



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111133103 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 08

(21) 申请号 201880036242.2

(22) 申请日 2018.03.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111133103 A

(43) 申请公布日 2020.05.08

(30) 优先权数据
10-2017-0042166 2017.03.31 KR
10-2017-0111494 2017.08.31 KR
10-2017-0158766 2017.11.24 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/003769 2018.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/182355 KO 2018.10.04

(83) 生物保藏信息
KCCM11996P 2017.03.20
KCCM12232P 2018.03.23
KCCM12093P 2017.08.11
KCCM12109P 2017.09.13
KCCM12235P 2018.03.23
KCCM12236P 2018.03.23

(73) 专利权人 CJ第一制糖株式会社
地址 韩国首尔

(72) 发明人 梁成才 李英美 朴逸香 赵显国
金成铺 李赞炯 崔殷姪 申仙美

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

专利代理师 曹雯 黄歆

(51) Int.Cl.
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/24 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

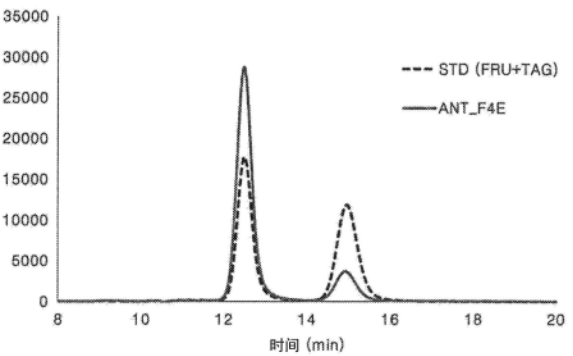
(56) 对比文件
CN 106399427 A, 2017.02.15
KR 101480422 B1, 2015.01.13
Daniel J. Wichelecki等. ATP-binding
Cassette (ABC) Transport System Solute-
binding Protein-guided Identification of
Novel D-Altritol and Galactitol Catabolic
Pathways in Agrobacterium tumefaciens
C58. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL
CHEMISTRY. 2015, 第290卷 (第290期), 28963-
28976. (续)

审查员 王慧

权利要求书1页 说明书17页
序列表14页 附图6页

(54) 发明名称
用于制备塔格糖的组合物和利用其制备塔
格糖的方法

(57) 摘要
本发明提供了一种用于制备塔格糖的组
合物,其包含果糖-4-差向异构酶,以及使用该组
合物制备塔格糖的方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Daniel J. Wichelecki等.ATP-binding Cassette (ABC) Transport System Solute-binding Protein-guided Identification of Novel D-Altritol and Galactitol Catabolic Pathways in *Agrobacterium tumefaciens* C58.THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.2015,第290卷(第290期),28963-28976.

MULTISPECIES: tagatose-6-phosphate kinase [*Agrobacterium tumefaciens* complex].NCBI.2015,WP_010972812..

MAG: hypothetical protein AMJ56_01405 [*Anaerolineae bacterium* SG8_19].NCBI.2015,KPK13642.1.

tagatose 6 phosphate kinase
[*Dictyoglomus thermophilum* H-6-12].NCBI.2014,ACI19904.1.

putative tagatose-6-phosphate kinase
[*Anaerolinea thermophila* UNI-1].NCBI.2016,BAJ62431.1.

UniParc • UPI000838E548.EBI.2016, UPI000838E548.

hypothetical protein
[*Thermoanaerobacter indiensis*].NCBI.2013, WP_019907213.1.

Susumu Ito.Catalysis, Structures, and Applications of Carbohydrate Epimerases.J. Appl. Glycosci.,.2010,第57卷1-6.

1. 组合物用于制备塔格糖的用途,所述组合物包含一种或多种塔格糖-6-磷酸激酶或表达所述塔格糖-6-磷酸激酶的微生物,以及果糖;

其中所述塔格糖-6-磷酸激酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、3、5、7、9或11所示。

2. 权利要求1的用途,其中所述塔格糖-6-磷酸激酶是源自厌氧绳菌(*Anaerolineae* sp.)、嗜热双歧菌(*Thermobifida*)属、嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter*)属或网球菌(*Dictyoglomus*)属的酶或其变种。

3. 一种制备塔格糖的方法,其包括通过使果糖与一种或多种塔格糖-6-磷酸激酶或表达所述塔格糖-6-磷酸激酶的微生物接触,来将果糖转化为塔格糖;

其中所述塔格糖-6-磷酸激酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、3、5、7、9或11所示。

4. 权利要求3的制备塔格糖的方法,其中所述接触在pH 5.0至pH 9.0和30℃至80℃的条件下进行0.5小时至48小时。

用于制备塔格糖的组合物和利用其制备塔格糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含果糖-4-差向异构酶的用于制备塔格糖的组合物,以及使用所述组合物制备塔格糖的方法。

背景技术

[0002] 塔格糖是一种天然甜味剂,其少量存在于诸如牛奶、奶酪、可可等食物中,以及诸如苹果和橘子的甜水果中,并且具有与蔗糖相似的物理性质。塔格糖的热量值为1.5kcal/g,是蔗糖的三分之一,其血糖指数(Glycemic index,GI)为3,是蔗糖的5%。塔格糖具有类似于蔗糖的甜味并具有多种健康益处。就这点来说,当应用于多种产品时,塔格糖可以用作能够同时满足口味和健康要求的替代甜味剂。

[0003] 制备塔格糖的常规已知方法包括使用半乳糖作为主要原料的化学方法(催化反应)或生物方法(异构化酶反应)(参见PCT WO 2006/058092,韩国专利号10-0964091和10-1368731)。然而,在已知的制备方法中,作为半乳糖的基本原料的乳糖的价格不稳定,这取决于全球市场上原料奶和乳糖的产量,供应和需求等。因此,制备塔格糖的原料的稳定供应受到限制。因此,需要并研究一种能够以常用糖(蔗糖、葡萄糖、果糖等)作为原料来制备塔格糖的新方法。文献分别公开了由葡萄糖、半乳糖和果糖制备半乳糖、阿洛酮糖和塔格糖的方法(韩国专利号10-744479、10-1057873和10-1550796)。

[0004] 同时,已知塔格糖-6-磷酸激酶(Tagatose-6-phosphate kinase,EC 2.7.1.144)可以以ATP和D-塔格糖6-磷酸(D-tagatose 6-phosphate)为底物产生ADP和D-塔格糖1,6-二磷酸(D-tagatose 1,6-biphosphate),如下所示[反应式1]。然而,关于塔格糖-6-磷酸激酶是否能催化果糖(D-fructose)转化为塔格糖尚未有研究。

[0005] [反应式1] $\text{ATP} + \text{D-塔格糖6-磷酸} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{D-塔格糖1,6-二磷酸}$

[0006] 在此背景下,发明人进行了广泛的研究以开发具有将果糖转化为塔格糖的活性的酶,结果发现塔格糖-6-磷酸激酶(Tagatose-6-phosphate kinase,EC 2.7.1.144)具有将果糖转化为塔格糖的能力,从而完成本发明。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种用于制备塔格糖的组合物,其包含塔格糖-6-磷酸激酶、表达所述塔格糖-6-磷酸激酶的微生物或所述微生物的培养物。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种制备塔格糖的方法,其包括通过使果糖与本发明的果糖-4-差向异构酶、表达所述果糖-4-差向异构酶的微生物或所述微生物的培养物接触,来将果糖转化成塔格糖。

[0009] 下文中,将参考以下描述以及所附权利要求和附图来更详细地描述本发明的其他目的和优势。本说明书中未描述的内容可以为本领域或相似领域的技术人员充分认识并推断得出,因而将省略对其的描述。

附图说明

[0010] 图1显示SDS-PAGE的结果,以分析根据本发明的一实施方案从转化子制备并分离出来的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_ANT_F4E)的分子量。

[0011] 图2是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_ANT_F4E)具有果糖-4-差向异构酶的活性。

[0012] 图3显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_ANT_F4E)与温度的变化对应的果糖-4-差向异构化的活性。

[0013] 图4是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_AB_F4E具有果糖-4-差向异构酶的活性。

[0014] 图5显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_AB_F4E与温度的变化对应的果糖-4-差向异构化的活性。

[0015] 图6显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_AB_F4E与金属的添加对应的果糖-4-差向异构化的活性。

[0016] 图7是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_DT_F4E具有果糖-4-差向异构酶的活性。

[0017] 图8显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_DT_F4E与温度的变化对应的果糖-4-差向异构化的活性。

[0018] 图9显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_DT_F4E与金属的添加对应的果糖-4-差向异构化的活性。

[0019] 图10是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_ANTA_F4E)具有果糖-4-差向异构酶的活性。

[0020] 图11是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_TH_F4E)具有果糖-4-差向异构酶的活性。

[0021] 图12是HPLC层析结果,显示本发明的一实施方案中制备的塔格糖-6-磷酸激酶(CJ_TAI_F4E)具有果糖-4-差向异构酶的活性。

具体实施方式

[0022] 以下具体地对本发明的内容进行说明。同时,本发明中公开的各说明和实施方案均可应用到其他说明和实施方案。此外,对本发明中公开的各种元素的组合落入本发明的范围。此外,本发明的范围不为以下的具体描述所限制。

[0023] 为达到本发明的目的,本发明在一方面提供一种用于制备塔格糖的组合物,其包含塔格糖-6-磷酸激酶、表达所述塔格糖-6-磷酸激酶的微生物或所述微生物的培养物。

[0024] 具体而言,所述组合物可包含一种或多种以下多肽:由SEQ ID NO:1、3、5、7、9或11的氨基酸序列组成的多肽。

[0025] 在一具体实施方案中,本发明的果糖-4-差向异构酶可为源自厌氧绳菌(*Anaerolinea* sp.)、嗜热双歧菌(*Thermobifida*)属、嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter*)属或网球菌(*Dictyoglomus*)属的酶或其变体。

[0026] 本发明的果糖-4-差向异构酶或其变体的特征在于,通过将D-果糖的第4碳位置差向异构化,将D-果糖转化成D-塔格糖。已揭示,本发明的塔格糖-6-磷酸激酶具有果糖-4-差

向异构酶的活性。已知塔格糖-6-磷酸激酶自D-塔格糖6-磷酸为底物产生D-塔格糖1,6-二磷酸。也就是说,本发明首次揭示了塔格糖-6-磷酸激酶具有果糖-4-差向异构酶的活性。因此,本发明的一实施方案涉及塔格糖-6-磷酸激酶的新用途,包括在自果糖制备塔格糖时将塔格糖-6-磷酸激酶用作果糖-4-差向异构酶。此外,本发明的另一实施方案涉及一种将塔格糖-6-磷酸激酶用作果糖-4-差向异构酶自果糖制备塔格糖的方法。

[0027] 在一具体实施方案中,转化的微生物可为大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_ANT_F4E(其另一名称为大肠杆菌BL21 (DE3) /pBT7-C-His-an1)、大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_AB_F4E或大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_DT_F4E。将这些微生物根据《布达佩斯条约》的规定,保藏于国际保藏单位韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms),保藏号分别为KCCM11996P(保藏日:2017年3月20日)、KCCM12093P(保藏日:2017年8月11日)和KCCM12109P(保藏日:2017年9月13日)。本发明中使用的果糖-4-差向异构酶可由编码所述果糖-4-差向异构酶的核酸来提供。

[0028] 如本文所用,术语“核酸”具有涵盖DNA或RNA分子的含义。

[0029] 可在本发明中使用的表达果糖-4-差向异构酶的微生物可为包含重组载体的微生物,其中所述重组载体包含所述核酸。

[0030] 可使用将包含编码所述酶的核酸的载体导入宿主细胞的方法获得用于本发明的表达果糖-4-差向异构酶的微生物。

[0031] 例如,可以以表达盒的形式将基因导入宿主细胞。通常,表达盒包括与基因可操作地连接的启动子(promoter)、转录终止信号、核糖体结合位点和翻译终止信号。表达盒的形式可以是可自我复制的表达载体。并且,可以将基因本身或多核苷酸构建体形式的基因导入宿主细胞中,并与在宿主细胞中表达所需的序列可操作地连接。

