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 49
agggggaaat gacaaatgaa agaaaagaaa ctgaacttcc 40

<210> 50
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 50
actagtttgg accatttact ggccgttcgt gacaccatgg 40

<210> 51
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 51
atggtccaaa ctagtactaa taaaattaat 30

[0029]

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 52
ttgtcatttc ccccttttgat ttaagtgaac 30

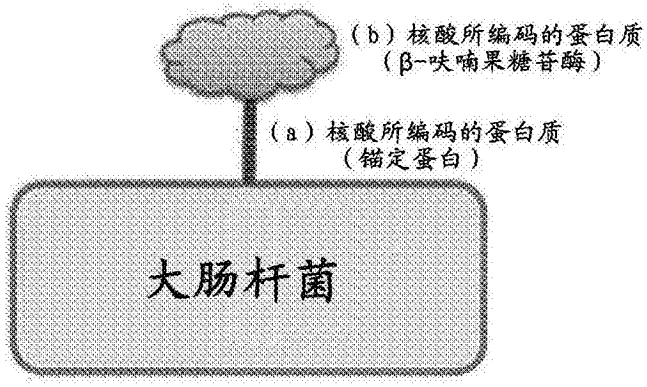
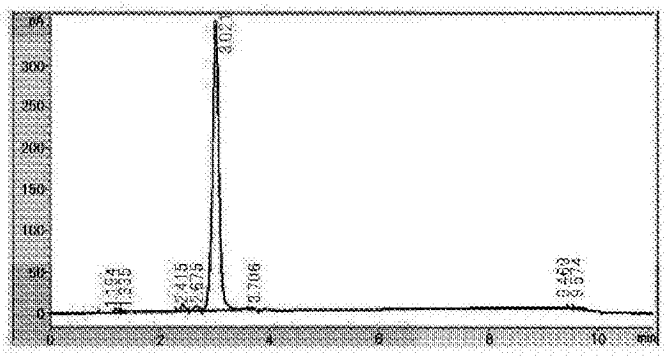


图1

利用pHT43-pgsA-indica重组载体转化的重组枯草芽孢杆菌



利用pHT43质粒转化的重组枯草芽孢杆菌

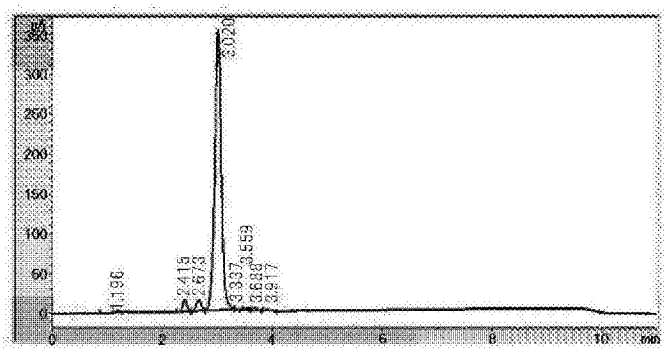
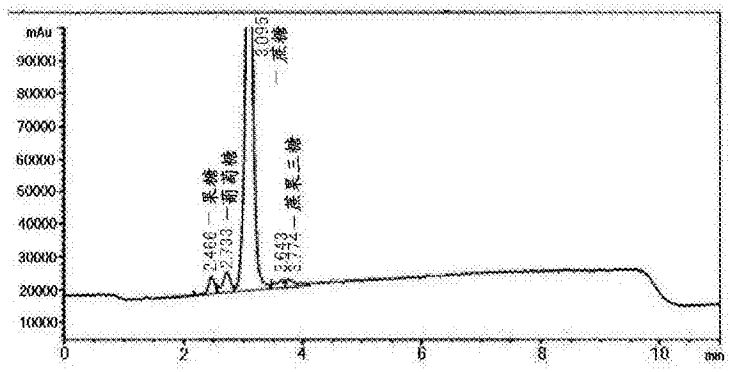


