



(21) 申请号 201980070365.2

(22) 申请日 2019.10.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112912504 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(30) 优先权数据
2018-204917 2018.10.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/042168 2019.10.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/090734 JA 2020.05.07

(73) 专利权人 天野酶制品株式会社
地址 日本国爱知县名古屋市中区锦1丁目2
番7号

(72) 发明人 大野笃 松原宽敬 片濑彻

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理
有限公司 11444
专利代理师 孙明 王刚

(51) Int.Cl.

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

(56) 对比文件

Zheng F 等.Cellulosimicrobium sp. TH-20 chromosome, complete genome.《GenBank Database》.2017,Accession:CP020857.1.

温艳秋.Cellulosimicrobium sp. TH-20糖苷水解酶的异源表达及催化特性研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊) 基础科学》.2021,(第2期),A006-436.

Lambré C 等.Safety evaluation of the food enzyme α -amylase from Cellulosimicrobium funkei strain AE-AMT.《EFSA J》.2022,第20卷(第8期),第1-12页.

审查员 和平鸽

权利要求书1页 说明书15页

序列表10页 附图1页

(54) 发明名称

麦芽三糖生成淀粉酶

(57) 摘要

本发明提供一种产生麦芽三糖的新的酶。一种麦芽三糖生成淀粉酶,其包含下述的任一种表示的多肽:序列号1~3表示的氨基酸序列构成的多肽;在序列号1~3表示的氨基酸序列各自中,1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失,且具有麦芽三糖生成能力的多肽;相对于序列号1~3表示的氨基酸序列各自的序列一致性为70%以上,且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

1. 下述(1-1)、(2-1)以及(3-1)中的任一者表示的多肽用作麦芽三糖生成淀粉酶的用途:

- (1-1) 由序列号1表示的氨基酸序列构成的多肽,
- (2-1) 由序列号2表示的氨基酸序列构成的多肽,
- (3-1) 由序列号3表示的氨基酸序列构成的多肽。

2. 一种麦芽三糖的制造方法,其特征在于,包含以下工序:

使用下述(1-1)、(2-1)以及(3-1)中的任一者表示的多肽作为麦芽三糖生成淀粉酶,由淀粉类物质生成麦芽三糖:

- (1-1) 由序列号1表示的氨基酸序列构成的多肽,
- (2-1) 由序列号2表示的氨基酸序列构成的多肽,
- (3-1) 由序列号3表示的氨基酸序列构成的多肽。

麦芽三糖生成淀粉酶

技术领域

[0001] 本发明涉及一种麦芽三糖生成淀粉酶。

背景技术

[0002] 麦芽三糖为通过利用酶或酸将淀粉质部分分解而得到的、葡萄糖3分子介由 α -1,4-葡萄糖苷键而键合的糖。麦芽三糖的甜味的强度为砂糖的17%左右,但有圆润的甜味,因此,作为食品的低甜味剂被使用。另外,麦芽三糖由于吸湿性和保水性优异,因此,作为食品的防干燥剂、砂糖的防结晶析出剂、淀粉的防老化剂是有用的。此外,麦芽三糖与葡萄糖和麦芽糖相比,热稳定性优异,因此,作为食品加工中所使用的糖质材料也是有用的。

[0003] 麦芽三糖可从麦芽糖制造时的副产物获得。但是,从工业上稳定供给的观点出发,优选将淀粉质酶化学地进行分解而制造。作为由淀粉质生成麦芽三糖的酶,已知源自灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 的N-A468酶(非专利文献1)以及源自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的淀粉酶G3(非专利文献2)。N-A468酶与 β 淀粉酶同样进行分类,利用麦芽三糖单元分解淀粉质,淀粉酶G3与 α 淀粉酶同样进行分类,产生含有麦芽三糖作为主要成分的淀粉分解物。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:淀粉科学,第23卷,第3号,175~181页(1979年)

[0007] 非专利文献2:Agricultural and Biological Chemistry 1985 Volume 49 Issue 4 Pages 1091-1097

发明内容

[0008] 发明所要解决的问题

[0009] 但是,这些酶从来自微生物的生产效率低,工业上稳定供给的观点出发,依然存在课题。因此,期望获得产生麦芽三糖的新的酶。

[0010] 本发明的目的在于,提供一种产生麦芽三糖的新的酶。

[0011] 用于解决问题的技术方案

[0012] 本发明人进行深入研究,结果发现:源自纤维微菌属 (*Cellulosimicrobium*) 细菌的麦芽三糖产生性淀粉酶(以下,记为“麦芽三糖生成淀粉酶”)。本发明是基于这些见解而完成的。即,本发明提供下述揭示的方式的发明。

[0013] 项1.一种麦芽三糖生成淀粉酶,其包含下述(1-1)~(1-3)、(2-1)~(2-3)以及(3-1)~(3-3)中的任一者表示的多肽:

[0014] (1-1)包含序列号1表示的氨基酸序列的多肽,

[0015] (1-2)在序列号1表示的氨基酸序列中,1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失,且具有麦芽三糖生成能力的多肽,

[0016] (1-3)相对于序列号1表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上,且具有麦芽三

糖生成能力的多肽，

[0017] (2-1) 包含序列号2表示的氨基酸序列的多肽，

[0018] (2-2) 在序列号2表示的氨基酸序列中，1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失，且具有麦芽三糖生成能力的多肽，

[0019] (2-3) 相对于序列号2表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上，且具有麦芽三糖生成能力的多肽，

[0020] (3-1) 包含序列号3表示的氨基酸序列的多肽，

[0021] (3-2) 在序列号3表示的氨基酸序列中，1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失，且具有麦芽三糖生成能力的多肽、

[0022] (3-3) 相对于序列号3表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上，且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0023] 项2. 一种DNA，其编码项1记载的麦芽三糖生成淀粉酶。

[0024] 项3. 一种重组载体，其包含项2记载的DNA。

[0025] 项4. 一种转化体，其是使用项2记载的DNA或项3记载的重组载体对宿主进行转化而得到的。

[0026] 项5. 制造项1记载的麦芽三糖生成淀粉酶的制造方法，其包含培养项4记载的转化体的工序。

[0027] 项6. 一种酶制剂，其包含项1记载的麦芽三糖生成淀粉酶。

[0028] 项7. 一种麦芽三糖的制造方法，其包含使用项1记载的麦芽三糖生成淀粉酶由淀粉质生成麦芽三糖的工序。

[0029] 根据本发明，可提供一种产生麦芽三糖的新的酶。

附图说明

[0030] 图1表示在试验例1中得到的、由纤维微菌属 (Cellulosimicrobium) 细菌获得的具有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶的利用SDS-PAGE的精制结果。

具体实施方式

[0031] 以下，对本发明详细进行说明。应予说明，在序列表以外，氨基酸序列中的20种氨基酸残基有时用单字符缩写来表述。即，甘氨酸 (Gly) 为G，丙氨酸 (Ala) 为A，缬氨酸 (Val) 为V，亮氨酸 (Leu) 为L，异亮氨酸 (Ile) 为I，苯丙氨酸 (Phe) 为F，酪氨酸 (Tyr) 为Y，色氨酸 (Trp) 为W，丝氨酸 (Ser) 为S，苏氨酸 (Thr) 为T，半胱氨酸 (Cys) 为C，蛋氨酸 (Met) 为M，天门冬氨酸 (Asp) 为D，谷氨酸 (Glu) 为E，天门冬酰胺 (Asn) 为N，谷氨酰胺 (Gln) 为Q，赖氨酸 (Lys) 为K，精氨酸 (Arg) 为R，组氨酸 (His) 为H，脯氨酸 (Pro) 为P。

[0032] 另外，本说明书中，表示的氨基酸序列的左端为N末端，右端为C末端。

[0033] 在本说明书中，“非极性氨基酸”包含丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。“非电荷氨基酸”包含甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺。“酸性氨基酸”包含天门冬氨酸和谷氨酸。“碱性氨基酸”包含赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

[0034] 1. 麦芽三糖生成淀粉酶

[0035] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶源自纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*) 细菌。

[0036] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的第1实施方式为下述(1-1) ~ (1-3) 中任一者表示的多肽。

[0037] (1-1) 包含序列号1表示的氨基酸序列的多肽。

[0038] (1-2) 在序列号1表示的氨基酸序列中,1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失,且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0039] (1-3) 相对于序列号1表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上,且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0040] 上述(1-1) ~ (1-3) 表示的多肽具有将淀粉质的 α -1,4-键切断的 α -淀粉酶活性,且生成麦芽三糖的活性。

[0041] 导入至上述(1-2)的多肽的氨基酸的改变可以仅含有替换、附加、插入和缺失中的1种改变(例如,替换),也可以包含2种以上的改变(例如,替换和插入)。在上述(1-2)的多肽中,被替换、附加、插入或缺失的氨基酸可以为1个或多个、或者、数个,例如可举出1~10个,优选为1~8个、1~6个、1~5个或1~4个,进一步优选为1~3个,特别优选为1或2个、或者、1个。

[0042] 另外,在上述(1-3)的多肽中,相对于序列号1表示的氨基酸序列的序列一致性可以为70%以上,可举出优选为80%以上、85%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上。

[0043] 在此,在上述(1-3)的多肽中,相对于序列号1表示的氨基酸序列的序列一致性为与序列号1表示的氨基酸序列进行比较而算出的序列一致性。另外,“序列一致性”表示通过BLAST PACKAGE[sgi32 bit edition,Version 2.0.12;available from National Center for Biotechnology Information(NCBI)]的bl2seq program(Tatiana A.Tatusova, Thomas L.Madden,FEMS Microbiol.Lett.,Vol.174,p247-250,1999)得到的氨基酸序列的一致性的值。参数只要设定为Gap insertion Cost value:11、Gap extension Cost value:1即可。