[0032] 本发明的微生物可以包括原核微生物或真核微生物,只要是能够通过导入本发明的核酸或重组载体制备本发明的果糖-4-差向异构酶的微生物即可。例如,所述微生物可以包括属于埃希氏菌(*Escherichia*)属、欧文氏菌(*Erwinia*)属、沙雷氏菌(*Serratia*)属、普罗威登斯菌(*Providencia*)属、棒状杆菌(*Corynebacterium*)属和短杆菌(*Brevibacterium*)属的菌株,具体地,可以为但不限于大肠杆菌(*E.coli*)或谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。所述微生物的具体实例可以包括大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_ANT_F4E,大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_AB_F4E,大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_DT_F4E,大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_ANTA_F4E,大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_TH_F4E或大肠杆菌BL21 (DE3) /CJ_TAI_F4E。

[0033] 本发明的微生物可以包括能够通过导入核酸或载体,或其他各种已知方法表达本发明的果糖-4-差向异构酶的任何微生物。

[0034] 本发明的微生物的培养物可以通过在培养基中培养能够表达本发明的塔格糖-6-磷酸激酶的微生物来制备。

[0035] 如本文所用,术语“培养”指允许微生物在控制得当的环境条件下生长。本发明的培养工艺可以根据本领域已知的适当的培养基和培养条件进行。根据所选择的菌株,本领域技术人员可以轻松地调整培养工艺。培养微生物的步骤可以通过但不特别限定于已知的分批工艺、连续工艺或补料分批工艺进行。关于培养条件,可以使用碱性化合物(例如,氢氧化钠,氢氧化钾或氨)或酸性化合物(例如,磷酸或硫酸)来调节恰当的pH(例如,pH为5至9,特别是pH为7至9),但不特别限定于此。此外,可以在培养过程中加入消泡剂,例如脂肪酸聚

乙二醇酯,以防止泡沫的产生。此外,可以在培养物中注入氧气或含有氧气的气体以保持培养物的有氧状态;也可以不注入气体或注入氮气,氢气或二氧化碳气体,以维持培养物的厌氧或微氧状态。培养温度可以维持在25℃至40℃,具体地,30℃至37℃,但不限于此。可以持续培养直至获得所需量的有用材料为止,具体地,可持续培养约0.5小时至约60小时,但不限于此。此外,使用的培养基可以包含糖和碳水化合物(例如葡萄糖,蔗糖,乳糖,果糖,麦芽糖,糖蜜,淀粉和纤维素)作为糖源,油脂(例如大豆油,向日葵油,花生油和椰子油),脂肪酸(例如棕榈酸,硬脂酸和亚油酸),醇(例如甘油和乙醇)和有机酸(例如乙酸)。这些物质可以单独或混合使用,但不限于此。氮源可以包括含氮有机化合物(例如蛋白胨,酵母提取物,肉提取物,麦芽提取物,玉米浆,豆粕和尿素)或无机化合物(例如硫酸铵,氯化铵,磷酸铵,碳酸铵和硝酸铵)。这些氮源也可以单独或混合使用,但不限于此。磷源可以包括磷酸二氢钾,磷酸氢二钾或其相应的钠盐。这些磷源也可以单独或混合使用,但不限于此。培养基可以包含必需的生长刺激剂,例如金属盐(例如,硫酸镁或硫酸铁),氨基酸和维生素。

[0036] 本发明的用于制备塔格糖的组合物可以进一步包含果糖。

[0037] 本发明的用于制备塔格糖的组合物可以包含塔格糖-6-磷酸激酶、表达塔格糖-6-磷酸激酶的微生物或所述微生物的培养物,所述塔格糖-6-磷酸激酶具有的果糖-4-差向异构化活性能直接将果糖转化成塔格糖。所述组合物特征在于不包含以果糖为底物的酶以外的其他酶。

[0038] 例如,本发明的用于制备塔格糖的组合物特征可以在于,不包含

[0039] 例如 α -葡聚糖磷酸化酶(α -glucan phosphorylase)、淀粉磷酸化酶(starch phosphorylase)、麦芽糊精磷酸化酶(maltodextrin phosphorylase)或蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase)、表达上述酶的微生物或所述微生物的培养物;

[0040] 葡萄糖激酶(glucokinase)、表达所述葡萄糖激酶的微生物或所述微生物的培养物;

[0041] 塔格糖-6-磷酸磷酸酶、表达所述塔格糖-6-磷酸磷酸酶的微生物或所述微生物的培养物;和/或

[0042] α -淀粉酶(α -amylase)、支链淀粉酶(pullulanase)、葡萄糖淀粉酶(glucoamylase)、蔗糖酶(sucrase)或异淀粉酶(isoamylase),表达所述淀粉酶、支链淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶或异淀粉酶的微生物;或表达所述淀粉酶、支链淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶或异淀粉酶的微生物的培养物。

[0043] 本发明的用于制备塔格糖的组合物可以进一步包含在用于制备塔格糖的相应组合物中通常使用的任何合适的赋形剂。赋形剂可包括例如防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂、等渗剂等,但不限于此。

[0044] 本发明的用于制备塔格糖的组合物可以进一步包含金属。在一实施方案中,本发明的金属可以是包含二价阳离子的金属。具体地,本发明的金属可以是镁,镍或锰(Mn)。更具体地,本发明的金属可以是金属离子或金属盐,更具体地,所述金属盐可以是 MgCl_2 , MgSO_4 , NiSO_4 , NiCl_2 , MnCl_2 或 MnSO_4 。

[0045] 本发明的又一方面提供了一种制备塔格糖的方法,其包括通过使果糖(D-fructose)与本发明的果糖-4-差向异构酶、表达所述果糖-4-差向异构酶的微生物或所述微生物的培养物接触,来将果糖转化为塔格糖。

[0046] 在一实施方案中,本发明的接触可以在pH 5.0至pH 9.0和温度为30℃至80℃的条件下进行和/或进行0.5小时至48小时。

[0047] 具体地,本发明的接触可以在pH 6.0至pH 9.0或pH 7.0至pH 9.0的条件下进行。此外,本发明的接触可以在35℃至80℃,40℃至80℃,45℃至80℃,50℃至80℃,55℃至80℃,60℃至80℃,30℃至70℃,35℃至70℃,40℃至70℃,45℃至70℃,50℃至70℃,55℃至70℃,60℃至70℃,30℃至65℃,35℃至65℃,40℃至65℃,45℃至65℃,50℃至65℃,55℃至65℃,30℃至60℃,35℃至60℃,40℃至60℃,45℃至60℃,50℃至60℃或55℃至60℃进行。此外,本发明的接触可以进行0.5小时至36小时,0.5小时至24小时,0.5小时至12小时,0.5小时至6小时,1小时至48小时,1小时至36小时,1小时至24小时,1小时至12小时,1小时至6小时,3小时至48小时,3小时至36小时,3小时至24小时,3小时至12小时,3小时至6小时,6小时至48小时,6小时至36小时,6小时至24小时,6小时至12小时,9小时至48小时,9小时至36小时,9小时至24小时,或9小时至12小时。

[0048] 在一实施方案中,本发明的接触可以在金属的存在下进行。

[0049] 在本发明的塔格糖的制备方法中,本发明的果糖-4-差向异构酶、表达果糖-4-差向异构酶的微生物、微生物的培养物、金属、金属离子和金属盐与上述实施方案相同。

[0050] 本发明的制备方法可以进一步包括分离和/或纯化所制备的塔格糖。分离和/或纯化的方法可以是本领域常用的方法。非限制性实例可包括透析、沉淀、吸附、电泳、离子交换层析、分级结晶等。纯化步骤可仅以一种方法进行,或者以两种或更多种方法进行。

[0051] 另外,本发明的制备方法可以进一步包括在分离和/或纯化步骤之前或之后进行脱色和/或脱盐的步骤。通过进行脱色和/或脱盐,可以获得质量更高的塔格糖。

[0052] 在又一实施方案中,本发明的制备方法在转化为本发明的塔格糖的步骤、进行分离和/或纯化的步骤或进行脱色和/或脱盐的步骤之后,可以进一步包括使塔格糖结晶的步骤。结晶可通过常用的结晶方法进行。例如,可以通过冷却结晶来进行结晶。

[0053] 在又一实施方案中,本发明的制备方法可进一步包括在结晶之前浓缩塔格糖的步骤。浓缩可以提高结晶效率。

[0054] 在又一实施方案中,本发明的制备方法还可进一步包括在分离和/或纯化之后,将未反应的果糖与本发明的酶、表达所述酶的微生物或所述微生物的培养物接触的步骤,以及在本发明的结晶步骤之后,于分离和/或纯化步骤中再使用已经从中分离出晶体的母液的步骤,或其组合。通过这些附加步骤,可以以较高的产率获得塔格糖,并且可以减少要丢弃的果糖的量,具有经济上的优势。

[0055] 在下文中,参照以下实施例更详细地描述本发明。然而,本发明的以下实施例仅为本发明的示例,并非旨在限制本发明的内容。对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施例旨在更详细地描述本发明,并且所附权利要求书所要求的本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0056] 实施例1:塔格糖-6-磷酸激酶的制备及其活性的评估

[0057] 实施例1-1:包含塔格糖-6-磷酸激酶基因的重组表达载体和转化子的制备

[0058] 为了提供一种新型的耐热果糖-4-差向异构酶,获得了源自两种嗜热厌氧绳菌(*Anaerolinea thermophila*)的塔格糖-6-磷酸激酶基因的信息,以制备可在大肠杆菌中表达的载体和转化后的微生物(转化子)。

[0059] 具体地,从登记在KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因和基因组百科全书)中的嗜热厌氧绳菌的核苷酸序列中,选取塔格糖-6-磷酸激酶的核苷酸序列,并且由Bioneer Corp.合成重组表达载体,重组表达载体基于嗜热厌氧绳菌的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和核苷酸序列(SEQ ID NO:2),与氨基酸序列(SEQ ID NO:7)和核苷酸序列(SEQ ID NO:8)插入可在大肠杆菌中表达的pBT7-C-His载体而制备。要使用重组表达载体,使用嗜热厌氧绳菌的基因组DNA和引物1:ATATACATATGATGTTCGGCTCGCCTGCTCCCCTGCTG(SEQ ID NO:13)和引物2:TGGTGCTCGAGCCCGCACGCCGCAGCGTAATCTTCCAG(SEQ ID NO:14),并在以下条件下进行PCR反应:进行94℃变性2分钟、94℃变性30秒、60℃退火30秒、72℃延伸2分钟的循环35次,然后在72℃延伸5分钟。

[0060] 为了诱导蛋白的表达,将每种载体转化到用于大肠杆菌表达的菌株BL21 (DE3)中,并分别命名为大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANT_F4E和大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANTA_F4E。依照《布达佩斯条约》的规定,大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANT_F4E和大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANTA_F4E分别于2017年3月20日以保藏号KCCM11996P,和于2018年3月23日保藏以保藏号KCCM12232P进行保藏。

[0061] 实施例1-2:重组酶的制备和纯化

[0062] 为了制备重组酶,将实施例1-1中制备的转化子大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANT_F4E和大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_ANTA_F4E分别接种到装有5mL含有氨苄青霉素(ampicillin)的LB液体培养基的培养管中。然后在37℃的振荡培养箱中进行种子培养,直至在600nm的吸光度达到2.0。将通过种子培养获得的每种培养物接种在含有液体培养基的培养瓶中,该液体培养基含有LB(Lysogeny broth,溶菌肉汤)和作为蛋白表达调节因子的乳糖,然后进行主培养。培养期间,震荡速度保持在180rpm,培养温度保持在37℃。将每种培养物在8,000rpm和4℃下离心20分钟以回收细胞。回收的细胞用50mM Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液洗涤两次,然后重悬于含有10mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0)缓冲液中。用超声仪破碎重悬的细胞。将细胞裂解液在13,000rpm和4℃下离心20分钟,仅取上清液。通过His-tag亲和层析法纯化每种上清液,并应用10倍柱体积的含有20mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0)缓冲液以除去非特异性结合的蛋白。接下来,进一步用含有250mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0)缓冲液进行洗脱。使用50mM Tris-HCl (pH8.0)缓冲液进行透析,以获得两种酶(CJ_ANT_F4E,CJ_ANTA_F4E)进行酶鉴定。结果,通过SDS-PAGE分析纯化的重组果糖-4-差向异构酶,证实CJ_ANT_F4E的分子量为约47kDa(图1)。