图2

利用pWH1520-capA_opti-indica
重组载体转化的重组巨大芽孢杆菌



利用pWH1520质粒转化的
重组巨大芽孢杆菌

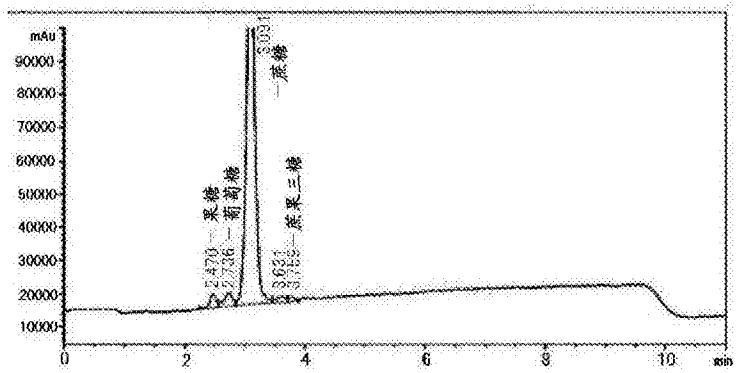


图3

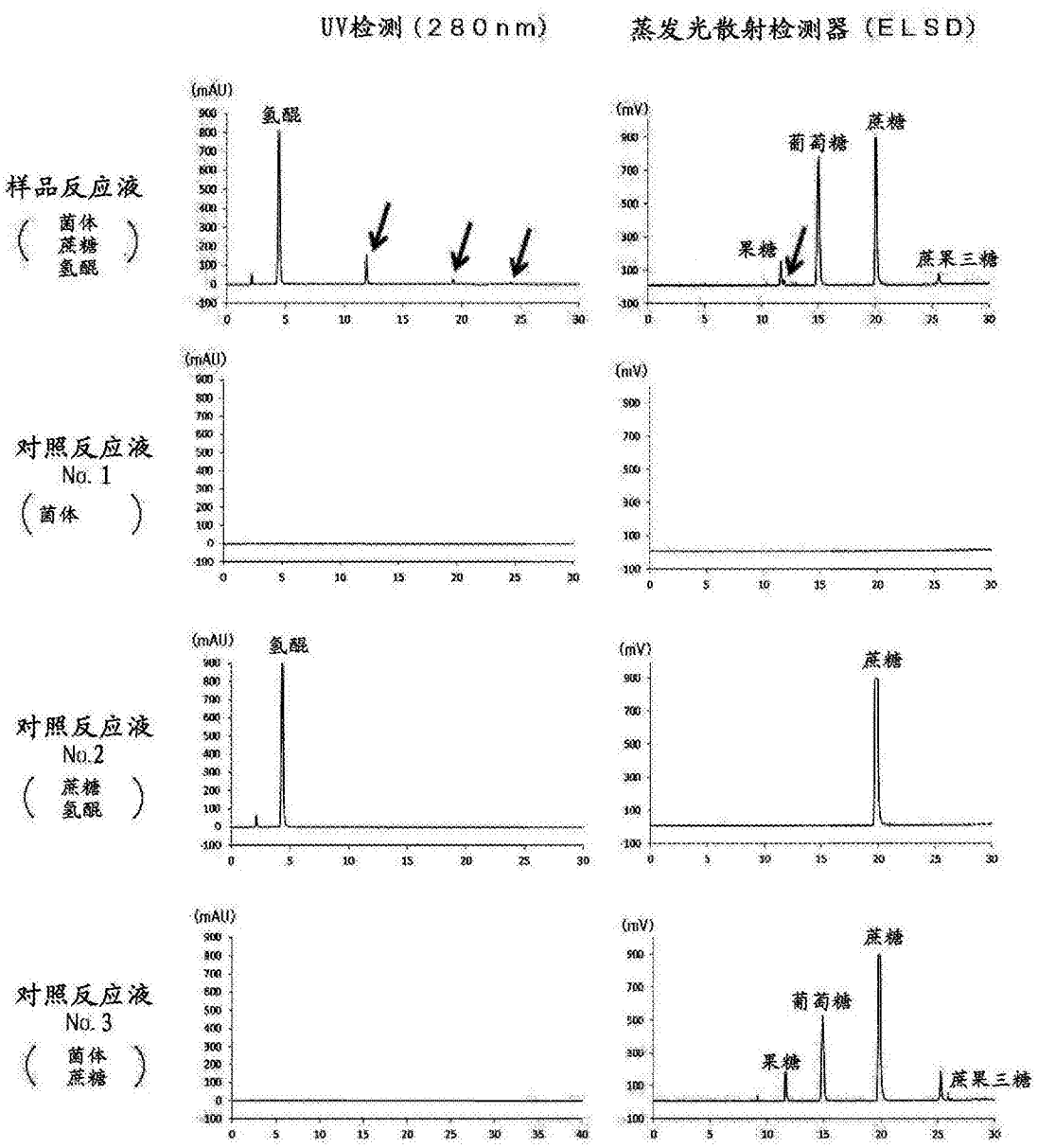

UV检测（280nm）
蒸发光散射检测器（ELSD）
样品反应液
（菌体 蔗糖 氢醌）
对照反应液 No. 1
（菌体）
对照反应液 No.2
（蔗糖 氢醌）
对照反应液 No. 3
（菌体 蔗糖）
(mAU)
(mV)
氢醌
葡萄糖
蔗糖
果糖
蔗果三糖

图4