[0044] 在上述(1-2)和(1-3)的多肽中,认为序列号1表示的氨基酸序列中的第196位、第223位、第284位、第107位、第166位、第118位、第119位、第122位、第123位、第158位、第161位、第214位、第215位、第216位、第217位、第247位、第250位、第252位、第253位、第278位、第283位、第336位、第342位的氨基酸有助于活性,因此,优选在这些部位中不导入替换或缺失。第107位、第166位的氨基酸被推定为Ca键合部位,第196位、第223位、第284位的氨基酸被推定为活性中心,因此,特别优选在这些部位中不导入替换或缺失。

[0045] 在上述(1-2)和(1-3)的多肽中导入氨基酸替换的情况下,作为氨基酸替换的方式,可举出保守的替换。即,在(1-2)及(1-3)的多肽中,作为相对于序列号1表示的氨基酸序列导入的氨基酸替换,例如可举出,如果替换前的氨基酸为非极性氨基酸,则替换为其它非极性氨基酸;如果替换前的氨基酸为非荷电性氨基酸,则替换为其它非荷电性氨基酸;如果替换前的氨基酸为酸性氨基酸,则替换为其它酸性氨基酸;以及如果替换前的氨基酸为碱性氨基酸,则替换为其它碱性氨基酸。

[0046] 在上述(1-2)和(1-3)的多肽中,“具有麦芽三糖生成能力”是指:具有能够发挥作为麦芽三糖生成淀粉酶的功能的程度的活性。具体而言,是指后述“<麦芽三糖生成淀粉酶

的活性测定法>”中可确认麦芽三糖的峰检测。优选是指：对淀粉质而确认到的麦芽三糖生成能力与基于上述(1-1)的多肽的麦芽三糖生成能力相同或比其高(例如，作为通过该“<麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>”检测的麦芽三糖的峰强度比，为上述(1-1)的多肽时的70%以上)。

[0047] 包含第1实施方式的(1-1)的多肽的麦芽三糖生成淀粉酶的分子量为约55kDa。

[0048] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的第2实施方式为下述(2-1)~(2-3)中的任一者表示的多肽。

[0049] (2-1)包含序列号2表示的氨基酸序列的多肽。

[0050] (2-2)在序列号2表示的氨基酸序列中，1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失，且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0051] (2-3)相对于序列号2表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上，且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0052] 上述(2-1)的多肽包含上述第1实施方式的(1-1)的多肽，进而，其C末端侧具有碳水化合物结合组件(CBM区域)。序列号2表示的氨基酸序列的第1位~第533位相当于上述(1-1)的多肽。另外，认为序列号2表示的氨基酸序列的第582位~第674位相当于CBM区域。认为CBM区域使麦芽三糖生成淀粉酶局部存在于底物(淀粉质)的表面而使水解高效化。CBM区域可以直接或间接键合于上述第1实施方式的(1-1)~(1-3)中的任一者表示的多肽的C末端侧。应予说明，间接键合是指：例如，介由包含1~250个，优选10~220个氨基酸的接头序列等其它氨基酸序列而进行键合。

[0053] 导入至上述(2-2)的多肽的氨基酸的改变可以仅含有替换、附加、插入和缺失中的1种改变(例如替换)，也可以包含2种以上的改变(例如，替换和插入)。在相当于上述(2-2)的CBM区域的区域中，被替换、附加、插入或缺失的氨基酸可以1个或多个、或者、数个，例如可举出1~10个，优选为1~8个、1~6个、1~5个或1~4个，进一步优选为1~3个，特别优选为1或2个、或者、1个。

[0054] 另外，在上述(2-3)的多肽中，相对于序列号2表示的氨基酸序列的序列一致性可以为70%以上，可举出优选为80%以上、85%以上、90%以上，进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上，特别优选为99%以上。

[0055] 在此，在上述(2-3)的多肽中，相对于序列号2表示的氨基酸序列的序列一致性为与序列号2表示的氨基酸序列进行比较而算出的序列一致性，“序列一致性”与上述第1实施方式中的(1-3)中的序列一致性相同。

[0056] 在上述(2-2)和(2-3)的多肽中，优选不导入替换或缺失的序列号2中的氨基酸的位置，作为在上述第1实施方式的(1-2)和(1-3)的多肽中的优选不导入替换或缺失的序列号1中的氨基酸的位置，如上述所示，具体而言，认为序列号2表示的氨基酸序列中的第196位、第223位、第284位、第107位、第166位、第118位、第119位、第122位、第123位、第158位、第161位、第214位、第215位、第216位、第217位、第247位、第250位、第252位、第253位、第278位、第283位、第336位、第342位的氨基酸有助于活性，因此，优选在这些部位中不导入替换或缺失。第107位、第166位的氨基酸推定为Ca键合部位，第196位、第223位、第284位的氨基酸推定为活性中心，因此，特别优选在这些部位中不导入替换或缺失。另外，关于CBM区域，认为第608位、第639位、第651位、第652位、第656位的氨基酸有助于与淀粉的键合，因此，想

要使麦芽三糖生成淀粉酶局部存在于底物(淀粉质)的表面的情况下,优选在这些部位中不导入替换或缺失。

[0057] 在上述(2-2)和(2-3)的多肽中导入氨基酸替换的情况下,作为氨基酸替换的方式,可举出保守的替换。关于保守的替换,与作为在上述第1实施方式中的(1-2)和(1-3)的多肽中导入氨基酸替换时的氨基酸替换的方式的保守的替换相同。

[0058] 在上述(2-2)及(2-3)的多肽中,“具有麦芽三糖生成能力”是指:具有能够发挥作为麦芽三糖生成淀粉酶的功能的程度的活性。具体而言,是指能够利用后述“<麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>”确认麦芽三糖的峰检测。优选是指对于淀粉质所确认到的麦芽三糖生成能力与基于上述(2-1)的多肽的麦芽三糖生成能力相同或比其高(例如,作为通过该“<麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>”检测的麦芽三糖的峰强度比,为上述(2-1)的多肽时的70%以上)。

[0059] 包含第2实施方式的(2-1)的多肽的麦芽三糖生成淀粉酶的分子量为约70kDa。

[0060] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的第3实施方式为下述(3-1)~(3-3)中的任一者表示的多肽。

[0061] (3-1)包含序列号3表示的氨基酸序列的多肽。

[0062] (3-2)在序列号3表示的氨基酸序列中,1个或多个氨基酸被替换、附加、插入或缺失,且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0063] (3-3)相对于序列号3表示的氨基酸序列的序列一致性为70%以上,且具有麦芽三糖生成能力的多肽。

[0064] 上述(3-1)的多肽也包含上述第1实施方式的(1-1)的多肽。更具体而言,上述(3-1)的多肽包含上述第2实施方式的(2-1)的多肽,进而,在其N末端具有前序列。序列号3的第54位~第586位相当于上述第1实施方式的(1-1)的多肽,第54位~第728位相当于上述第2实施方式的(2-1)的多肽。

[0065] 导入至上述(3-2)的多肽的氨基酸的改变可以仅含有替换、附加、插入和缺失中的1种改变(例如替换),也可以包含2种以上的改变(例如,替换和插入)。在上述(3-2)的多肽中,被替换、附加、插入或缺失的氨基酸可以为1个或多个、或者、数个,例如可举出1~10个,优选为1~8个、1~6个、1~5个或1~4个,进一步优选为1~3个,特别优选为1或2个、或者、1个。

[0066] 另外,在上述(3-3)的多肽中,相对于序列号3表示的氨基酸序列的序列一致性可以为70%以上,可举出优选为80%以上、85%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上。

[0067] 在此,在上述(3-3)的多肽中,相对于序列号3表示的氨基酸序列的序列一致性为与序列号3表示的氨基酸序列进行比较而算出的序列一致性,“序列一致性”与上述第1实施方式的(1-3)中的序列一致性相同。

[0068] 在上述(3-2)和(3-3)的多肽中导入氨基酸替换的情况下,作为氨基酸替换的方式,可举出保守的替换。关于保守的替换,与作为在上述第1实施方式中的(1-2)和(1-3)的多肽中导入氨基酸替换时的氨基酸替换的方式的保守的替换同样。

[0069] 在上述(3-2)和(3-3)的多肽中,优选不导入替换或缺失的序列号3中的氨基酸的位置,作为在上述第1实施方式的(1-2)和(1-3)多肽中的优选不导入替换或缺失的序列号1

中的氨基酸的位置,如上述所示。

[0070] 在上述(3-2)和(3-3)的多肽中,“具有麦芽三糖生成能力”是指具有能够发挥作为麦芽三糖生成淀粉酶的功能的程度的活性。具体而言,是指可利用后述“<麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>”确认麦芽三糖的峰检测。优选是指对于淀粉质所确认到的麦芽三糖生成能力与基于上述(3-1)的多肽的麦芽三糖生成能力相同或比其高(例如,作为通过该“<麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>”检测的麦芽三糖的峰强度比,为上述(3-1)的多肽时的70%以上)。

[0071] 包含第3实施方式的(3-1)的多肽的麦芽三糖生成淀粉酶的分子量为约77kDa。

[0072] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的酶活性可通过以下表示的方法进行测定。

[0073] <麦芽三糖生成淀粉酶的活性测定法>

[0074] 混合有底物液(1% (w/v)可溶性淀粉溶液)200 μ L和酶液50 μ L的反应液在50 $^{\circ}$ C下以1000rpm振荡48小时而反应后,在100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟而停止反应。利用精制水将反应停止后的反应液稀释30倍,利用0.45 μ m过滤器进行过滤而得到分析用样品。通过对分析用样品进行HPLC分析并检测麦芽三糖的峰而测定麦芽三糖生成淀粉酶活性。

[0075] 2. DNA

[0076] 本发明的DNA为编码上述麦芽三糖生成淀粉酶的DNA。本发明的DNA例如可通过将编码源自纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)细菌的上述(3-1)~(3-3)中的任一个多肽的DNA作为模板,通过PCR等获得编码至少上述(1-1)~(1-3)中的任一个多肽的区域而得到。另外,编码本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的DNA也可利用基因学合成法进行人工合成。

[0077] 另外,在碱基序列的特定的部位中导入特定突变的情况下,突变导入方法是公知的,例如可利用DNA的部位特异性突变导入法等。作为变换DNA中的碱基的具体方法,例如也可使用市售的试剂盒而进行。