[0063] 实施例1-3:评估将果糖转化为塔格糖的活性

[0064] 为了测量实施例1-2中获得的酶的活性,使用30重量%的果糖,50mM Tris-HCl (pH 8.0),1mM CoSO₄,并在其中加入实施例1-2中纯化的酶20mg/mL,并使其在60℃下反应2小时。检测由果糖-4-差向异构酶CJ_ANT_F4E和CJ_ANTA_F4E转化的塔格糖的浓度以及从果糖到塔格糖的转化率,结果CJ_ANT_F4E的转化率为16.1%,CJ_ANTA_F4E的转化率为21.9%。转化率通过下式计算:转化率=塔格糖生成量/果糖底物的浓度×100。

[0065] 另外,通过HPLC对反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。使用Shodex Sugar SP0810柱,柱温为80℃,流动相为水,流速为1mL/min。图2和图10中的峰是通过HPLC层析检测定量得到的,表示以果糖为底物的酶反应。

[0066] 实施例1-4:温度对果糖-4-差向异构化活性的影响

[0067] 为了研究温度对本发明酶的差向异构化活性的影响,将实施例1-2中制备的每种纯化的酶1mg/mL加入到含有果糖的50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,并使其在50℃至80℃下反应3小时。通过HPLC对每种反应溶液中的塔格糖进行定量。结果,本发明的CJ_ANT_F4E酶在70℃下显示其最大活性(图3)。

[0068] 实施例2:塔格糖-6-磷酸激酶的制备及其活性的评估

[0069] 实施例2-1:包含塔格糖-6-磷酸激酶基因的重组表达载体和转化子的制备

[0070] 本发明人获得了源自厌氧绳菌细菌(*Anaerolineae bacterium*) (Taxon ID: 2654588098)的塔格糖-6-磷酸激酶基因的信息,并制备了可在大肠杆菌中表达的重组载体和转化后的微生物。

[0071] 更具体地,从登记在KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因和基因组百科全书)和ENA (European Nucleotide Archive) (欧洲核苷酸档案)中厌氧绳菌细菌的核苷酸序列中,选取塔格糖-6-磷酸激酶的核苷酸序列。并且基于源自厌氧绳菌细菌的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_AB_F4E的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)和核苷酸序列(SEQ ID NO:4),制备了包含所述酶的所述核苷酸序列且可在大肠杆菌中表达的重组表达载体pBT7-C-His-CJ_AB_F4E (Bioneer Corp.,韩国)。

[0072] 通过热激转化将重组载体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中 (Sambrook and Russell: Molecular cloning, 2001),并冷冻保存在50%甘油中。该转化子命名为大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_AB_F4E,并于2017年8月11日,根据《布达佩斯条约》的规定,保藏于国际保藏单位韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM),保藏号KCCM12093P。

[0073] 实施例2-2:重组酶的制备和纯化

[0074] 为了从实施例2-1中制备的转化子大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_AB_F4E获得本发明的重组酶,将该转化子接种在装有5mL含有氨苄青霉素抗生素的LB液体培养基的培养管中,然后在37℃的振荡培养箱中进行种子培养,直至在600nm的吸光度达到2.0。将通过种子培养获得的培养物接种在含有液体培养基的培养瓶中,该液体培养基含有LB和作为蛋白表达调节因子的乳糖,然后进行主培养。在180rpm和37℃的条件下进行种子培养和主培养。然后,将培养物在8,000rpm和4℃下离心20分钟以回收细胞。回收的细胞用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤两次,然后重悬于含有10mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) 缓冲液中。用超声仪破碎重悬的细胞。将细胞裂解液在13,000rpm和4℃下离心20分钟,仅提取上清液。通过His-tag亲和层析法纯化上清液,并应用10倍柱体积的含有20mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) 缓冲液以除去非特异性结合的蛋白。接下来,进一步用含有250mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) 缓冲液进行洗脱。使用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液进行透析,以获得纯化的酶CJ_AB_F4E用于酶鉴定。

[0075] 实施例2-3:评估重组酶将果糖转化为塔格糖的活性

[0076] 为了测量实施例2-2中获得的本发明的重组酶CJ_AB_F4E的活性,将50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM NiSO₄和20mg/mL的CJ_AB_F4E加入到30重量%的果糖中,使其在60℃下反应10小时。

[0077] 此外,通过HPLC为反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。使用Shodex Sugar SP0810柱,柱温为80℃,流动相为水,流速为1mL/min(图4)。结果,证实了通过本发明的酶将

果糖转化为塔格糖的转化率为5.1%。

[0078] 实施例2-4:检测随温度变化重组酶的活性

[0079] 为了检测温度对实施例2-2中制备的重组酶CJ_AB_F4E的果糖-4-差向异构化活性的影响,将1mg/mL的CJ_AB_F4E添加到含有10重量%果糖的50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,并在45℃,50℃,55℃,60℃和70℃的不同温度下反应3小时。通过HPLC对每种反应溶液中的塔格糖进行定量。

[0080] 结果,CJ_AB_F4E在65℃下显示其最大活性,并且CJ_AB_F4E在50℃至70℃下保持其最大活性的50%以上(图5)。

[0081] 实施例2-5:检测与金属离子的添加对应的重组酶的活性

[0082] 众所周知,已知的异构酶,例如葡萄糖异构酶和阿拉伯糖异构酶,以及差向异构酶,例如阿洛酮糖3-差向异构酶,需要金属离子。因此,检测了金属离子是否影响实施例2-2中制备的重组酶CJ_AB_F4E的果糖-4-差向异构化活性。

[0083] 更具体地,将2mg/mL的CJ_AB_F4E和每种1mM的各种金属离子NiSO₄,CaCl₂,ZnSO₄,MgSO₄,MnSO₄,FeSO₄,CuSO₄或(NH₄)₂SO₄添加到含有10重量%的果糖的50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,测量酶活性。将未经金属离子处理的组作为对照组。通过HPLC对每种反应溶液中的塔格糖进行定量。

[0084] 结果,添加MnSO₄或NiSO₄增加了本发明的CJ_AB_F4E的活性,表明CJ_AB_F4E需要金属离子,例如锰离子或镍离子。特别是,当添加NiSO₄时,CJ_AB_F4E表现出其最大活性(图6)。

[0085] 实施例3:塔格糖-6-磷酸激酶的制备及其活性的评估

[0086] 实施例3-1:包含塔格糖-6-磷酸激酶基因的重组载体和重组微生物的制备

[0087] 为了鉴定新型耐热果糖-4-差向异构酶,获得了源自嗜热网球菌(Dictyoglomus thermophilum)DSM 3960的塔格糖-6-磷酸激酶基因的信息,以制备可在大肠杆菌中表达的载体和转化后的微生物。

[0088] 具体地,从登记在KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因和基因组百科全书)中的嗜热网球菌的核苷酸序列中,选取塔格糖-6-磷酸激酶的核苷酸序列。并基于源自嗜热网球菌的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_DT_F4E的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)和核苷酸序列(SEQ ID NO:6),合成包含所述酶的核苷酸序列并可在大肠杆菌中表达的重组表达载体pBT7-C-His-CJ_DT_F4E(Bioneer Corp.,韩国)。

[0089] 通过热激转化将重组载体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中(Sambrook and Russell: Molecular cloning,2001)以制备重组微生物,然后将其冷冻保存在50%甘油中。所述重组微生物命名为大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_DT_F4E,并于2017年9月13日,根据《布达佩斯条约》的规定,保藏于国际保藏单位韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms,KCCM)中,保藏号KCCM12109P。

[0090] 实施例3-2:重组酶的制备和纯化

[0091] 为了从实施例3-1中制备的重组微生物大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_DT_F4E制备重组酶CJ_DT_F4E,将重组微生物接种到装有5mL含有氨苄青霉素抗生素的LB液体培养基的培养管中,然后在37℃的震荡培养箱中进行种子培养,直至在600nm的吸光度达到2.0。将通过种子培养获得的培养物接种到培养瓶中,然后进行主培养,所述培养瓶装含有LB和作为蛋白

表达调节因子的乳糖的液体培养基。在180rpm和37℃的条件下进行种子培养和主培养。然后,将培养物在8,000rpm和4℃下离心20分钟以回收细胞。回收的细胞用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤两次,并重悬在含有10mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH_2PO_4 (pH 8.0) 缓冲液中。用超声仪破碎重悬的细胞。将细胞裂解液在13,000rpm和4℃下离心20分钟,仅取上清液。通过His-tag亲和层析法纯化上清液,并应用10倍柱体积的含有20mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH_2PO_4 (pH8.0) 缓冲液以除去非特异性结合的蛋白。接下来,进一步用含有250mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH_2PO_4 (pH 8.0) 缓冲液进行洗脱。使用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液进行透析,以获得纯化的酶CJ_DT_F4E用于酶鉴定。

[0092] 实施例3-3:评估重组酶将果糖转化为塔格糖的活性

[0093] 为了测量实施例3-2中获得的重组酶CJ_DT_F4E的活性,将50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM MnSO_4 和5mg/mL的CJ_DT_F4E添加至30重量%的果糖中,并使其在60℃反应10小时。

[0094] 另外,通过HPLC对反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。使用Shodex Sugar SP0810柱,柱温为80℃,流动相为水,流速为1mL/min (图7)。

[0095] 结果,证实通过重组酶CJ_DT_F4E将果糖转化为塔格糖的转化率为2%。

[0096] 实施例3-4:检测与温度对应的重组酶活性

[0097] 为了检测温度对实施例3-2中获得的重组酶CJ_DT_F4E的果糖-4-差向异构化活性的影响,将5mg/mL的CJ_DT_F4E加入到含有5重量%果糖的50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,并使其在40℃, 50℃, 55℃, 60℃和70℃下反应5小时。通过HPLC对每种反应溶液中的塔格糖进行定量。

[0098] 结果,CJ_DT_F4E在60℃时显示出其最大活性,在50℃至70℃时显示其最大活性的80%或更多,而在55℃至70℃时显示其最大活性的95%或更多 (表1, 图8)。

[0099] 表1各温度下的相对活性 (%)

[0100]	分类	CJ_DT_F4E
	40℃	44.0
	50℃	80.3
	55℃	98.9
	60℃	100.0
	70℃	98.2

[0101] 实施例3-5:检测与金属的添加对应的重组酶活性

[0102] 检测金属是否影响实施例3-2中制备的重组酶CJ_DT_F4E的果糖-4-差向异构化活性。

[0103] 具体地,将5mg/mL的CJ_DT_F4E和1mM的金属离子 (MgSO_4 或 MnSO_4) 添加至含有5重量%的果糖的50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中,然后测量酶活性。将未经金属离子处理的组作为对照组 (w/o)。通过HPLC对每种反应溶液中的塔格糖进行定量。

[0104] 结果,添加 MnSO_4 或 MgSO_4 增加了CJ_DT_F4E的活性,表明锰离子或镁离子 (或其盐) 能够增加CJ_DT_F4E的果糖-4-差向异构化活性 (图9)。尤其是,证实了与对照组相比,通过添加 MnSO_4 ,CJ_DT_F4E的活性提高了约2.5倍或更多 (图9)。

[0105] 实施例4:塔格糖-6-磷酸激酶的制备及其活性的评估

[0106] 实施例4-1:包含塔格糖-6-磷酸激酶基因的重组载体和重组微生物的制备

[0107] 为了鉴定新型的耐热果糖-4-差向异构酶,获得了源自嗜热耐盐双歧菌(*Thermobifida halotolerans*)的塔格糖-6-磷酸激酶基因的信息,以制备可在大肠杆菌中表达的重组载体和转化后的重组微生物。

[0108] 具体地,从登记在KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因和基因组百科全书)中的嗜热耐盐双歧菌的核苷酸序列中,选取塔格糖-6-磷酸激酶的核苷酸序列,并基于源自嗜热耐盐双歧菌的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_TH_F4E的氨基酸序列(SEQ ID NO:9)和核苷酸序列(SEQ ID NO:10),合成包含所述酶的核苷酸序列并可在大肠杆菌中表达的重组表达载体pBT7-C-His-CJ_TH_F4E(Bioneer Corp.,韩国)。

[0109] 通过热激转化将重组载体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中(Sambrook and Russell: Molecular cloning, 2001) 以制备重组微生物,并冷冻保存在50%甘油中。该重组微生物命名为大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_TH_F4E,并于2018年3月23日,根据《布达佩斯条约》的规定,保藏于国际保藏单位韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM),保藏号KCCM12235P。

[0110] 实施例4-2:重组酶的制备和纯化

[0111] 为了从实施例4-1中制备的重组微生物大肠杆菌BL21 (DE3)/CJ_TH_F4E制备重组酶CJ_TH_F4E,将重组微生物接种到装有5mL含有氨苄青霉素抗生素的LB液体培养基的培养管中,然后在37℃的震荡培养箱中进行种子培养,直至在600nm的吸光度达到2.0。将通过种子培养获得的培养物接种到培养瓶中,然后进行主培养,所述培养瓶装含有LB和作为蛋白表达调节因子的乳糖的液体培养基。在180rpm和37℃的条件下进行种子培养和主培养。然后,将培养物在8,000rpm和4℃下离心20分钟以回收细胞。回收的细胞用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤两次,并重悬在含有10mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) 缓冲液中。用超声仪破碎重悬的细胞。将细胞裂解液在13,000rpm和4℃下离心20分钟,仅取上清液。通过His-tag亲和层析法纯化上清液,并应用10倍柱体积的含有20mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH8.0) 缓冲液以除去非特异性结合的蛋白。接下来,进一步用含有250mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) 缓冲液进行洗脱。使用50mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液进行透析,以获得纯化的酶CJ_TH_F4E用于酶鉴定。

[0112] 实施例4-3:评估重组酶将果糖转化为塔格糖的活性

[0113] 为了测量实施例4-2中获得的重组酶CJ_TH_F4E的活性,将50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM MnSO₄和4mg/mL的CJ_TH_F4E添加至1重量%的果糖中,并使其在55℃反应4小时。

[0114] 通过HPLC对反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。使用Shodex Sugar SP0810柱,柱温为80℃,流动相为水,流速为1mL/min(图11)。

[0115] 结果,证实通过重组酶CJ_TH_F4E将果糖转化为塔格糖的转化率为0.1%。

[0116] 实施例5:塔格糖-6-磷酸激酶的制备及其活性的评估

[0117] 实施例5-1:包含塔格糖-6-磷酸激酶基因的重组载体和重组微生物的制备

[0118] 为了鉴定新型的耐热果糖-4-差向异构酶,获得了源自*Thermoanaerobacter indiensis*的塔格糖-6-磷酸激酶基因的信息,以制备可在大肠杆菌中表达的重组载体和转化后的重组微生物。

[0119] 具体地,从登记在KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因

和基因组百科全书)中的*Thermoanaerobacter indiensis*的核苷酸序列中,选取塔格糖-6-磷酸激酶的核苷酸序列。基于源自*Thermoanaerobacter indiensis*的塔格糖-6-磷酸激酶CJ_TAI_F4E的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)和核苷酸序列(SEQ ID NO:12),合成包含所述酶的核苷酸序列并且可在大肠杆菌中表达的重组表达载体pBT7-C-His-CJ_TAI_F4E(Bioneer Corp.,韩国)。

[0120] 通过热激转化将重组载体转化到大肠杆菌BL21(DE3)中(Sambrook and Russell: Molecular cloning, 2001)以制备重组微生物,并冷冻保存在50%甘油中。该重组微生物命名为大肠杆菌BL21(DE3)/CJ_TAI_F4E,并于2018年3月23日,根据《布达佩斯条约》的规定,保藏于国际保藏单位韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)中,保藏号KCCM12236P。

[0121] 实施例5-2:重组酶的制备和纯化

[0122] 为了从实施例5-1中制备的重组微生物大肠杆菌BL21(DE3)/CJ_TAI_F4E制备重组酶CJ_TAI_F4E,将重组微生物接种到装有5mL含有氨苄青霉素抗生素的LB液体培养基的培养管中,然后在37℃的震荡培养箱中进行种子培养,直至在600nm的吸光度达到2.0。将通过种子培养获得的培养物接种到培养瓶中,然后进行主培养,所述培养瓶装含有含LB和作为蛋白表达调节因子的乳糖的液体培养基。在180rpm和37℃的条件下进行种子培养和主培养。然后,将培养物在8,000rpm和4℃下离心20分钟以回收细胞。回收的细胞用50mM Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液洗涤两次,并重悬在含有10mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄(pH 8.0)缓冲液中。用超声仪破碎重悬的细胞。将细胞裂解液在13,000rpm和4℃下离心20分钟,仅取上清液。通过His-tag亲和层析法纯化上清液,并用10倍柱体积的含有20mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄(pH 8.0)缓冲液以除去非特异性结合的蛋白。接下来,进一步用含有250mM咪唑和300mM NaCl的50mM NaH₂PO₄(pH 8.0)缓冲液进行洗脱。使用50mM Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液进行透析,以获得纯化的酶CJ_TAI_F4E用于酶鉴定。

[0123] 实施例5-3:评估重组酶将果糖转化为塔格糖的活性

[0124] 为了测量实施例5-2中获得的重组酶CJ_TAI_F4E的活性,将50mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM MnSO₄和5mg/mL的CJ_TAI_F4E加入到5重量%的果糖中,并使其在55℃反应10小时。

[0125] 通过HPLC对反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。通过HPLC对反应后残留的果糖和产物塔格糖进行定量。使用Shodex Sugar SP0810柱,柱温为80℃,流动相为水,流速为1mL/min(图12)。

[0126] 结果,证实使用重组酶CJ_TAI_F4E将果糖转化为塔格糖的转化率为8.7%。

[0127] 有益效果

[0128] 本发明的果糖-4-差向异构酶具有优异的耐热性,可以工业化制备塔格糖,并且以高收率将普通糖果糖转化为塔格糖,因此在经济上是可行的。

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 7 页，第 28 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2017 年 3 月 20 日	保藏号 KCCM11996P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0129]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 7 页，第 29 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2018 年 3 月 23 日	保藏号 KCCM12232P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0130]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 9 页，第 21 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2017 年 8 月 11 日	保藏号 KCCM12093P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0131]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 11 页，第 25 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2017 年 9 月 13 日	保藏号 KCCM12109P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0132]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 14 页，第 5 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2018 年 3 月 23 日	保藏号 KCCM12235P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0133]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月, 2004 年 1 月再版)

申请人或代理人档案号 P18-6046	国际申请号
---------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A.对说明书第 15 页，第 19 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称 KCCM 韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔 120-091 西大门区弘济内 2 街 45 号柳林大厦	
保藏日期 2018 年 3 月 23 日	保藏号 KCCM12236P
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

[0134]

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表(1998 年 7 月,2004 年 1 月再版)

[0001]	序列表
[0002]	<110> CJ第一制糖株式会社
[0003]	<120> 用于制备塔格糖的组合物和利用其制备塔格糖的方法
[0004]	<130> OPA18379
[0005]	<150> KR 17/0042166
[0006]	<151> 2017-03-31
[0007]	<150> KR 17/0111494
[0008]	<151> 2017-08-31
[0009]	<150> KR 17/0158766
[0010]	<151> 2017-11-24
[0011]	<160> 14
[0012]	<170> KoPatentIn 3.0
[0013]	<210> 1
[0014]	<211> 425
[0015]	<212> PRT
[0016]	<213> Artificial Sequence
[0017]	<220>
[0018]	<223> An amino acid sequence of Tagatose-6-phosphate kinase, CJ_ANT_F4E
[0019]	derived from Anaerolinea thermophila
[0020]	<400> 1
[0021]	Met Thr Ala Ile Leu Glu Asn Leu Ala Ala Ala Arg Arg Ala Gly Lys
[0022]	1 5 10 15
[0023]	Pro Ala Gly Ile Thr Ser Val Cys Ser Ala His Pro Val Val Leu Arg
[0024]	20 25 30
[0025]	Ala Ala Ile Arg Arg Ala Ala Ala Ser Gln Thr Ala Val Leu Ile Glu
[0026]	35 40 45
[0027]	Ala Thr Cys Asn Gln Val Asn His Leu Gly Gly Tyr Thr Gly Met Thr
[0028]	50 55 60
[0029]	Pro Arg Asp Phe Val Ala Phe Val Asn Ser Ile Ala Ala Glu Glu Gly
[0030]	65 70 75 80
[0031]	Leu Pro Ala Glu Leu Leu Ile Phe Gly Gly Asp His Leu Gly Pro Asn
[0032]	85 90 95
[0033]	Pro Trp Arg Arg Glu Lys Ala Glu Asp Ala Leu Thr Lys Ala Ala Ala
[0034]	100 105 110
[0035]	Met Val Asp Ala Tyr Val Thr Ala Gly Phe Arg Lys Ile His Leu Asp
[0036]	115 120 125
[0037]	Ala Ser Met Gly Cys Ala Gly Glu Pro Ala Ala Leu Asp Asp Val Thr
[0038]	130 135 140
[0039]	Ile Ala His Arg Ala Ala Lys Leu Thr Ala Val Ala Glu Lys Ala Ala
[0040]	145 150 155 160
[0041]	Thr Glu Ala Gly Leu Pro Lys Pro Leu Tyr Ile Leu Gly Thr Glu Val

[0042]	165	170	175
[0043]	Pro Val Pro Gly Gly Ala Asp His Val Leu Glu Thr Val Ala Pro Thr		
[0044]	180	185	190
[0045]	Glu Pro Gln Ala Ala Arg Asn Thr Ile Asp Leu His Arg Glu Ile Phe		
[0046]	195	200	205
[0047]	Ala Gln His Gly Leu Ser Asp Ala Phe Glu Arg Val Ile Ala Phe Val		
[0048]	210	215	220
[0049]	Val Gln Pro Gly Val Glu Phe Gly Ser Asp Asn Val Val Ala Tyr Asp		
[0050]	225	230	235
[0051]	Pro Gln Ala Ala Gln Ser Leu Ser Ala Val Leu Asp Gly Glu Pro Arg		
[0052]	245	250	255
[0053]	Leu Val Phe Glu Ala His Ser Thr Asp Tyr Gln Thr Glu Pro Ala Leu		
[0054]	260	265	270
[0055]	Ala Ala Leu Val Arg Asp Gly Tyr Pro Ile Leu Lys Val Gly Pro Gly		
[0056]	275	280	285
[0057]	Leu Thr Phe Ala Tyr Arg Glu Ala Leu Tyr Ala Leu Asp Met Ile Ala		
[0058]	290	295	300
[0059]	Ser Glu Met Val Gly Thr Tyr Gly Asp Arg Pro Leu Ala Arg Thr Met		
[0060]	305	310	315
[0061]	Glu Lys Leu Met Leu Ser Ala Pro Gly Asp Trp Gln Gly His Tyr His		
[0062]	325	330	335
[0063]	Gly Asp Asp Ile Thr Leu Arg Leu Gln Arg His Tyr Ser Tyr Ser Asp		
[0064]	340	345	350
[0065]	Arg Ile Arg Tyr Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Ala Leu Ala Ala Val Ser		
[0066]	355	360	365
[0067]	Thr Leu His Lys Ala Leu Asp Gly Lys Thr Ile Pro Glu Thr Leu Leu		
[0068]	370	375	380
[0069]	Arg Gln Tyr Leu Gly Glu Leu Pro Leu Ala Ala Val Ala Gly Lys Glu		
[0070]	385	390	395
[0071]	Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Val Asp Gln Val Leu Ala Thr Tyr		
[0072]	405	410	415
[0073]	His Ala Ala Thr Gly Glu Gly Arg His		
[0074]	420	425	
[0075]	<210> 2		
[0076]	<211> 1278		
[0077]	<212> DNA		
[0078]	<213> Artificial Sequence		
[0079]	<220>		
[0080]	<223> DNA sequence of Tagatose-6-phosphate kinase, CJ_ANT_F4E derived		
[0081]	from Anaerolinea thermophila		
[0082]	<400> 2		
[0083]	atgaccgccca ttttgaaaaa tctcgccgcc gcgcgccgcg ccggcaaacc tgcgggcac 60		