[0078] 在碱基序列中导入突变得到的DNA可使用DNA测序仪确认碱基序列。一旦确定碱基序列,则其后可通过以进行化学合成、克隆得到的探针为模板的PCR,或者,以具有该碱基序列的DNA片段为探针的杂交得到编码上述麦芽三糖生成淀粉酶的DNA。

[0079] 另外,可通过部位特异性突变诱发法等合成编码上述麦芽三糖生成淀粉酶的DNA的突变型且具有与突变前相同的功能的DNA。应予说明,在编码上述麦芽三糖生成淀粉酶的DNA中导入突变时,可通过Kunkel法、Gapped duplex法、大引物PCR法(megaprimer PCR)法等公知的方法进行。

[0080] 关于编码本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的DNA的碱基序列,本领域技术人员可按照本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的氨基酸序列而适当设计。

[0081] 本发明的DNA的第1实施方式为编码上述(1-1)~(1-3)的多肽的DNA。例如,作为编码上述(1-1)的多肽的DNA,可举出包含序列号4表示的碱基序列的DNA。

[0082] 另外,本发明的DNA的第1实施方式包含:编码上述(1-1)~(1-3)的多肽且含有与包含序列号4表示的碱基序列的DNA互补的碱基序列的DNA、以及在严格的条件下进行杂交的DNA。

[0083] 此外,本发明的DNA的第1实施方式也包含:编码上述(1-1)~(1-3)的多肽且相对于包含序列号4表示的碱基序列的DNA具有70%以上的相同性的DNA。作为上述同源性,可举出优选为80%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为

99%以上。

[0084] 本发明的DNA的第2实施方式为编码上述(2-1)~(2-3)中的任一个多肽的DNA。例如,作为编码上述(2-1)的多肽的DNA,可举出包含序列号5表示的碱基序列的DNA。

[0085] 另外,本发明的DNA的第2实施方式包含:编码上述(2-1)~(2-3)的多肽且含有与包含序列号5表示的碱基序列的DNA互补的碱基序列的DNA,以及在严格的条件下进行杂交的DNA。

[0086] 此外,本发明的DNA的第2实施方式也包含:编码上述(2-1)~(2-3)的多肽且相对于包含序列号5表示的碱基序列的DNA具有70%以上的同源性的DNA。作为上述同源性,可举出优选为80%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上。

[0087] 本发明的DNA的第3实施方式为编码上述(3-1)~(3-3)中的任一个多肽的DNA。例如,作为编码上述(3-1)的多肽的DNA,可举出包含序列号6表示的碱基序列的DNA。

[0088] 另外,本发明的DNA的第3实施方式包含:编码上述(3-1)~(3-3)的多肽且含有与包含序列号6表示的碱基序列的DNA互补的碱基序列的DNA、以及在严格的条件下进行杂交的DNA。

[0089] 此外,本发明的DNA的第3实施方式也包含:编码上述(3-1)~(3-3)的多肽且相对于包含序列号6表示的碱基序列的DNA具有70%以上的同源性的DNA。作为上述同源性,可举出优选为80%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上。

[0090] 在此,“严格的条件下”是指:在包含0.5%SDS、5×Denhartz's[Denhartz's、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1%Ficoll400]以及100μg/ml鲑鱼精子DNA的6×SSC(1×SSC包含0.15MNaCl、0.015M柠檬酸钠、pH7.0)中,在50℃~65℃保温4小时~过夜的条件。

[0091] 在严格的条件下的杂交,具体通过以下方法进行。即,制作将DNA文库或cDNA文库固定化的尼龙膜,在包含6×SSC、0.5%SDS、5×Denhartz's、100μg/ml鲑鱼精子DNA的预杂交溶液中,在65℃封闭尼龙膜。其后,提交利用³²P进行标记的各探针,在65℃保温过夜。将该尼龙膜在6×SSC中,在室温10分钟,在包含0.1%SDS的2×SSC中,在室温清洗10分钟,在包含0.1%SDS的0.2×SSC中,在45℃清洗30分钟后,采用自动放射照相术,可检测与探针特异性杂交的DNA。

[0092] 另外,DNA的“同源性”表示通过BLAST PACKAGE[sgi32 bitedition,Version 2.0.12;available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)]的bl2seq program(Tatiana A.Tatusova,Thomas L.Madden,FEMS Microbiol.Lett.,Vol.174,247-250,1999)而得到的一致性的值。参数可以设定Gap insertion Cost value:11、Gap extension Cost value:1。

[0093] 本发明的DNA优选为使密码子利用频率在宿主中最适化的DNA。例如,如果是使用大肠杆菌作为宿主的情况,则优选为使密码子利用频率在大肠杆菌中最适化的DNA。

[0094] 3. 重组载体

[0095] 本发明的重组载体包含编码本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的DNA。本发明的重组载体可通过在表达载体中插入本发明的DNA而得到。

[0096] 本发明的重组载体包含可操作地连结于本发明的DNA的启动子等控制因子。作为控制因子,代表性地可举出启动子,但进一步根据需要可以包含增强子、CCAAT盒、TATA盒、SPI部位等转录元件。另外,可操作地连结是指调节本发明的DNA的启动子、增强子等各种控制因子和本发明的DNA在宿主细胞中以可操作的状态进行连结。

[0097] 作为表达载体,优选在宿主内可自律性增殖的噬菌体、质粒、或由病毒作为基因重组用途而构建的表达载体。上述表达载体是公知的,例如,作为商业上可获得的表达载体,可举出pQE系载体(株式会社QIAGEN)、pDR540、pRIT2T(GE卫生保健科学株式会社)、pET系载体(默克株式会社)等。表达载体可以选择使用与宿主细胞的适当的组合,例如,在以大肠杆菌为宿主细胞的情况下,优选举出pET系载体和BL21(DE3)大肠杆菌株的组合、或pDR540载体和JM109大肠杆菌株的组合等。

[0098] 4. 转化体

[0099] 本发明的转化体通过使用上述本发明的DNA或上述本发明的重组载体对宿主进行转化而得到。

[0100] 作为转化体的制造中使用的宿主,只要能够进行基因的导入且能够自律性增殖且表达本发明的基因的性状,就没有特别限制,作为优选的示例,例如可举出属于大肠杆菌(*Escherichia coli*)等埃希氏菌属、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等枯草杆菌属、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等假单胞菌属等细菌;放线菌等;酵母等;丝状菌等,此外,可以为动物细胞、昆虫细胞、植物等。其中,特别优选大肠杆菌。另外,作为宿主,也可以为本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的来源菌即纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)。

[0101] 本发明的转化体可通过在宿主中导入上述本发明的DNA或上述本发明的重组载体而得到。导入本发明的DNA或本发明的重组载体的方法,只要目标基因能够导入宿主,就没有特别限定。另外,导入DNA的位置,只要能够表达目标基因,就没有特别限定,可以为质粒上,也可以为基因组上。作为导入本发明的DNA或本发明的重组载体的具体方法,例如可举出重组载体法、基因组编集法。

[0102] 在宿主中导入本发明的DNA或本发明的重组载体的条件,可以根据导入方法和宿主的种类等适当设定。如果宿主为细菌的情况,则例如可举出使用基于钙离子处理的感受态细胞的方法以及电穿孔法等。如果宿主为酵母的情况,则例如可举出电穿孔法(电蚀孔法)、原生质球法和醋酸锂法等。如果宿主为动物细胞的情况,则例如可举出电穿孔法、磷酸钙法和脂质转染法等。如果宿主为昆虫细胞的情况,则例如可举出磷酸钙法、脂质转染法和电穿孔法等。如果宿主为植物的情况,则例如可举出电穿孔法、农杆菌转化法、粒子枪法和PEG法等。

[0103] 5. 麦芽三糖生成淀粉酶的制造方法

[0104] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶可通过培养上述本发明的转化体而制造。另外,本发明的麦芽三糖生成淀粉酶也可通过培养生产菌即纤维微菌属

(*Cellulosimicrobacterium* sp.) (未进行转化)而制造。在培养生产菌即纤维微菌属(*Cellulosimicrobacterium* sp.) (未进行转化)的情况下,本发明的麦芽三糖生成淀粉酶通过接受处理而在(1-1)~(1~3)中的任一个多肽(第1实施方式的多肽)、(2-1)~(2~3)中的任一个多肽(第2实施方式的多肽)以及(3-1)~(3~3)中的任一个多肽(第3实施方式的多肽)混合存在的状态下制造。另一方面,在使用上述本发明的转化体的情况下,通过导

入的DNA,可使宿主仅表达编码第1实施方式的多肽、第2实施方式的多肽、第3实施方式的多肽中的任一种多肽的基因,因此,单独制造包含第1实施方式的多肽、第2实施方式的多肽、第3实施方式的多肽中的任一种多肽的麦芽三糖生成淀粉酶的情形、以及在第1实施方式的多肽、第2实施方式的多肽和第3实施方式的多肽混合存在的状态下制造的情形中的任一者都是可能的。

[0105] 本发明的转化体的培养条件可以考虑宿主的营养生理学性质而适当设定,优选举出液体培养。另外,如果是进行工业制造的情况,则优选通气搅拌培养。

[0106] 培养本发明的转化体,通过离心分离等方法从培养液回收培养上清液或菌体。如果为本发明的麦芽三糖生成淀粉酶蓄积于菌体内的情况,则通过超声波、法压等机械方法或溶菌酶等溶菌酶对菌体实施处理,根据需要使用蛋白酶等酶、十二烷基硫酸钠(SDS)等表面活性剂而进行溶解,可得到含有本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的水溶性级分。

[0107] 另外,通过选择适当的表达载体和宿主,也可使表达的本发明的麦芽三糖生成淀粉酶分泌到培养液中。

[0108] 如上述所示得到的包含本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的培养液或水溶性级分可以直接供于精制处理,也可以在将该培养液或水溶性级分中的本发明的多肽浓缩之后供于精制处理。

[0109] 浓缩例如可通过减压浓缩、膜浓缩、盐析处理、基于亲水性有机溶剂(例如甲醇、乙醇和丙酮)的分别沉淀法等而进行。

[0110] 本发明的麦芽三糖生成淀粉酶的精制处理,例如可通过将凝胶过滤、疏水性色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等方法适当组合而进行。

[0111] 如此精制得到的本发明的麦芽三糖生成淀粉酶可以根据需要通过冷冻干燥、真空干燥、喷雾干燥等进行粉末化。

[0112] 6.酶制剂

[0113] 本发明的酶制剂包含上述本发明的麦芽三糖生成淀粉酶作为有效成分。作为酶制剂所包含的麦芽三糖生成淀粉酶,可以仅含有包含(1-1)~(1-3)中的任一个多肽的麦芽三糖生成淀粉酶,也可以仅含有包含(2-1)~(2-3)中的任一个多肽的麦芽三糖生成淀粉酶,还可以仅含有包含(3-1)~(3-3)中的任一种多肽的麦芽三糖生成淀粉酶。也可以含有多个上述麦芽三糖生成淀粉酶。所包含的麦芽三糖生成淀粉酶的种类和含有比率可根据底物适当选择。

[0114] 本发明的酶制剂除上述本发明的麦芽三糖生成淀粉酶以外,可含有选自赋形剂、缓冲剂、悬浮剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理食盐水中的添加剂。作为赋形剂,可举出淀粉、糊精、麦芽糖、海藻糖、乳糖、D-葡萄糖、山梨糖醇、D-甘露醇、白糖、甘油等。作为缓冲剂,可使用磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐等。作为稳定剂,可举出丙二醇、抗坏血酸等。作为保存剂,可举出氯化钠、苯酚、苯扎氯铵、苄醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯等。作为防腐剂,可举出氯化钠、乙醇、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0115] 作为本发明的酶制剂中的麦芽三糖生成淀粉酶的含量,在发挥麦芽三糖生成淀粉酶的效果的范围内可适当设定。

[0116] 本发明的酶剂可以含有其它酶。作为其它酶,例如可举出淀粉酶(α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶)、葡萄糖苷酶(α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶)、半乳糖苷酶(α -半乳糖

苷酶、 β -半乳糖苷酶)、蛋白酶(酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶)、肽酶(亮氨酸胺酶、氨基肽酶)、脂酶、酯酶、纤维素酶、磷酸酶(酸性磷酸酶、碱性磷酸酶)、核酸酶、脱氨基酶、氧化酶、脱氢酶、谷氨酰胺酶、果胶酶、过氧化氢酶、葡聚糖酶、转谷氨酰胺酶、蛋白质脱酰胺酶、普鲁兰酶等。

[0117] 作为本发明的酶制剂的形态,没有特别限定,例如可举出液体、粉末、颗粒等。本发明的酶制剂可以用一般公知的方法来制备。

[0118] 7. 麦芽三糖的制造方法

[0119] 在本发明的麦芽三糖的制造方法中,包含使用上述本发明的麦芽三糖生成淀粉酶、由淀粉质生成麦芽三糖的工序。

[0120] 作为淀粉质,可举出直链淀粉、支链淀粉、糖原和淀粉;以及通过淀粉酶或酸等将这些物质部分地进行水解而得到的淀粉糊精、麦芽糊精、麦芽低聚糖等淀粉部分分解物。作为利用淀粉酶分解得到的淀粉部分分解物,例如可举出使用 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、麦芽五糖生成淀粉酶、麦芽六糖生成淀粉酶(EC 3.2.1.98)等淀粉酶将直链淀粉、支链淀粉、糖原、淀粉等进行分解而得到的部分分解物。此外,制备部分分解物时,可以使普鲁兰酶(EC 3.2.1.41)、异淀粉酶(EC 3.2.1.68)等淀粉剪枝酶发生作用。

[0121] 作为淀粉,例如可举出源自玉米、小麦、米、土豆、红薯、木薯等淀粉。这些淀粉能够以糊化、液化而得到的液化淀粉溶液的方式使用。

[0122] 在使本发明的麦芽三糖生成淀粉酶作用于淀粉质时,淀粉质溶液的浓度没有特别限定,从工业的观点出发,可举出浓度10% (w/v) 以上。反应温度只要是反应进行的温度,就没有特别限制,具体而言,可举出约65℃以下,优选为45~60℃。反应pH可举出通常为5~9,优选为5.5~7.5。酶的使用量可以根据目标酶反应的进行速度适当选择。

[0123] 另外,该麦芽三糖生成反应时,可以进一步同时并用其它酶,使糖化液中的麦芽三糖含量增加。例如,通过并用普鲁兰酶、异淀粉酶等淀粉脱支酶,可以使糖化液的麦芽三糖的含量增加。

[0124] 通过上述反应得到的反应液可以直接作为含麦芽三糖的糖液使用,优选将含麦芽三糖的糖液进一步精制。作为精制方法,可以适当采用用于糖的精制的通常的方法,例如可举出利用活性炭的脱色、利用H⁺型、OH⁻型离子交换树脂的脱盐、离子交换柱色谱法、活性炭柱色谱法、利用硅胶柱色谱法等柱色谱法的分级、利用醇和丙酮等有机溶剂的分离、利用具有适当的分离性能的膜的分离等1种或2种以上的精制方法。

[0125] 作为用于得到高纯度的含麦芽三糖的糖质的方法,可举出离子交换柱色谱法,具体而言,可通过使用强酸性阳离子交换树脂的柱色谱法除去夹杂糖类,制造提高目标物的含量的麦芽三糖或含有其的糖质。

[0126] 如此得到的含麦芽三糖的糖质、或提高其含量的糖质可通过浓缩而制成糖浆状制品。该糖浆状制品也可通过进一步进行干燥、粉碎而制成粉末状制品。

[0127] 通过本发明的制造方法得到的麦芽三糖或含有其的糖质能够以糖浆或粉末的形态作为甜味料、呈味改良剂、品质改良剂、稳定剂等,作为饮食物、嗜好物、饲料、饵料、化妆品、医药部外品、医药品等各种组合物的添加剂使用。

[0128] 实施例

[0129] 以下,举出实施例,对本发明具体进行说明,但不应解释为本发明限定于以下实施

例。

[0130] 如以下所示,由生产菌候选获得 α 淀粉酶,对获得的 α 淀粉酶确认麦芽三糖生成活性。另外,进行生产确认有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶的生产菌候选的确定。此外,对确认有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶,进行氨基酸序列分析和碱基序列确定。

[0131] [试验例1:来自生产菌候选的 α 淀粉酶获得]

[0132] [1]生产菌候补的培养

[0133] 在三角烧瓶中投入具有以下组成的液体培养基,使用高压釜,在121℃杀菌20分钟。将生产菌候选接种于液体培养基,在30℃培养3天。

[0134] [表1]

○ 培养基组成

成分	终浓度 %(w/v)
玉米浆	10.0%
可溶性淀粉	2.0%
[0135] K_2HPO_4	0.2%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1%
$CaCl_2$	0.01%
$NaNO_3$	0.1%
Tween 40	0.1%
pH 7.0 \pm 0.1	121℃、20 min. 杀菌

[0136] [表2]

○ 培养条件

项目	设定值
[0137] 容量	40 mL/200 mL Δ 烧瓶
接种量	1铂耳
温度	30℃
培养时间	约 72h
振荡速度	150 rpm

[0138] [2]酶的精制

[0139] 通过菌体分离、超滤、硫酸铵分级、透析、第一次DEAE-Sepharose处理、第二次DEAE-Sepharose处理、第一次SephadexG-150处理以及第二次SephadexG-150处理,对生产菌候选生产的酶进行精制。

[0140] 菌体分离通过将培养上清液进行离心分离(7000rpm,5min)而进行。超滤通过对离心上清液使用超滤膜(AIV膜,旭化成)而进行。通过硫酸铵分级,获得0-40组分。透析使用Tris盐酸缓冲液(pH7.0)进行。在第一次DEAE-Sepharose处理中,使用DEAE-sepharose柱,利用包含 $10^{-3}M$ L-半胱氨酸的 $2.5 \times 10^{-3}M$ Tris盐酸缓冲液(pH7.0)进行平衡化和清洗,利

用KCl (0 ~ 1.0M梯度) 进行洗脱,收集淀粉酶级分,利用薄膜过滤器浓缩后,使用DEAE-Sephacrose进行再分级。在第二次DEAE-Sephacrose处理中,进行与第一次DEAE-Sephacrose处理洗脱的操作。在第一次SephadexG-150处理中,使用SephadexG-150柱,利用包含 10^{-3} M L-半胱氨酸的 2.5×10^{-3} M Tris盐酸缓冲液 (pH7.0) 进行平衡化及清洗,利用KCl (0 ~ 1.0M梯度) 进行洗脱,收集淀粉酶级分,利用薄膜过滤器浓缩后,利用SephadexG-150柱进行再分级。在第二次SephadexG-150中,进行与第一次SephadexG-150系统的操作。

[0141] 应予说明,淀粉酶级分是使用 α 淀粉酶测定试剂盒(Kikkomanchemiphar公司制),按照该试剂盒的说明书确认 α 淀粉酶活性的组分。

[0142] 通过SDS-PAGE将得到的级分展开。在SDS-PAGE中,利用SDS样品缓冲剂[Tris-HCL缓冲剂 (pH6.8) 0.125M、SDS4% (w/v)、蔗糖10% (w/v)、BPB(溴酚蓝) 0.01% (w/v)、DTT(二硫苏糖醇) 0.2M] 5 μ L稀释得到的级分10 μ L而制备电泳样品,在99.9 $^{\circ}$ C煮沸10分钟后,将电泳样品中的10 μ L供于电泳凝胶[SDS凝胶; SuperSepTM Ace15% (富士胶片和光纯药株式会社)] 进行电泳。将电泳凝胶转录至PVDF膜[Trans-Blot TurboTM小型PVDF转录盒 (BIO-RAD公司制)],将染色液[50% (v/v) 甲醇水溶液中,包含0.1% (w/v) 的CBB R-250] 转录膜进行染色,利用50% (v/v) 甲醇水溶液进行脱色。