[0084]	acttcggtct gctcggccca ccccgttgtc ctgcgcgcgc caatccgccg cgccgccgcc	120
[0085]	agtcaaacgg ccgtactgat cgaggccacc tgcaatcagg tcaatcatct cgggtggttat	180
[0086]	accggcatga caccgcgtga cttcgttgcc ttcgtcaaca gcatcgccgc ggaagaagga	240
[0087]	ctgcccgcgc aactgctgat ctttggcgcg gatcatctcg gcccgaatcc ctggcgcagg	300
[0088]	gagaaggccg aggacgcgt gacaaaagcc gccgccatgg tcgacgccta tgtcacagct	360
[0089]	ggttttcgca agatccacct tgatgcatcg atgggctgcg ccggtgagcc ggcagccctg	420
[0090]	gatgacgtca ccatgcccca ccgcgcgcgc aaactcacag ccgttgccga aaaggcagcc	480
[0091]	actgaggtcg gcctgccaaa accgctttat attctgggca ccgaagtgc ggtgcccgcc	540
[0092]	ggtgccgacc atgtgcttga gaccgtcgca ccgaccgaac cgcaggcggc gcgcaacacc	600
[0093]	atcgatcttc atcgcgaaat ctttgccgag cacggtcttt ccgatgcgtt cgaacgggtc	660
[0094]	atcgcttttg tcgtgcagcc ggggtgtggaa ttgcgcagcg acaatgtcgt cgcttatgat	720
[0095]	ccgcaggcag cgcagagcct gagcgccgtg ctggatggcg aaccgcgact ggtcttcgaa	780
[0096]	gcccattcga ccgattacca gaccgagcct gcccttgccg cactggtacg cgacggatat	840
[0097]	ccgatcctca aagttggacc gggcctcacc ttgccttacc gggaagcgt ttatgcactc	900
[0098]	gacatgatcg cctccgaaat ggtcggcacc tatggcgacc gaccgctggc gcgactatg	960
[0099]	gaaaaattga tgtaagcgc gccggcgac tggcagggcc attaccatgg cgacgacatc	1020
[0100]	acgtccgat tgcaacgcca ttacagctac agcgaccgca tccgttacta ctggacgcga	1080
[0101]	ccggaagcgc tcgcggccgt ttccaccttg cataaggcac tggatgggaa gacaattccc	1140
[0102]	gaaaccctgc tgcgccaata tctcggcgaa ttgccgctcg cggcggttgc gggaaaggaa	1200
[0103]	ccggaggagg ttctggtcgc ggcggtggat caggtgctgg cgacctatca cgcggcgacg	1260
[0104]	ggcgaaggcc gccactga	1278
[0105]	<210>	3
[0106]	<211>	443
[0107]	<212>	PRT
[0108]	<213>	Artificial Sequence
[0109]	<220>	
[0110]	<223>	Amino acids sequences of Tagatose-6-phosphate kinase, CJ_AB_F4E
[0111]	derived from Anaerolineae bacterium	
[0112]	<400>	3
[0113]	Met Thr Arg Asn Ser Pro Leu Ser Glu Val Ile Ala Ala Gln Lys Arg	
[0114]	1 5 10 15	
[0115]	Gly Glu Ser Arg Gly Ile Ala Ser Ile Cys Ser Ala Asn Pro Trp Val	
[0116]	20 25 30	
[0117]	Ile Glu Ala Met Leu Gln Gln Ala Arg Ala Thr Gly Glu Pro Val Leu	
[0118]	35 40 45	
[0119]	Ile Glu Ser Thr Cys Asn Gln Val Asn Gln Phe Gly Gly Tyr Thr Gly	
[0120]	50 55 60	
[0121]	Trp Thr Pro Asp Gln Phe Met Ala Tyr Leu Arg Asp Leu Ala Pro Arg	
[0122]	65 70 75 80	
[0123]	Gln Glu Phe Pro Phe Asp His Ile Ile Val Gly Gly Asp His Leu Gly	
[0124]	85 90 95	
[0125]	Pro Ser Pro Trp Gln Asp Glu Pro Ala Ala Ile Ala Met Asp Lys Ala	

[0126]	100	105	110
[0127]	Lys Ile Leu Ile Arg Asp Cys Val Arg Ala Gly Tyr Thr Lys Ile His		
[0128]	115	120	125
[0129]	Leu Asp Ala Ser Met Lys Cys Ala Asp Asp Asp Pro His Arg Pro Leu		
[0130]	130	135	140
[0131]	Asp Thr Arg Ile Ser Ala Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Gln Val Ala		
[0132]	145	150	155
[0133]	Glu Lys Ala Phe Ser Glu His Pro Pro Gly Gly Ala Pro Pro Tyr Tyr		
[0134]	165	170	175
[0135]	Val Ile Gly Thr Glu Val Pro Leu Pro Gly Gly Val Gln Glu Gln Glu		
[0136]	180	185	190
[0137]	Glu Gly Leu Ser Val Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Gly Thr Ile Glu		
[0138]	195	200	205
[0139]	Ser Thr Lys Glu Ala Phe Phe Ala Arg Gly Leu Glu Arg Ala Trp Glu		
[0140]	210	215	220
[0141]	Arg Val Ile Ala Val Val Val Gln Pro Gly Val Glu Tyr Gly Asp Ala		
[0142]	225	230	235
[0143]	Thr Leu Phe Glu Tyr Asp Arg Ala Arg Ala Ala Asp Leu Ala Arg Phe		
[0144]	245	250	255
[0145]	Ile Glu Gly Tyr Asp Gly Leu Ile Tyr Glu Ala His Ser Thr Asp Tyr		
[0146]	260	265	270
[0147]	Gln Leu Ala Glu Ala Leu Arg Gln Leu Val Glu Asp His Phe Ala Ile		
[0148]	275	280	285
[0149]	Leu Lys Val Gly Pro Ala Leu Thr Phe Ser Phe Arg Glu Gly Val Phe		
[0150]	290	295	300
[0151]	Ala Leu Ala Ala Ile Glu Glu Glu Leu Leu Ala Gly Arg Gln Asp Val		
[0152]	305	310	315
[0153]	Glu Pro Ser Arg Val Arg Glu Val Leu Asp Lys Thr Met Leu Ala Asn		
[0154]	325	330	335
[0155]	Pro Ile Tyr Trp Gln Lys Tyr Tyr Gln Gly Asp Asp Gln Ala Val His		
[0156]	340	345	350
[0157]	Leu Lys Arg Lys Tyr Ser Phe Ser Asp Arg Ser Arg Tyr Tyr Trp Pro		
[0158]	355	360	365
[0159]	Val Pro Glu Val Gln Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ile Gln Asn Leu Gly		
[0160]	370	375	380
[0161]	Glu Gln Pro Leu Pro Leu Thr Leu Leu Ser Gln Tyr Leu Pro Val Gln		
[0162]	385	390	395
[0163]	Tyr Ala Arg Ile Arg Gly Gly Glu Ile Ala Asn Val Pro Arg Ala Ile		
[0164]	405	410	415
[0165]	Leu Leu Asp Lys Val Arg Ser Val Leu Ser Asp Tyr Ser Tyr Ala Cys		
[0166]	420	425	430
[0167]	Gly Tyr Leu Thr Gly Pro Ala Arg Arg Asn Arg		

[0168]	435	440
[0169]	<210> 4	
[0170]	<211> 1332	
[0171]	<212> DNA	
[0172]	<213> Artificial Sequence	
[0173]	<220>	
[0174]	<223> DNA sequences of Tagatose-6-phosphate kinase, CJ_AB_F4E derived	
[0175]	from Anaerolineae bacterium	
[0176]	<400> 4	
[0177]	atgactcgga actcgccctt atcagaggtg atcgtgccc agaaacgcgg cgagagcaga	60
[0178]	gggatcgctt ccatatgctc ggccaatccc tgggtcatcg aggccatgct gcaacaggcc	120
[0179]	cgcgcgaccg gcgaacctgt cctgatcgag tcgacctgca accaggtcaa tcaattcggc	180
[0180]	ggctacaccg gttggacgcc ggatcaattc atggcctatc ttcgagattt ggcgccccgg	240
[0181]	caagaatttc cctttgacca catcatcgtc ggcgcgcatc atctcgggcc tagcccctgg	300
[0182]	caagacgagc cggcccgcat agcgatggat aaggccaaga tcctgatccg ggattgcgtc	360
[0183]	cgggcagggt acaccaagat tcacctggac gccagcatga agtgcgccga cgacgatccc	420
[0184]	catcgccgcg tagataccag gatattctcg gcccgggcgg ccgagctggc ccaggtggcc	480
[0185]	gaaaaagcat tctccgagca cccaccaggc ggtgcgccgc cttattatgt gatcggcacc	540
[0186]	gaggtgccct tgcccgggtg gggttcaggaa caggaggagg gattgagtgt taccagtata	600
[0187]	ggcgacgtgg ccggaacct tgaatcgacc aaagaagcct tttttgcacg aggcttagaa	660
[0188]	agggtctggg aacgggtcat agccgtcgtg gtgcaaccgc gcgtggagta tggatgatcc	720
[0189]	acgttatttg aatatgatcg ggctcggcgc gccgatctgg cccgatttat cgaaggttat	780
[0190]	gatggcttga tatacgaagc gcattccact gattatcagt tagctgaggc actccggcag	840
[0191]	ttggtagaag atcatttcgc catcttgaag gtggggccag cgctaacatt ttcatttcgg	900
[0192]	gagggggttt ttgccctggc tgccatagaa gaggagctgt tggccggcgc acaggatgtc	960
[0193]	gaaccgtcac ggtgcgcga agttctggat aagaccatgt tggctaatac aatctactgg	1020
[0194]	cagaagtatt atcagggaga tgaccaggcc gtacatttga aaaggaaata tagttttagt	1080
[0195]	gaccgttccc gatactattg gccggttccc gaggtgcaat tttctttgtc ccgactaatt	1140
[0196]	caaaatttgg gagagcagcc gctgcctcta acgctcttaa gccaatacct gccggtccaa	1200
[0197]	tacggccgaa tcagaggtgg cgaaatagcc aatgttcccc gggcgatcct cttggataag	1260
[0198]	gtcagaagcg tactctctga ttactcatat gcatcggtt atctgaccgg ccctgctaga	1320
[0199]	agaaaccgct ga 1332	
[0200]	<210> 5	
[0201]	<211> 408	
[0202]	<212> PRT	
[0203]	<213> Artificial Sequence	
[0204]	<220>	
[0205]	<223> An amino acid sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_DT_F4E	
[0206]	derived from Dictyoglomus thermophilum	
[0207]	<400> 5	
[0208]	Met Trp Leu Ser Lys Asp Tyr Leu Arg Lys Lys Gly Val Tyr Ser Ile	
[0209]	1	5 10 15

[0210]	Cys Ser Ser Asn Pro Tyr Val Ile Glu Ala Ser Val Glu Phe Ala Lys
[0211]	20 25 30
[0212]	Glu Lys Asn Asp Tyr Ile Leu Ile Glu Ala Thr Pro His Gln Ile Asn
[0213]	35 40 45
[0214]	Gln Phe Gly Gly Tyr Ser Gly Met Thr Pro Glu Asp Phe Lys Asn Phe
[0215]	50 55 60
[0216]	Val Met Gly Ile Ile Lys Glu Lys Gly Ile Glu Glu Asp Arg Val Ile
[0217]	65 70 75 80
[0218]	Leu Gly Gly Asp His Leu Gly Pro Leu Pro Trp Gln Asp Glu Pro Ser
[0219]	85 90 95
[0220]	Ser Ser Ala Met Lys Lys Ala Lys Asp Leu Ile Arg Ala Phe Val Glu
[0221]	100 105 110
[0222]	Ser Gly Tyr Lys Lys Ile His Leu Asp Cys Ser Met Ser Leu Ser Asp
[0223]	115 120 125
[0224]	Asp Pro Val Val Leu Ser Pro Glu Lys Ile Ala Glu Arg Glu Arg Glu
[0225]	130 135 140
[0226]	Leu Leu Glu Val Ala Glu Glu Thr Ala Arg Lys Tyr Asn Phe Gln Pro
[0227]	145 150 155 160
[0228]	Val Tyr Val Val Gly Thr Asp Val Pro Val Ala Gly Gly Gly Glu Glu
[0229]	165 170 175
[0230]	Glu Gly Ile Thr Ser Val Glu Asp Phe Arg Val Ala Ile Ser Ser Leu
[0231]	180 185 190
[0232]	Lys Lys Tyr Phe Glu Asp Val Pro Arg Ile Trp Asp Arg Ile Ile Gly
[0233]	195 200 205
[0234]	Phe Val Ile Met Leu Gly Ile Gly Phe Asn Tyr Glu Lys Val Phe Glu
[0235]	210 215 220
[0236]	Tyr Asp Arg Ile Lys Val Arg Lys Ile Leu Glu Glu Val Lys Lys Glu
[0237]	225 230 235 240
[0238]	Asn Leu Phe Val Glu Gly His Ser Thr Asp Tyr Gln Thr Lys Arg Ala
[0239]	245 250 255
[0240]	Leu Arg Asp Met Val Glu Asp Gly Val Arg Ile Leu Lys Val Gly Pro
[0241]	260 265 270
[0242]	Ala Leu Thr Ala Ser Phe Arg Arg Gly Val Phe Leu Leu Ser Ser Ile
[0243]	275 280 285
[0244]	Glu Asp Glu Leu Ile Ser Glu Asp Lys Arg Ser Asn Ile Lys Lys Val
[0245]	290 295 300
[0246]	Val Leu Glu Thr Met Leu Lys Asp Asp Lys Tyr Trp Arg Lys Tyr Tyr
[0247]	305 310 315 320
[0248]	Lys Asp Ser Glu Arg Leu Glu Leu Asp Ile Trp Tyr Asn Leu Leu Asp
[0249]	325 330 335
[0250]	Arg Ile Arg Tyr Tyr Trp Glu Tyr Lys Glu Ile Lys Ile Ala Leu Asn
[0251]	340 345 350