[0143] 将SDS凝胶的染色结果示于图1。图1中,最右的泳道为分子标记。如图1所示,提示得到的酶通过处理而取得3种形态。各形态的酶的分子量分别为:箭头1表示的分子量为55kDa,箭头2表示的分子量为70kDa,箭头3表示的分子量为77kDa。另外,关于箭头1表示的分子量55kDa的酶,确认纯净地进行精制。对图1中的55kDa的精制级分,通过上述 α 淀粉酶测定试剂盒确认 α 淀粉酶活性。

[0144] [试验例2:麦芽三糖生成活性的确认]

[0145] 对图1中的55kDa的精制级分,进一步如以下确认麦芽三糖生成活性。

[0146] [1]底物液的制备

[0147] 将可溶性淀粉1g悬浮于约60mL的精制水,在100 $^{\circ}$ C加热5分钟,进行溶解。冷却后,使用精制定容至100mL,得到含有1% (w/v) 可溶性淀粉的底物液。

[0148] [2]反应用液的制备

[0149] 将底物液200 μ L和分析对象的酶液50 μ L混合,制备250 μ L的反应用液。

[0150] [3]分析用样品的制备

[0151] 将反应用液在50 $^{\circ}$ C以1000rpm振荡48小时而反应后,在100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟而停止反应。利用精制水将反应停止的反应用液稀释30倍,利用0.45 μ m过滤器进行过滤,得到滤液作为分析用样品。

[0152] 转移至分析用样品玻璃瓶,在以下条件下进行HPLC分析。

[0153] [表3]

○ HPLC分析

[0154]	装置	超高效液相色谱法Nexera (株式会社岛津制作所)
	柱	CK04S 10 mm ϕ \times 200 mm
	烘箱	80°C
	流动相	精制水
	流量	0.4 mL/min
	注入量	3 μ L
	分析时间	30 min
	检测器	ELS
	检测温度	60°C

[0155] HPLC分析的结果为:作为产物检测到麦芽三糖的峰。即,可确认55kDa精制级分的麦芽三糖生成活性。

[0156] 同样,对图1中的70kDa精制级分和77kDa精制级分,可确认到麦芽三糖生成活性。

[0157] [试验例3:具有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶的生产菌鉴定]

[0158] 将确认有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶的生产菌候选供至16SrRNA分析。其结果,该生产菌候选被鉴定为纤维微菌属(*Cellulosimicrobacterium* sp.)。

[0159] [试验例4:具有麦芽三糖生成活性的 α 淀粉酶的氨基酸序列分析和碱基序列确定]

[0160] [1]N末端氨基酸序列和内部氨基酸序列的分析

[0161] 切取试验例1的项目[2]中得到的3种条带(55kDa、70kDa、77kDa),通过蛋白质测序仪进行分析。其结果,可确定各个条带的N末端氨基酸序列。进一步对各条带进行胰蛋白酶处理后,通过利用LC-MSMS进行分析确定内部氨基酸序列。

[0162] [2]碱基序列的确定

[0163] [2-1]PCR

[0164] 以特定的N末端氨基酸序列和内部氨基酸序列为基础设计引物。使用PCR反应液20 μ L/管进行PCR扩增。PCR反应液的组成和PCR的条件如下所示。在1%琼脂糖凝胶中进行电泳,确认单一扩增。

[0165] [表4]

○ PCR 反应液组成		○ PCR 条件	
[0166]	• 10 \times LA <i>taq</i> 缓冲液	: 2 μ L	} 30 循环
	• dNTP 混合物 (各2.5mM)	: 3.2 μ L	
	• 模板 (约30 ng/ μ L)	: 0.25 μ L	
	• F-引物	: 0.2 μ L	
	• R-引物	: 0.2 μ L	
	• LA <i>taq</i>	: 0.2 μ L	
	• Milli Q	: 高达 20 μ L	
	合计	: 20 μ L	

[0167] [2-2]TA-克隆

[0168] 使用混合有PCR产物2 μ L和T-Vecor pMD20 1 μ L、Ligation Mix 3 μ L的连接反应液,在16°C进行连接反应30分钟,其后,转化至*E. coli* BL21 (DE3) 25 μ L。将得到的转化溶液约30 μ L涂布于包含LB(Thermo Fisher Scientific公司)和Amp(最终浓度100 μ g/mL)的液体培养基(以下,记为“LB+Amp液体培养基”)板,在37°C,0/N下进行培养。

[0169] [2-3]质粒提取

[0170] 在LB+Amp液体培养基(2mL)中,在37℃、0/N下培养转化体。培养结束后,进行集菌,利用Miniprep法提取质粒。

[0171] [2-4]序列分析

[0172] 利用桑格法进行序列分析,确定部分碱基序列。

[0173] [2-5]全长碱基序列分析

[0174] 使用以得到的部分碱基序列为基础制作的探针实施菌落杂交,对得到的阳性克隆的基因序列进行分析,确定目标碱基序列。其结果,由55kDa的条带可得到序列号4的碱基序列。由70kDa的条带可得到序列号5的碱基序列。由77kDa的条带可得到序列号6的碱基序列。

[0175] [3]氨基酸序列的确定

[0176] 由上述碱基序列确定氨基酸序列。序列号4的碱基序列编码的氨基酸序列为序列号1,序列号5的碱基序列编码的氨基酸序列为序列号2,序列号6的碱基序列编码的氨基酸序列为序列号3。即,可知:通过试验例1,可得到序列号1、序列号2和序列号3的麦芽三糖生成淀粉酶。

[0177] [试验例5:麦芽三糖生成淀粉酶的重组生产]

[0178] [1]表达载体的构建

[0179] [1-1]PCR

[0180] 为了扩增淀粉酶基因,作为正向引物设计序列号7表示的引物,作为反向引物设计序列号8表示的引物。使用PCR反应液50 μ L/管进行PCR扩增。PCR反应液的组成和PCR的条件如下所示。在1%琼脂糖凝胶中进行电泳,确认单一扩增。

[0181] [表5]

○ PCR 反应液组成		○ PCR 条件	
PrimeSTAR Max Premix	25 μ L	98°C	10 sec
10 μ M F-引物	1.5 μ L	55°C	5 sec
10 μ M R-引物	1.5 μ L	72°C	15 sec
模板基因组 DNA (100 ng/ μ L)	1 μ L	↓	
灭菌水	21 μ L	4°C	保持
合计	50 μ L		

} 30 循环

[0183] [1-2.连接和转化]

[0184] 使用混合有PCR产物和pUBCM21(pUC19和pUB110的穿梭载体)的连接液(5 μ L),在16℃进行连接反应30分钟,其后,转化至E.coli DH5 α 50 μ L。将得到的转化溶液约55 μ L涂布于LB+Amp(100 μ g/mL)板,在37℃,0/N下进行培养。连接反应液的组成如下所示。

[0185] [表6]

○ 连接反应液组成	
PCR 产物	2 μ L
pUBCM21	1 μ L
连接混合物	3 μ L
合计	6 μ L

[0187] [1-3.质粒提取]

[0188] 通过与试验例4的2-3相同的方法进行质粒提取,获得质粒pUBCM21-amy。

[0189] [2]枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的转化

[0190] 使用得到的载体pUBCM21-amy,进行源自枯草芽孢杆菌168株amyE缺损株的转化。

在转化的方法中,按照B.subtilis Secretary Protein Expression System(TaKaRa公司制)的说明书。

[0191] [3]麦芽三糖生成淀粉酶的制造

[0192] [3-1]转化株的培养

[0193] 将转化株接种于包含LB(Thermo Fisher Scientific公司)和卡纳霉素(20 μ g/mL)的液体培养基,在37 $^{\circ}$ C振荡培养4天。培养开始后,每1天各取样0.5mL,通过在4 $^{\circ}$ C以15000rpm离心5分钟而回收上清液,得到麦芽三糖生成淀粉酶。

[0194] [3-2] α 淀粉酶的生产率确认

[0195] 对回收的上清液(麦芽三糖生成淀粉酶组分),通过活性测定和SDS-PAGE进行 α 淀粉酶生产率的确认。活性测定使用 α 淀粉酶测定试剂盒(Kikkoman chemiphar公司),按照该试剂盒的说明书进行测定。另外,SDS-PAGE与试验例1的SDS-PAGE同样进行。

[0196] 活性测定的结果为:与阴性对照即pUBCM21(空载体导入株)进行比较,可确认到麦芽三糖生成淀粉酶级分具有显著的活性。另外,SDS-PAGE的结果为:通过使密码子在枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)中最适化,可确认到源自 α 淀粉酶的3种条带。该3种条带由各自的分子量推定为序列号1、2和3的淀粉酶的条带。即,通过本试验例,认为可得到序列号1、序列号2和序列号3的麦芽三糖生成淀粉酶。

[0197] 序列号7和8为引物。

[0042]	Ile Gly Ala Ser Gly Glu Pro Ile Gln Pro Ser Glu Tyr Leu Gly Ser
[0043]	225 230 235 240
[0044]	Gly Asp Ser His Glu Phe Phe Tyr Ala Arg Glu Leu Lys Ser Arg Phe
[0045]	245 250 255
[0046]	Asp Gly Gln Ile Lys Asp Leu Arg Thr Ile Gly Asp Asn Lys Leu Pro
[0047]	260 265 270
[0048]	Ser Asp Arg Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Arg Asn
[0049]	275 280 285
[0050]	Gly Glu Thr Met Ser Tyr Lys Trp Gly Ala Lys Tyr Arg Leu Ala Asn
[0051]	290 295 300
[0052]	Ala Phe Met Leu Ser Trp Pro Tyr Gly Ala Pro Ser Val Tyr Ser Gly
[0053]	305 310 315 320
[0054]	Tyr Thr Trp Ser Asp Lys Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ser Ala Thr
[0055]	325 330 335
[0056]	Ser Val Pro Asp Ala Ser Cys Ala Asp Ser Ala Trp Val Cys Thr Gln
[0057]	340 345 350
[0058]	Arg Trp Thr Glu Ile Ala Gly Met Val Gly Phe His Asn Ala Val Ala
[0059]	355 360 365
[0060]	Gly Thr Pro Val Thr Gly Trp Trp Asp Asp Gly Asn Asn His Ile Ala
[0061]	370 375 380
[0062]	Tyr Gly Arg Gly Ala Lys Gly Tyr Val Thr Ile Asn Asn Ser Ala Asn
[0063]	385 390 395 400
[0064]	Ala Val Thr Arg Thr Tyr Gln Thr Ser Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Cys
[0065]	405 410 415
[0066]	Asp Val Val Ala Ser Lys Asp Cys Ser Lys Thr Val Ser Val Ser Gly
[0067]	420 425 430
[0068]	Ser Gly Thr Phe Thr Ala Thr Val Pro Ala Tyr Gly Ala Leu Ala Leu
[0069]	435 440 445
[0070]	His Val Gly Ala Arg Gly Asp Gly Gly Thr Gly Gly Pro Gly Pro Val
[0071]	450 455 460
[0072]	Asp Pro Ala Gly Thr Thr Thr Val Tyr Tyr Ala Thr Asp Lys Gly Trp
[0073]	465 470 475 480
[0074]	Asn Ala Tyr Asn Val His Tyr Lys Val Gly Thr Gly Ala Trp Thr Ala
[0075]	485 490 495
[0076]	Val Pro Gly Val Pro Met Thr Ala Ala Cys Thr Gly Trp Val Ser Arg
[0077]	500 505 510
[0078]	Gln Ile Ser Leu Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Thr Val Thr
[0079]	515 520 525
[0080]	Ala Ala Phe Thr Asn
[0081]	530
[0082]	<210> 2
[0083]	<211> 675

[0084] <212> PRT
 [0085] <213> 纤维微菌属
 [0086] <400> 2
 [0087] Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Thr Pro Val Val Asp Ser
 [0088] 1 5 10 15
 [0089] Pro Asn Gly Arg Gly Asp Val Ile Leu Asn Leu Phe Gln Trp Thr Trp
 [0090] 20 25 30
 [0091] Asp Ser Val Ala Ala Glu Cys Thr Ser Thr Ile Gly Pro Ala Gly Phe
 [0092] 35 40 45
 [0093] Gly Tyr Val Gln Val Ser Pro Pro Gln Glu His Ile Gln Gly Thr Ala
 [0094] 50 55 60
 [0095] Trp Trp Thr Ser Tyr Gln Pro Val Ser Tyr Lys Leu Glu Ser Lys Leu
 [0096] 65 70 75 80
 [0097] Gly Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Met Val Ser Thr Cys Lys Ala Ala
 [0098] 85 90 95
 [0099] Gly Val Gly Val Ile Val Asp Ala Val Val Asn His Thr Ala Gly Ala
 [0100] 100 105 110
 [0101] Asp Thr Gly Ser Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Ser Val Asp
 [0102] 115 120 125
 [0103] Ser Phe Pro Gly Val Pro Tyr Gly Pro Asn Asp Phe Asn Asp Cys Arg
 [0104] 130 135 140
 [0105] Ser Asn Ile Ser Asn Tyr Gly Asp Arg Tyr Asn Val Gln Asn Cys Arg
 [0106] 145 150 155 160
 [0107] Leu Val Ser Leu Gln Asp Leu Arg Thr Gly Ser Asp Tyr Val Arg Asp
 [0108] 165 170 175
 [0109] Lys Ile Ala Gly Tyr Leu Asn Asp Leu Leu Ser Leu Gly Val Ser Gly
 [0110] 180 185 190
 [0111] Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala Ala Asp Leu Ala Ala
 [0112] 195 200 205
 [0113] Ile Lys Ala Arg Leu Thr Asn Pro Asp Val Phe Trp Val His Glu Val
 [0114] 210 215 220
 [0115] Ile Gly Ala Ser Gly Glu Pro Ile Gln Pro Ser Glu Tyr Leu Gly Ser
 [0116] 225 230 235 240
 [0117] Gly Asp Ser His Glu Phe Phe Tyr Ala Arg Glu Leu Lys Ser Arg Phe
 [0118] 245 250 255
 [0119] Asp Gly Gln Ile Lys Asp Leu Arg Thr Ile Gly Asp Asn Lys Leu Pro
 [0120] 260 265 270
 [0121] Ser Asp Arg Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Arg Asn
 [0122] 275 280 285
 [0123] Gly Glu Thr Met Ser Tyr Lys Trp Gly Ala Lys Tyr Arg Leu Ala Asn
 [0124] 290 295 300
 [0125] Ala Phe Met Leu Ser Trp Pro Tyr Gly Ala Pro Ser Val Tyr Ser Gly

[0126]	305	310	315	320
[0127]	Tyr Thr Trp Ser Asp Lys Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ser Ala Thr			
[0128]		325	330	335
[0129]	Ser Val Pro Asp Ala Ser Cys Ala Asp Ser Ala Trp Val Cys Thr Gln			
[0130]		340	345	350
[0131]	Arg Trp Thr Glu Ile Ala Gly Met Val Gly Phe His Asn Ala Val Ala			
[0132]		355	360	365
[0133]	Gly Thr Pro Val Thr Gly Trp Trp Asp Asp Gly Asn Asn His Ile Ala			
[0134]		370	375	380
[0135]	Tyr Gly Arg Gly Ala Lys Gly Tyr Val Thr Ile Asn Asn Ser Ala Asn			
[0136]	385	390	395	400
[0137]	Ala Val Thr Arg Thr Tyr Gln Thr Ser Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Cys			
[0138]		405	410	415
[0139]	Asp Val Val Ala Ser Lys Asp Cys Ser Lys Thr Val Ser Val Ser Gly			
[0140]		420	425	430
[0141]	Ser Gly Thr Phe Thr Ala Thr Val Pro Ala Tyr Gly Ala Leu Ala Leu			
[0142]		435	440	445
[0143]	His Val Gly Ala Arg Gly Asp Gly Gly Thr Gly Gly Pro Gly Pro Val			
[0144]		450	455	460
[0145]	Asp Pro Ala Gly Thr Thr Thr Val Tyr Tyr Ala Thr Asp Lys Gly Trp			
[0146]	465	470	475	480
[0147]	Asn Ala Tyr Asn Val His Tyr Lys Val Gly Thr Gly Ala Trp Thr Ala			
[0148]		485	490	495
[0149]	Val Pro Gly Val Pro Met Thr Ala Ala Cys Thr Gly Trp Val Ser Arg			
[0150]		500	505	510
[0151]	Gln Ile Ser Leu Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Thr Val Thr			
[0152]		515	520	525
[0153]	Ala Ala Phe Thr Asn Gly Ser Gly Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Lys			
[0154]		530	535	540
[0155]	Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Ala Ala Val Ala Val Ser Gly Gly Thr Val			
[0156]	545	550	555	560
[0157]	Thr Ala Gly Asn Pro Cys Asp Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Pro Val			
[0158]		565	570	575
[0159]	Glu Gly Gln Gly Asp Ala Ser Phe Ser Val Thr Ala Thr Thr Thr Trp			
[0160]		580	585	590
[0161]	Gly Gln Thr Val His Val Val Gly Ser Ile Pro Ala Leu Gly Ser Trp			
[0162]		595	600	605
[0163]	Ala Pro Ala Asn Gly Val Pro Leu Ser Ser Ser Ala Tyr Pro Val Trp			
[0164]		610	615	620
[0165]	Thr Ala Arg Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Thr Phe Gln Tyr Lys Tyr			
[0166]	625	630	635	640
[0167]	Val Lys Arg Asp Gly Gly Gly Asn Val Val Trp Glu Ser Gly Gly Asn			

[0168]		645		650		655
[0169]	Arg Thr Ala Thr Val Gly Ala Asp Gly Ser Val Thr Leu Ser Asp Thr					
[0170]		660		665		670
[0171]	Trp Arg Ser					
[0172]		675				
[0173]	<210>	3				
[0174]	<211>	728				
[0175]	<212>	PRT				
[0176]	<213>	纤维微菌属				
[0177]	<400>	3				
[0178]	Met Thr Arg Thr Thr Asp Leu Ala Gly Pro Pro Ala Pro Thr Pro Val					
[0179]	1	5		10		15
[0180]	Pro Ala Gly Arg Pro Ala Arg Pro Arg Gly Arg Arg Leu Arg Arg Val					
[0181]		20		25		30
[0182]	Leu Ala Ala Gly Ala Ser Ala Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala					
[0183]		35		40		45
[0184]	Ala Val Pro Val Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Thr					
[0185]		50		55		60
[0186]	Pro Val Val Asp Ser Pro Asn Gly Arg Gly Asp Val Ile Leu Asn Leu					
[0187]	65	70		75		80
[0188]	Phe Gln Trp Thr Trp Asp Ser Val Ala Ala Glu Cys Thr Ser Thr Ile					
[0189]		85		90		95
[0190]	Gly Pro Ala Gly Phe Gly Tyr Val Gln Val Ser Pro Pro Gln Glu His					
[0191]		100		105		110
[0192]	Ile Gln Gly Thr Ala Trp Trp Thr Ser Tyr Gln Pro Val Ser Tyr Lys					
[0193]		115		120		125
[0194]	Leu Glu Ser Lys Leu Gly Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Met Val Ser					
[0195]		130		135		140
[0196]	Thr Cys Lys Ala Ala Gly Val Gly Val Ile Val Asp Ala Val Val Asn					
[0197]		145		150		155
[0198]	His Thr Ala Gly Ala Asp Thr Gly Ser Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr					
[0199]		165		170		175
[0200]	Ser Tyr Ser Val Asp Ser Phe Pro Gly Val Pro Tyr Gly Pro Asn Asp					
[0201]		180		185		190
[0202]	Phe Asn Asp Cys Arg Ser Asn Ile Ser Asn Tyr Gly Asp Arg Tyr Asn					
[0203]		195		200		205
[0204]	Val Gln Asn Cys Arg Leu Val Ser Leu Gln Asp Leu Arg Thr Gly Ser					
[0205]		210		215		220
[0206]	Asp Tyr Val Arg Asp Lys Ile Ala Gly Tyr Leu Asn Asp Leu Leu Ser					
[0207]		225		230		235
[0208]	Leu Gly Val Ser Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Pro Ala					
[0209]		245		250		255