[0252]	Arg Leu Phe Glu Asn Phe Ser Glu Gly Val Asp Ile Arg Tyr Ile Tyr
[0253]	355 360 365
[0254]	Gln Tyr Phe Tyr Asp Ser Tyr Phe Lys Val Arg Glu Gly Lys Ile Arg
[0255]	370 375 380
[0256]	Asn Asp Pro Arg Glu Leu Ile Lys Asn Glu Ile Lys Lys Val Leu Glu
[0257]	385 390 395 400
[0258]	Asp Tyr His Tyr Ala Val Asn Leu
[0259]	405
[0260]	<210> 6
[0261]	<211> 1227
[0262]	<212> DNA
[0263]	<213> Artificial Sequence
[0264]	<220>
[0265]	<223> DNA sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_DT_F4E derived
[0266]	from Dictyoglomus thermophilum
[0267]	<400> 6
[0268]	atgtggctta gtaaagatta tttgagaaaa aaggagagttt attctatatg tagctccta 60
[0269]	ccatatgtga ttgaggcaag tgttgaattt gctaaggaga agaagatta tattttaatt 120
[0270]	gaggcgacac ctcatcagat aaaccagttt ggtggatatt caggatatgac tcccgaagat 180
[0271]	tttaaaaact ttgtaatggg aataataaaa gaaaaggga tagaagagga tagggtgatt 240
[0272]	cttggagggg accatttagg ccctctccct tggcaagatg aaccttcttc ttctgcaatg 300
[0273]	aaaaaggcaa aagaccttat aagggccttt gtggagagtg gttataagaa gatacacctt 360
[0274]	gattgtagta tgtctctttc tgatgatcct gtagtgctct ctcccagaa gatagcagaa 420
[0275]	aggagagagg aacttcttga ggttgagaa gagactgcta gaaagtacaa ttttcagcct 480
[0276]	gtgtatgtgg tgggaactga tgtaccgta gctggaggag gcgaagagga aggtattacc 540
[0277]	tcagtggagg attttagagt agcaatctcc tctttaaaaa aatattttga ggatgttcca 600
[0278]	aggatatggg ataggataat tggttttgta ataatgcttg gtatagggtt taattatgaa 660
[0279]	aaagtgtttg agtatgacag gattaagggt agaaaaattt tagaggaggt aaagaaagag 720
[0280]	aatctttttg ttgaaggta ctctactgac tatcagacaa aacgtgcatt gagagatatg 780
[0281]	gtagaggatg gagtaagaat tcttaagggt ggtcctgctt taacagcaag ttttagaagg 840
[0282]	ggagtatttt tattaagtag cattgaggat gagcttatat cggaagataa aaggtccta 900
[0283]	attaagaaag ttgtgcttga gactatgtta aaagatgata aatattggag aaagtattat 960
[0284]	aaggattcag aaagattaga attagatatt tggtaacaact tacttgatag gattagatat 1020
[0285]	tattgggaat ataaagagat aaaaatagct ttaaataaggc tttttgaaaa tttttcgaa 1080
[0286]	ggggttgata ttagatacat ctatcaatat ttttatgatt cgtattttaa agtaagagaa 1140
[0287]	ggaaaaataa gaaatgatcc aaggagagta ataaagaatg aaataaagaa ggtccttgag 1200
[0288]	gactatcact atgctgtaaa cttataa 1227
[0289]	<210> 7
[0290]	<211> 429
[0291]	<212> PRT
[0292]	<213> Artificial Sequence
[0293]	<220>

[0294] <223> An amino acid sequence of tagatose-6-phosphate kinase,
 [0295] CJ_ANTA_F4E derived from Anaerolinea thermophila
 [0296] <400> 7
 [0297] Met Met Phe Gly Ser Pro Ala Pro Leu Leu Asp Met Val Thr Ala Gln
 [0298] 1 5 10 15
 [0299] Lys Gln Gly Met Ala Arg Gly Ile Pro Ser Ile Cys Ser Ala His Pro
 [0300] 20 25 30
 [0301] Val Val Leu Ser Ala Ala Cys His Leu Ala Arg Arg Ser Gly Ala Pro
 [0302] 35 40 45
 [0303] Leu Leu Ile Glu Thr Thr Cys Asn Gln Val Asn His Gln Gly Gly Tyr
 [0304] 50 55 60
 [0305] Ser Gly Met Thr Pro Ala Asp Phe Val Arg Phe Leu Arg Glu Ile Leu
 [0306] 65 70 75 80
 [0307] Glu Arg Glu Gly Ile Pro Pro Gln Gln Val Ile Leu Gly Gly Asp His
 [0308] 85 90 95
 [0309] Leu Gly Pro Tyr Pro Trp Arg Lys Glu Pro Ala Glu Thr Ala Ile Ala
 [0310] 100 105 110
 [0311] Gln Ala Leu Glu Met Val Arg Ala Tyr Val Gln Ala Gly Tyr Thr Lys
 [0312] 115 120 125
 [0313] Ile His Leu Asp Ala Ser Met Pro Cys Ala Asp Asp Asp Pro Glu Arg
 [0314] 130 135 140
 [0315] Pro Leu Pro Leu Glu Arg Ile Ala Arg Arg Ala Ala Gln Leu Cys Ala
 [0316] 145 150 155 160
 [0317] Ala Ala Glu Ala Ala Ala Gly Ala Val Gln Pro Val Tyr Val Ile Gly
 [0318] 165 170 175
 [0319] Ser Glu Val Pro Pro Pro Gly Gly Ala Gln Gly Gln Glu Ala Arg Leu
 [0320] 180 185 190
 [0321] His Val Thr Thr Pro Gln Glu Ala Gln Ala Ala Leu Asp Ala Phe Arg
 [0322] 195 200 205
 [0323] Glu Ala Phe Leu Gln Ala Gly Leu Thr Pro Val Trp Glu Arg Val Ile
 [0324] 210 215 220
 [0325] Ala Leu Val Val Gln Pro Gly Val Glu Phe Gly Val Asp Ser Ile His
 [0326] 225 230 235 240
 [0327] Ala Tyr Gln Arg Glu Ala Ala Arg Pro Leu Lys Thr Phe Ile Glu Gly
 [0328] 245 250 255
 [0329] Val Pro Gly Met Val Tyr Glu Ala His Ser Thr Asp Tyr Gln Thr Arg
 [0330] 260 265 270
 [0331] Ala Ser Leu Arg Ala Leu Val Glu Asp His Phe Ser Ile Leu Lys Val
 [0332] 275 280 285
 [0333] Gly Pro Ala Leu Thr Phe Ala Tyr Arg Glu Ala Val Phe Ala Leu Glu
 [0334] 290 295 300
 [0335] His Ile Glu Arg Glu Ile Leu Gly Arg Gln Asp Met Pro Leu Ser Arg

[0336]	305	310	315	320
[0337]	Leu Ser Glu Val	Leu Asp Glu Val	Met Leu Asn Asp	Pro Arg His Trp
[0338]		325	330	335
[0339]	Gln Gly Tyr Phe	Ala Gly Ala Pro	Ala Glu Gln Ala	Leu Ala Arg Arg
[0340]		340	345	350
[0341]	Tyr Ser Phe Ser	Asp Arg Ile Arg	Tyr Tyr Trp His	His Pro Ala Ala
[0342]		355	360	365
[0343]	Gln Glu Ala Val	Arg Arg Leu Leu	Ala Asn Leu Ile	Glu Thr Pro Pro
[0344]		370	375	380
[0345]	Pro Leu Ser Leu	Leu Ser Gln Tyr	Leu Pro Arg Glu	Tyr Glu Met Val
[0346]	385	390	395	400
[0347]	Arg Ala Gly Glu	Ile Ser Ser His	Pro Gln Asp Leu	Ile Arg Ala His
[0348]		405	410	415
[0349]	Ile Gln His Thr	Leu Glu Asp Tyr	Ala Ala Ala Cys	Gly
[0350]		420	425	
[0351]	<210> 8			
[0352]	<211> 1290			
[0353]	<212> DNA			
[0354]	<213> Artificial Sequence			
[0355]	<220>			
[0356]	<223> DNA sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_ANTAF4E derived			
[0357]	from Anaerolinea thermophila			
[0358]	<400> 8			
[0359]	atgatgttcg gctcgctgc	tccctgctg gatatggtca	ccgcgcagaa acagggcattg	60
[0360]	gcgcggggta tcccatccat	ttgttcggca catccggtgg	tgttgagtgc cgcctgccat	120
[0361]	cttgcccgcc ggagcggcgc	gcccctgtc atcgaaacca	cctgcaatca ggtcaaccac	180
[0362]	caaggtgggt acagcggcat	gacccccgc gattttgtcc	gctttctgcg cgaaattctg	240
[0363]	gaacgggaag gtattcccc	gcaacaggtc atcctgggcg	gggatcacct gggtccttac	300
[0364]	ccctggcgga aagagcctgc	cgaaaccgcc atagcacaag	cgttggaat ggtgcgggca	360
[0365]	tacgtgcagg caggctacac	caaaattcat ctggacgctt	ccatgccctg cgccgatgac	420
[0366]	gaccccgagc gtccccctgc	gctggagcgc atagcccgac	gggcggcgca gttgtgcgcc	480
[0367]	gccgccgaag ccgcccggg	agcggttcag ccggtgtacg	taattggcag tgaggtgccc	540
[0368]	ccgcccgcg gcgcgcagg	tcaggaggca agacttcacg	tcaccactcc gcaggaagcc	600
[0369]	caagccgcgc tggatgcctt	tcgggaagcc tttctgcagg	caggcttgac tcccgtttgg	660
[0370]	gagcgggtca ttgcgtggt	agtccagccg ggggtggagt	ttggcgtgga cagcattcac	720
[0371]	gcctatcagc gcgaagccgc	ccgcccgctg aagacctca	tcgaggcgct gcccgcatg	780
[0372]	gtgtatgaag ccactcgac	cgattaccag acccgctcct	ccctgcgtgc gctggtgga	840
[0373]	gaccactttt ccattctcaa	ggttggtccg gactaacct	ttgcctaccg cgaagccgtg	900
[0374]	ttcgccctgg aacacatga	acgggaata ttgggcaggc	aggatatgcc tctctccgc	960
[0375]	ctgagtgaag tcctcgacga	ggtgatgctg aacgatccac	gccactggca gggatacttt	1020
[0376]	gccggcgctc ccgccgaaca	ggcgctggcg cgccgtaca	gtttcagcga ccgcattcgc	1080
[0377]	tattactggc accatcccgc	cgcgaggaa gccgtgcgga	gactgctcgc caacctgatc	1140

[0378] gaaacccccgc cgccgctgag tttgctcagc cagtacctgc cgcgcgagta tgagatgggtg 1200
 [0379] cgcgcggggg aaatctccag ccacccgcag gacctgattc gggcacatat ccagcacacg 1260
 [0380] ctggaagatt acgctgcggc gtgcgggtaa 1290
 [0381] <210> 9
 [0382] <211> 394
 [0383] <212> PRT
 [0384] <213> Artificial Sequence
 [0385] <220>
 [0386] <223> An amino acid sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_TH_F4E
 [0387] derived from Thermobifida halotolerans
 [0388] <400> 9
 [0389] Met Ser Val Ile Pro Lys Glu Thr Gly Val Ser Pro Ser Arg Leu Asn
 [0390] 1 5 10 15
 [0391] Val Pro Ser Arg Leu Gly Val Gly Pro Met Ser Lys Asn Ala Val Asp
 [0392] 20 25 30
 [0393] Ala Ala Ile Ser Val Ala Ala Arg Ala Asp Gln Pro Leu Met Leu Ile
 [0394] 35 40 45
 [0395] Pro Ser Arg Arg Gln Val Glu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Val
 [0396] 50 55 60
 [0397] Glu Gln Trp Asp Thr Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Val Arg Arg Asn Asp
 [0398] 65 70 75 80
 [0399] Leu Val Gly Arg Ile Leu Leu Cys Arg Asp His Gly Gly Pro Tyr Gln
 [0400] 85 90 95
 [0401] Ser Pro Arg Glu Arg Glu Gln Arg Leu Pro Leu Asp Ala Ala Met Ala
 [0402] 100 105 110
 [0403] Ser Ala Leu Glu Ser Tyr Lys Glu Asp Ile Arg Cys Gly Phe Asp Leu
 [0404] 115 120 125
 [0405] Leu His Ile Asp Thr Ser Met Asp Leu Asp Gly Val Ala Asp Glu Ser
 [0406] 130 135 140
 [0407] Ala Ala Ile Asp Arg Ala Leu Glu Leu Tyr Gly Gln Cys Val Glu Phe
 [0408] 145 150 155 160
 [0409] Ala Arg Ser Gln Gly Arg Glu Val Met Phe Glu Ile Gly Phe Glu Asp
 [0410] 165 170 175
 [0411] Gln Gly Arg Asp Thr Asn Asp Pro Phe Glu Phe Gln Glu Leu Leu Asp
 [0412] 180 185 190
 [0413] Glu Ala Leu Glu Gly Leu Arg Lys Ala Asp Leu Pro Ala Pro Thr Phe
 [0414] 195 200 205
 [0415] Val Val Ala Gln Thr Gly Thr Lys Val Val Glu Thr Gly Asn Thr Gly
 [0416] 210 215 220
 [0417] Gly Ile Gly Val Ala Pro Ser Ala Val Gly Val Ala Val Arg Ala Leu
 [0418] 225 230 235 240
 [0419] Ala Asp Val Val Glu Arg Asn Gly Ile Ala Leu Lys Ala His Asn Cys

[0420]	245	250	255
[0421]	Asp Tyr Leu Asp Glu Ser Thr Val Gly Tyr Leu Ala Ala Ser Gly Val		
[0422]	260	265	270
[0423]	His Ala Leu Asn Val Ala Pro Glu Phe Gly Val Val Glu Thr Arg Ala		
[0424]	275	280	285
[0425]	Phe Ile Gly Val Leu Gln Glu Leu Gly Leu Gly Val Gln Arg Glu Arg		
[0426]	290	295	300
[0427]	Phe Leu Ala Leu Ala Tyr Glu Ser Gly Ser Trp Lys Lys Trp Met Ala		
[0428]	305	310	315
[0429]	Gln Asn Thr Thr Ala Thr Asp Tyr Asp Arg Ala Val Ile Ala Gly His		
[0430]	325	330	335
[0431]	Tyr Val Tyr Gly Thr Asp Glu Phe Lys Glu Ile Lys Thr Ala Ala Gln		
[0432]	340	345	350
[0433]	Gln Ile Ala Gln Ser Arg Gly Ile Asp Val Asp Thr Arg Leu Arg Glu		
[0434]	355	360	365
[0435]	Ala Val Ala Ala Ser Ile Glu Asn Tyr Ala Arg Pro Leu Arg Glu Val		
[0436]	370	375	380
[0437]	Ala Ala Ala Ala Ser Ala Pro Ala Ala Ala		
[0438]	385	390	
[0439]	<210> 10		
[0440]	<211> 1185		
[0441]	<212> DNA		
[0442]	<213> Artificial Sequence		
[0443]	<220>		
[0444]	<223> DNA sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_TH_F4E derived		
[0445]	from Thermobifida halotolerans		
[0446]	<400> 10		
[0447]	atgtccgtta tcccgaaaga gaccggtgtt tccccgagcc gactgaatgt tccctcacgg 60		
[0448]	ctgggggtgg gaccgatgtc gaagaacgcg gtggacgcgg cgatcagcgt ggcgccccgc 120		
[0449]	gccgaccagc cgctgatgct catccccagc cggcgccagg tcgaggcggc gtctcagggc 180		
[0450]	ggcggtacg tcgagcagtg ggacaccgcg gcgttcgccg actacgtgcg ccgcaacgac 240		
[0451]	cttgtgggac ggatcctgct gtgcagggac cacggaggcc cctaccagtc cccgcgggag 300		
[0452]	cgggagcagc ggctccccct cgacgcggcg atggcctccg cgctggagtc ctacaaggag 360		
[0453]	gacatccgct gcggtttcga cctgctgcac atcgacacct ccatggacct cgacggagtc 420		
[0454]	gccgacgagt cggcggcgat cgaccgggcg ctggagctct acgggcagtg cgtcgagttc 480		
[0455]	gcccgttccc aggggcggga ggtgatgttc gagatcggtc tcgaggacca gggaagggac 540		
[0456]	accaacgacc cgttcgagtt ccaggagctc ctgcacgagg cgctggaggg gctgcgcaag 600		
[0457]	gcggacctgc ccgccccgac cttcgtcgtc gcgcagacgg ggaccaaggt cgtcgagacc 660		
[0458]	ggcaacaccg gcgggatcgg ggtcgcgccc agcgcggtcg gtgtcgccgt gcgcgcgctg 720		
[0459]	gccgacgtcg tggagcggaa cggcatcgcc ctcaaggcgc acaactgcga ctacctggac 780		
[0460]	gagagcacgg tcgggtacct ggccgcctcc ggtgtgcacg cgctgaacgt cgctccggag 840		
[0461]	ttcggcgtgg tcgagacgcg ggcgttcacg ggcgtactgc aggagctggg cctgggcgtg 900		

[0462] cagcgggagc gcttcctcgc cctggcctac gagtccggct cgtggaagaa gtggatggcc 960
 [0463] cagaacacca cggccaccga ctacgaccgc gccgtgatcg ccggccacta cgtctacggc 1020
 [0464] acggacgagt tcaaggagat caagaccgcg gcccgacaga tcgcgcagtc ccggggcatc 1080
 [0465] gacgtcgaca cccggctgcg tgaggccgtc gccgcgtcga tcgagaacta cgcgcgaccg 1140
 [0466] ctgcgcgaag tcgccgcggc ggcttcgcc cccgcggcgg cgtga 1185
 [0467] <210> 11
 [0468] <211> 446
 [0469] <212> PRT
 [0470] <213> Artificial Sequence
 [0471] <220>
 [0472] <223> An amino acid sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_TAI_F4E
 [0473] derived from Thermoanaerobacter indiensis
 [0474] <400> 11
 [0475] Met Asn Thr Glu His Pro Leu Lys Asn Val Val Lys Leu Gln Lys Lys
 [0476] 1 5 10 15
 [0477] Gly Ile Pro Ile Gly Ile Tyr Ser Val Cys Ser Ala Asn Glu Ile Val
 [0478] 20 25 30
 [0479] Ile Gln Val Ala Met Glu Lys Ala Leu Ser Met Asp Ser Tyr Val Leu
 [0480] 35 40 45
 [0481] Ile Glu Ala Thr Ala Asn Gln Val Asn Gln Tyr Gly Gly Tyr Thr Asn
 [0482] 50 55 60
 [0483] Met Lys Pro Ile Asp Phe Arg Asp Phe Val Tyr Ser Ile Ala Lys Arg
 [0484] 65 70 75 80
 [0485] Ile Asn Phe Pro Glu Asn Arg Ile Ile Leu Gly Gly Asp His Leu Gly
 [0486] 85 90 95
 [0487] Pro Leu Pro Trp Lys Asn Gln Gln Ala Lys Lys Ala Met Glu Glu Ala
 [0488] 100 105 110
 [0489] Lys Glu Leu Val Lys Gln Phe Val Met Ala Gly Phe Thr Lys Ile His
 [0490] 115 120 125
 [0491] Val Asp Thr Ser Met Phe Leu Gly Asp Asp Asn Ile Asn Ile Lys Leu
 [0492] 130 135 140
 [0493] Asp Thr Glu Thr Ile Ala Glu Arg Gly Ala Ile Leu Val Ser Val Ala
 [0494] 145 150 155 160
 [0495] Glu Arg Ala Phe Glu Glu Leu Lys Lys Ser Asn Pro Tyr Ala Leu His
 [0496] 165 170 175
 [0497] Pro Val Tyr Val Ile Gly Ser Glu Val Pro Val Pro Gly Gly Ser Gln
 [0498] 180 185 190
 [0499] Lys Glu Asn Asn Asn Glu Ile Gln Val Thr Lys Pro Ala Asp Phe Glu
 [0500] 195 200 205
 [0501] Glu Thr Val Glu Val Tyr Lys Ser Thr Phe Tyr Lys Tyr Gly Leu Gly
 [0502] 210 215 220
 [0503] Asn Ala Trp Glu Asp Val Val Ala Val Val Val Gln Pro Gly Val Glu

[0504]	225	230	235	240
[0505]	Phe Gly Val Glu Asn Ile His Glu Tyr Asp His Gln Gln Ala Glu Asn			
[0506]		245	250	255
[0507]	Leu Val Ser Ala Leu Lys Lys Tyr Pro Asn Leu Val Phe Glu Ala His			
[0508]		260	265	270
[0509]	Ser Thr Asp Tyr Gln Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Met Val Arg Asp			
[0510]		275	280	285
[0511]	Gly Phe Ala Ile Leu Lys Val Gly Pro Glu Leu Thr Phe Ala Leu Arg			
[0512]		290	295	300
[0513]	Glu Gly Leu Phe Ala Leu Asn Ile Ile Glu Lys Glu Leu Phe Lys Asp			
[0514]	305	310	315	320
[0515]	Asn His Asp Ile Glu Met Ser Asn Phe Ile Asp Ile Leu Asp Thr Ala			
[0516]		325	330	335
[0517]	Met Leu Asn Asn Pro Lys Tyr Trp Glu Gln Tyr Tyr Tyr Gly Asp Asp			
[0518]		340	345	350
[0519]	Asn Lys Ile Arg Ile Ala Arg Lys Tyr Ser Tyr Ser Asp Arg Cys Arg			
[0520]		355	360	365
[0521]	Tyr Tyr Leu Ile Glu Asn Glu Val Arg Ala Ser Met Ser Arg Leu Phe			
[0522]		370	375	380
[0523]	Lys Asn Leu Thr Asn Val Glu Ile Pro Leu Thr Leu Ile Ser Gln Tyr			
[0524]	385	390	395	400
[0525]	Met Pro Ile Gln Tyr Glu Lys Ile Arg Met Gly Leu Leu Lys Asn Asp			
[0526]		405	410	415
[0527]	Pro Glu Asn Leu Val Lys Asp Lys Ile Gly Asn Cys Ile Asp Lys Tyr			
[0528]		420	425	430
[0529]	Leu Tyr Ala Thr Asn Pro Thr Ser Gly Glu Phe Lys Leu Ile			
[0530]		435	440	445
[0531]	<210> 12			
[0532]	<211> 1341			
[0533]	<212> DNA			
[0534]	<213> Artificial Sequence			
[0535]	<220>			
[0536]	<223> DNA sequence of tagatose-6-phosphate kinase, CJ_TAI_F4E derived			
[0537]	from Thermoanaerobacter indiensis			
[0538]	<400> 12			
[0539]	atgaatacag aacatccttt gaaaaacgtt gttaaacctac aaaaaaaggg aattccaata 60			
[0540]	ggtattttatt cagttttagt tgcaaatgaa atagttattc aagttgcaat ggagaaggca 120			
[0541]	ttgagtatgg atagttatgt tttaattgaa gcaacggcta atcaagtaaa tcaatatggg 180			
[0542]	ggctatacga atatgaaacc tattgatttt agagattttg tgtattctat agccaaaagg 240			
[0543]	ataaacttcc cagaaaatag aataatcctt ggcggggacc acttaggacc tttgcatgg 300			
[0544]	aaaaatcaac aagcgaataa agcaatggaa gaagcaaaag aacttggtta acaattttgtg 360			
[0545]	atggettggt ttacgaaaat tcatgtagat acaagtatgt ttcttgaga tgataacata 420			