[0210]	Ala Asp Leu Ala Ala Ile Lys Ala Arg Leu Thr Asn Pro Asp Val Phe
[0211]	260 265 270
[0212]	Trp Val His Glu Val Ile Gly Ala Ser Gly Glu Pro Ile Gln Pro Ser
[0213]	275 280 285
[0214]	Glu Tyr Leu Gly Ser Gly Asp Ser His Glu Phe Phe Tyr Ala Arg Glu
[0215]	290 295 300
[0216]	Leu Lys Ser Arg Phe Asp Gly Gln Ile Lys Asp Leu Arg Thr Ile Gly
[0217]	305 310 315 320
[0218]	Asp Asn Lys Leu Pro Ser Asp Arg Ala Gly Val Phe Val Asp Asn His
[0219]	325 330 335
[0220]	Asp Thr Glu Arg Asn Gly Glu Thr Met Ser Tyr Lys Trp Gly Ala Lys
[0221]	340 345 350
[0222]	Tyr Arg Leu Ala Asn Ala Phe Met Leu Ser Trp Pro Tyr Gly Ala Pro
[0223]	355 360 365
[0224]	Ser Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Trp Ser Asp Lys Asp Ala Gly Ala Pro
[0225]	370 375 380
[0226]	Gly Ala Ser Ala Thr Ser Val Pro Asp Ala Ser Cys Ala Asp Ser Ala
[0227]	385 390 395 400
[0228]	Trp Val Cys Thr Gln Arg Trp Thr Glu Ile Ala Gly Met Val Gly Phe
[0229]	405 410 415
[0230]	His Asn Ala Val Ala Gly Thr Pro Val Thr Gly Trp Trp Asp Asp Gly
[0231]	420 425 430
[0232]	Asn Asn His Ile Ala Tyr Gly Arg Gly Ala Lys Gly Tyr Val Thr Ile
[0233]	435 440 445
[0234]	Asn Asn Ser Ala Asn Ala Val Thr Arg Thr Tyr Gln Thr Ser Leu Pro
[0235]	450 455 460
[0236]	Ala Gly Thr Tyr Cys Asp Val Val Ala Ser Lys Asp Cys Ser Lys Thr
[0237]	465 470 475 480
[0238]	Val Ser Val Ser Gly Ser Gly Thr Phe Thr Ala Thr Val Pro Ala Tyr
[0239]	485 490 495
[0240]	Gly Ala Leu Ala Leu His Val Gly Ala Arg Gly Asp Gly Gly Thr Gly
[0241]	500 505 510
[0242]	Gly Pro Gly Pro Val Asp Pro Ala Gly Thr Thr Thr Val Tyr Tyr Ala
[0243]	515 520 525
[0244]	Thr Asp Lys Gly Trp Asn Ala Tyr Asn Val His Tyr Lys Val Gly Thr
[0245]	530 535 540
[0246]	Gly Ala Trp Thr Ala Val Pro Gly Val Pro Met Thr Ala Ala Cys Thr
[0247]	545 550 555 560
[0248]	Gly Trp Val Ser Arg Gln Ile Ser Leu Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ala
[0249]	565 570 575
[0250]	Ala Ala Thr Val Thr Ala Ala Phe Thr Asn Gly Ser Gly Ala Trp Asp
[0251]	580 585 590

[0252]	Ser Asn Gly Gly Lys Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Ala Ala Val Ala Val	
[0253]	595	600 605
[0254]	Ser Gly Gly Thr Val Thr Ala Gly Asn Pro Cys Asp Gly Gly Gly Ser	
[0255]	610	615 620
[0256]	Pro Gly Gly Pro Val Glu Gly Gln Gly Asp Ala Ser Phe Ser Val Thr	
[0257]	625	630 635 640
[0258]	Ala Thr Thr Thr Trp Gly Gln Thr Val His Val Val Gly Ser Ile Pro	
[0259]	645	650 655
[0260]	Ala Leu Gly Ser Trp Ala Pro Ala Asn Gly Val Pro Leu Ser Ser Ser	
[0261]	660	665 670
[0262]	Ala Tyr Pro Val Trp Thr Ala Arg Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Thr	
[0263]	675	680 685
[0264]	Phe Gln Tyr Lys Tyr Val Lys Arg Asp Gly Gly Gly Asn Val Val Trp	
[0265]	690	695 700
[0266]	Glu Ser Gly Gly Asn Arg Thr Ala Thr Val Gly Ala Asp Gly Ser Val	
[0267]	705	710 715 720
[0268]	Thr Leu Ser Asp Thr Trp Arg Ser	
[0269]	725	
[0270]	<210> 4	
[0271]	<211> 1599	
[0272]	<212> DNA	
[0273]	<213> 纤维微菌属	
[0274]	<400> 4	
[0275]	gcaccgcg cgccgcgc gccctgccc acgcccctc tgcactccc gaacggccgg	60
[0276]	ggcgacgtga tectcaacct cttccagtgg acgtgggact ccgtggccgc cgagtgcacg	120
[0277]	agcaccatcg gcccgccgg gtccggtac gtccaggtct cgccgccga ggagcacatc	180
[0278]	cagggcacgg cctggtggac ctctaccag cccgtcagct acaagctcga gtccaagctc	240
[0279]	ggcaccgcg ccgagtcca gcgcatggtg agcacgtca aggcggcggg cgtgggctg	300
[0280]	atcgtcgacg cgtgtccta ccacacggcg ggcgcgaca ccgggtccgg aaccgggacc	360
[0281]	ggagggacga gctactcctg ggacagctc cccggcgtcc cgtacgggcc gaacgacttc	420
[0282]	aacgactgcc ggtcgaacat cagcaactac ggcgaccggt acaacgtcca gaactgccgc	480
[0283]	ctcgtctcgc tccaggatct gcggacgggc tccgactacg tgcgcgacaa gatcgcgggc	540
[0284]	tacctcaacg acctctgtc gctcgggctc tcgggttcc gcatcgacgc cgccaagc	600
[0285]	atcccggccg cggacctcgc ggcgatcaag gcgcggctca cgaaccggga cgtcttctgg	660
[0286]	gtgcacgagg tcatcggcg gagcggcgag ccgatccagc cctcggagta cctcggttcc	720
[0287]	ggcactcgc acgagtctt ctacgcgcg gagtcaagt cccggttcga cggccagatc	780
[0288]	aaggacctgc gcaccatcgg cgacaacaag ctcccctcc accgcgggg cgtcttctgc	840
[0289]	gacaaccacg acaccgagcg caacggcgag acgatgagct acaagtggg cgccaagtac	900
[0290]	cggtcgcga acgcgttcat gctctcgtgg ccctacggcg cgccgagcgt ctactcgggc	960
[0291]	tacacgtgga gcgacaagga gcgggtgcg cccggcgcct ccgccacct cgtgcccgac	1020
[0292]	gcgagctgtg ccgacagcgc gtgggtctgc acgcagcgt ggaccgagat cgcgggcatg	1080
[0293]	gtcggcttcc acaacgcggt cgccgggacc ccggtgacgg gctggtggga cgaccggaac	1140

[0294]	aaccacatcg cctacgggcg gggcgccaag ggctacgtga cgatcaacaa ctccgcgaac	1200
[0295]	gccgtgacgc gcacctacca gacctcgtc cccgccggga cgtactgcga cgtcgtggcg	1260
[0296]	tcgaaggact gctcgaagac cgtctccgtc tccggctcgg gcaccttac ggcgacggtg	1320
[0297]	cccgcgtacg gggcgctcgc gctccacgtc ggggcgcgcg gcgacggcgg caccggtggc	1380
[0298]	cccgggcccg tcgaccggc cggcacgacg accgtctact acgcgaccga caagggtgg	1440
[0299]	aacgcgtaca acgtccacta caaggtcggc accggcgcct ggaccgccgt ccccggggtc	1500
[0300]	ccgatgacgg cggcctgcac gggctgggtc tcgcggcaga tcagccttc cagcggggcg	1560
[0301]	acgggcgcgg ccgcgaccgt caccgccgc ttcacgaac	1599
[0302]	<210> 5	
[0303]	<211> 2028	
[0304]	<212> DNA	
[0305]	<213> 纤维微菌属	
[0306]	<400> 5	
[0307]	gcaccgcccg cggccgcgcc gcccggtccg acgcccgtcg tcgactcccc gaacggccgg	60
[0308]	ggcgacgtga tctcaacct cttccagtgg acgtgggact ccgtggccgc cgagtgcacg	120
[0309]	agcaccatcg gcccggccgg gttcggctac gtccaggtct cgcgccgca ggagcacatc	180
[0310]	cagggcacgg cctggtggac ctctaccag cccgtcagct acaagctcga gtccaagctc	240
[0311]	ggcaccgcg ccgagtcca gcgcatggtg agcacgtca aggcggcggg cgtgggcgtg	300
[0312]	atgctcgacg cggctcgtcaa ccacacggcg ggcccgaca ccgggtccgg aaccgggacc	360
[0313]	ggagggacga gctactccgt ggacagctc cccggcgtcc cgtacggcc gaacgacttc	420
[0314]	aacgactgcc ggtcgaacat cagcaactac ggcgaccggt acaacgtcca gaactgccgc	480
[0315]	ctcgtctcgc tccaggatct gcggacgggc tccgactacg tgcgcgacaa gatcgcgggc	540
[0316]	tacctaacg acctctgtc gctcggcgtc tcgggcttcc gcatcgacgc cgcgaagcac	600
[0317]	atccggccg cggacctcgc ggcgatcaag gcgcggtca cgaaccggga cgtcttctgg	660
[0318]	gtgcacgagg tcatcggcgc gaggcggag ccgatccagc cctcggagta cctcggttcc	720
[0319]	ggcactcgc acgagttct ctacgcgcgc gagctcaagt cccggttcga cggccagatc	780
[0320]	aaggacctgc gcaccatcgg cgacaacaag ctcccctccg accgcgcggg cgtcttcgtc	840
[0321]	gacaaccacg acaccgagcg caacggcgag acgatgagct acaagtggg cgccaagtac	900
[0322]	cgctcgcga acgcgttcat gctctcgtgg ccctacggcg cgcgagcgt ctactcgggc	960
[0323]	tacacgtgga gcgacaagga cgcgggtgcg cccggcgcct ccgccacctc cgtgcccgc	1020
[0324]	gcgagctgtg ccgacagcgc gtgggtctgc acgcagcgt ggaccgagat cgcgggcatg	1080
[0325]	gtcggcttcc acaacgcggt cgcggggacc ccggtgacgg gctggtggga cgacgggaac	1140
[0326]	aaccacatcg cctacgggcg gggcgccaag ggctacgtga cgatcaacaa ctccgcgaac	1200
[0327]	gccgtgacgc gcacctacca gacctcgtc cccgccggga cgtactgcga cgtcgtggcg	1260
[0328]	tcgaaggact gctcgaagac cgtctccgtc tccggctcgg gcaccttac ggcgacggtg	1320
[0329]	cccgcgtacg gggcgctcgc gctccacgtc ggggcgcgcg gcgacggcgg caccggtggc	1380
[0330]	cccgggcccg tcgaccggc cggcacgacg accgtctact acgcgaccga caagggtgg	1440
[0331]	aacgcgtaca acgtccacta caaggtcggc accggcgcct ggaccgccgt ccccggggtc	1500
[0332]	ccgatgacgg cggcctgcac gggctgggtc tcgcggcaga tcagccttc cagcggggcg	1560
[0333]	acgggcgcgg ccgcgaccgt caccgccgc ttcacgaac gctcgggcgc ctgggacagc	1620
[0334]	aacggcgga aggactactc cctgtccggc gctcggctcg ccgtctccgg cgggacggtc	1680
[0335]	acggcgggca acccgtcga cggcggcggg tcgccggcg ggccggtcga agggcagggc	1740

[0336]	gacgcgtcgt tctccgtcac cgccaccacc acgtggggcc agacggtcca cgtcgtcggc	1800
[0337]	agcatcccgg cgctcggctc ctgggcgccc gcgaacggcg tcccgtgtc gtcgtcggcc	1860
[0338]	taccgggtgt ggaccgcgcg cgtcgacctc ccggccggca cgacgttcca gtacaagtac	1920
[0339]	gtcaagcgcg acggcggcgg gaacgtcgtc tgggagagcg gcggcaaccg cacggcgacg	1980
[0340]	gtcggcgccg acggctccgt gacgctgtcg gacacctggc ggctcgtag	2028
[0341]	<210> 6	
[0342]	<211> 2187	
[0343]	<212> DNA	
[0344]	<213> 纤维微菌属	
[0345]	<400> 6	
[0346]	atgacgcgca ccaccgacct cgccggaccc ccggcgccca cccccgtccc cgcaggacgc	60
[0347]	cccgccgcc cgcgcggccg ccgcttgccg cgcgtcctcg cggccggcgc ctccggcgcc	120
[0348]	ctcgcgtga ccgccgcgt ggccgcggtc ccggtcgcg caccgccgc ggccgcgccc	180
[0349]	cccgtgccga cgcccgtcgt cgactccccg aacggccggg gcgacgtgat cctcaacctc	240
[0350]	ttccagtgga cgtgggactc cgtggccgcc gactgcacga gcaccatcgg cccggccggg	300
[0351]	ttcggctacg tccaggtctc gccgccgag gagcacatcc agggcacggc ctggtggacc	360
[0352]	tcctaccagc ccgtcagcta caagctcgag tccaagctcg gcacccgcgc cgagttccag	420
[0353]	cgcatggtga gcacgtgcaa ggccggcggc gtgggcgtga tcgtcgacgc ggctcgtaac	480
[0354]	cacacggcgg gcgccgacac cgggtccgga accgggaccg gagggacgag ctactccgtg	540
[0355]	gacagcttcc ccggcgtccc gtacgggccc aacgacttca acgactgccg gtcgaacatc	600
[0356]	agcaactacg gcgaccgta caacgtccag aactgccgcc tcgtctcgtc ccaggatctg	660
[0357]	cggacgggct ccgactacgt gcgcgacaag atcgcgggct acctcaacga cctcctgtcg	720
[0358]	ctcggcgtct cgggcttccg catcgacgcc gcgaagcaca tcccggccgc ggacctcgcg	780
[0359]	gcgatcaagg cgcggtcac gaaccggac gtcttctggg tgcacgaggt catcggcgcg	840
[0360]	agcggcgagc cgatccagcc ctccggagtac ctccggttccg gcgactcgca cgagttcttc	900
[0361]	tacgcgcgcg agctcaagtc ccggttcgac ggccagatca aggacctgcg caccatcggc	960
[0362]	gacaacaagc tcccctccga ccgcgcgggc gtcttcgtcg acaaccacga caccgagcgc	1020
[0363]	aacggcgaga cgatgagcta caagtggggc gccaaagtacc ggctcgccaa cgcgttcatg	1080
[0364]	ctctcgtggc cctacggcgc gccgagcgtc tactcgggct acacgtggag cgacaaggac	1140
[0365]	gcgggtgccc ccgggcctc cgccacctcc gtgcccagc cgagctgtgc cgacagcgcg	1200
[0366]	tgggtctgca cgcagcgtg gaccgagatc gcgggcatgg tcggcttcca caacgcggtc	1260
[0367]	gccgggaccc cggtagcggg ctggtgggac gacgggaaca accacatcgc ctacggcgcg	1320
[0368]	ggcgccaagg gctacgtgac gatcaacaac tccgcgaac ccgtgacgcg cacctaccag	1380
[0369]	acctcgtccc ccgccgggac gtactgcgac gtcgtggcgt cgaaggactg ctccaagacc	1440
[0370]	gtctccgtct ccggctcggg caccttcacg gcgacggtgc ccgctacgg ggcgctcgcg	1500
[0371]	ctccacgtcg gggcgcgccc cgacggcggc accggtggcc ccgggcccgt cgacccggcc	1560
[0372]	ggcacgacga ccgttacta cgcgaccgac aagggtgga acgctgataa cgtccactac	1620
[0373]	aaggtcggca ccgggcctg gaccgcgctc cccggggtcc cgatgacggc ggctgcaacg	1680
[0374]	ggctgggtct cgcggcagat cagccttccc agcggggcga cgggcgcggc cgcgaccgtc	1740
[0375]	accgccctc tcaagaacgg ctccggcggc tgggacagca acggcggcaa ggactactcc	1800
[0376]	ctgtccggcg ctgcggtcgc cgtctccggc gggacggtca cggcgggcaa cccgtgcgac	1860
[0377]	ggcggcgggt cgccgggccc gccggtcgaa gggcaggcgc acgcgtcgtt ctccgtcacc	1920

[0378]	gccaccacca cgtggggcca gacggtccac gtcgtcggca gcatcccggc gtcgggtcc	1980
[0379]	tgggcgcccg cgaacggcgt cccgctgtcg tcgtcggcct acccggtgtg gaccgcgcgc	2040
[0380]	gtcgacctcc cggccggcac gacgttcag tacaagtacg tcaagcgcga cggcggcggg	2100
[0381]	aacgtcgtct gggagagcgg cggcaaccgc acggcgacgg tcggcgccga cggctccgtg	2160
[0382]	acgtgtcgg acacctggcg gtcgtag	2187
[0383]	<210> 7	
[0384]	<211> 35	
[0385]	<212> DNA	
[0386]	<213> 人工	
[0387]	<220>	
[0388]	<223> 引物	
[0389]	<400> 7	
[0390]	ggcagtctgc tcatgcgatg acgcgcacca cgcac	35
[0391]	<210> 8	
[0392]	<211> 33	
[0393]	<212> DNA	
[0394]	<213> 人工	
[0395]	<220>	
[0396]	<223> 引物	
[0397]	<400> 8	
[0398]	ttacttttta ttcagttacg accgccaggt gtc	33

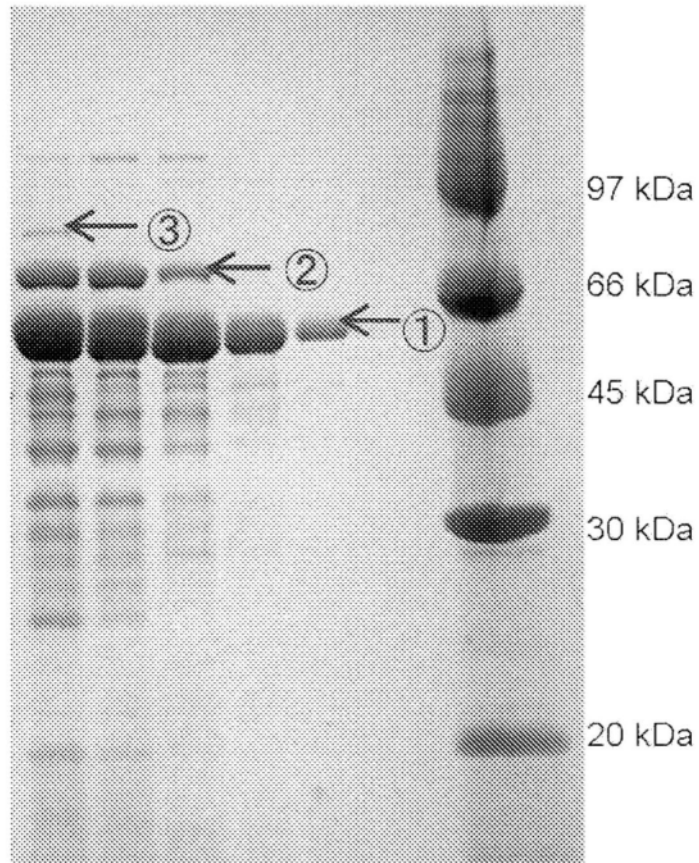


图1