[0546] aatatcaaac tagatactga aactattgcg gagagaggag cgatacttgt atcagtagca 480
 [0547] gaaagagctt ttgaggagtt aaaaaagtct aatccttatg ctcttcatcc agtttatgta 540
 [0548] ataggtagtg aagttcctgt tccaggaggt tctcaaaaag aaaataataa tgaaatacaa 600
 [0549] gtaacaaagc cggcggattt tgaagaaact gtggaagtgt ataaaagcac tttctataaa 660
 [0550] tatggtttag gaaacgcatg ggaagatgtt gtagcagtgg ttgtgcagcc tggggtggaa 720
 [0551] tttggagttg aaaatattca tgaatatgat caccaacagg ctgaaaattt agtaagtgt 780
 [0552] ttaaaaagt atcctaattt agtatttgaa gccactcta cggattatca acctgcaaaa 840
 [0553] ctactaaaag aaatggtag agatggattt gctatactta aagttggacc tgaattgact 900
 [0554] tttgcattaa gggaaggatt gtttgctctg aatattatag aaaaagaatt atttaaagat 960
 [0555] aatcatgata ttgagatgtc aaattttatt gatatccttg atacagcaat gttaaataat 1020
 [0556] ccgaagtatt gggaacagta ttattacggt gatgataata aaattagaat tgctagaaaa 1080
 [0557] tacagctatt ctgatagatg taggtattat ctaatcgaaa atgaagttag agcatctatg 1140
 [0558] tctagtttgt ttaaaaattt aacaaatgtt gagataccat taaccttaat aagtcagtat 1200
 [0559] atgcctattc aatatgaaaa aattagaatg ggactattaa aaaatgatcc tgagaattta 1260
 [0560] gtaaaaagata aaattggaaa ttgcattgat aagtatttgt atgctactaa tccgacaagt 1320
 [0561] ggagaattta aactaatata a 1341
 [0562] <210> 13
 [0563] <211> 38
 [0564] <212> DNA
 [0565] <213> Artificial Sequence
 [0566] <220>
 [0567] <223> primer DNA sequence of CJ_ANT_F4E or CJ_ANTA_F4E
 [0568] <400> 13
 [0569] atatacatat gatgttcggc tcgcctgctc ccctgctg 38
 [0570] <210> 14
 [0571] <211> 38
 [0572] <212> DNA
 [0573] <213> Artificial Sequence
 [0574] <220>
 [0575] <223> primer DNA sequence of CJ_ANT_F4E or CJ_ANTA_F4E
 [0576] <400> 14
 [0577] tggtgctcga gcccgcacgc cgcagcgtaa tcttccag 38

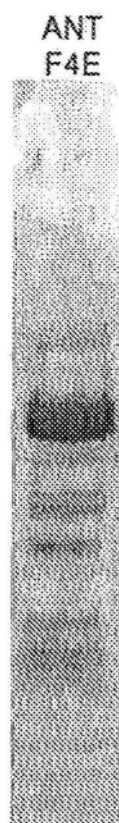


图1

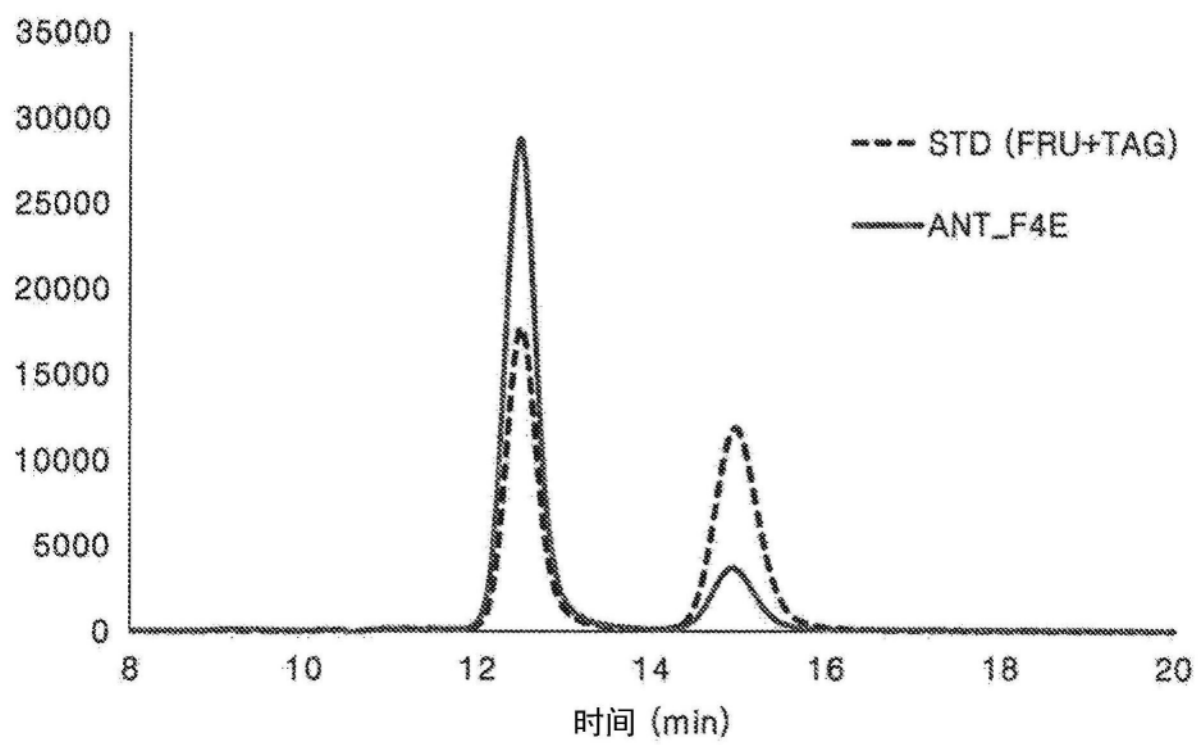


图2

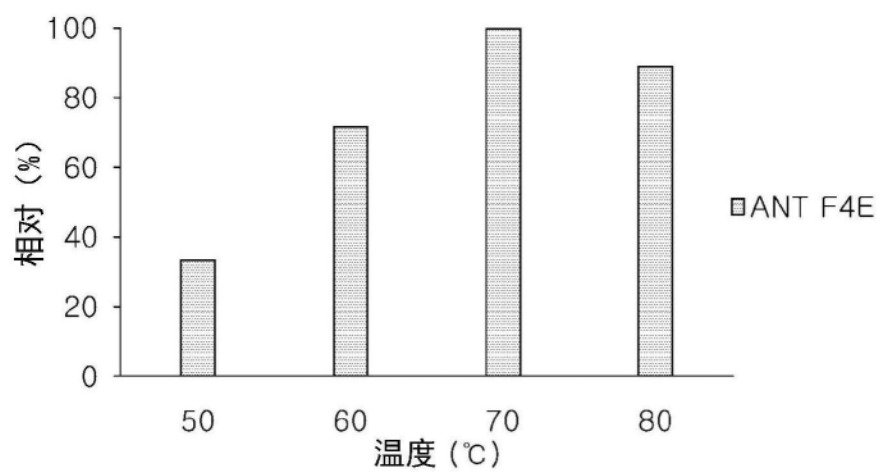


图3

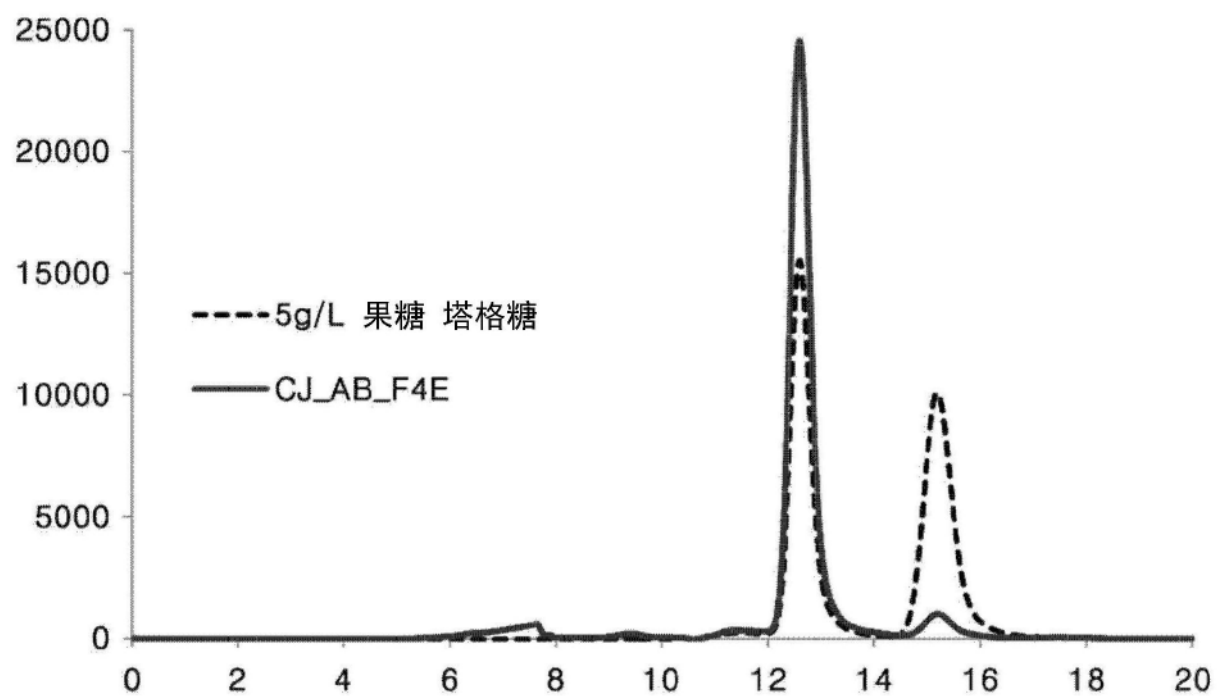


图4

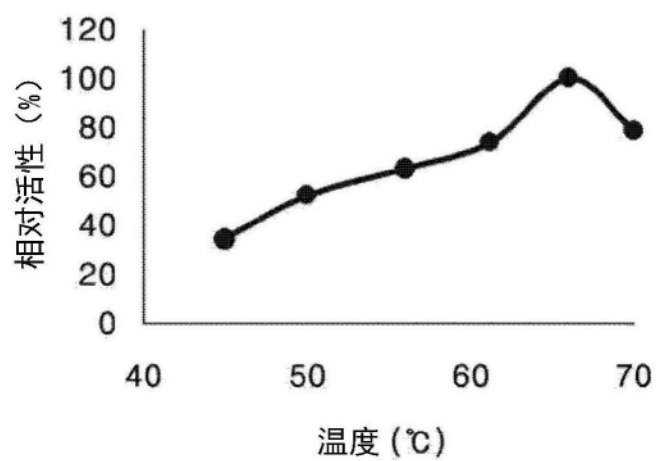


图5

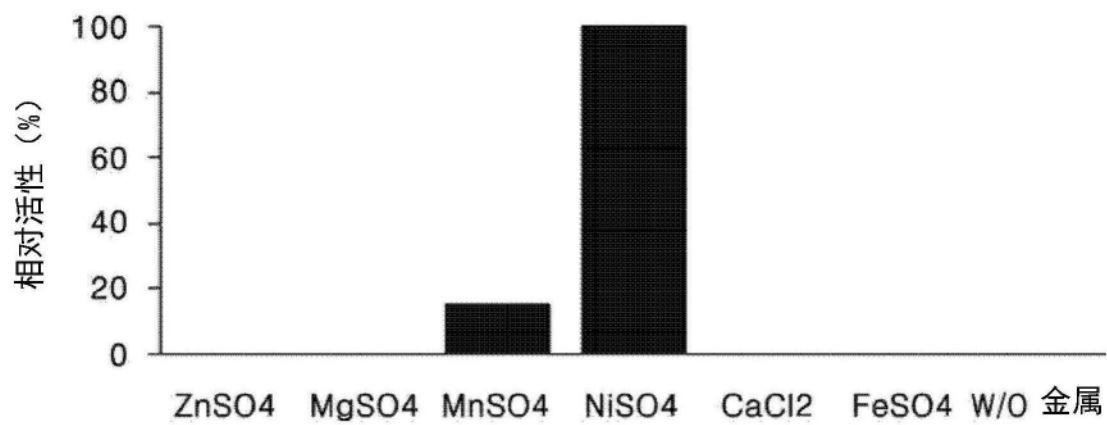


图6

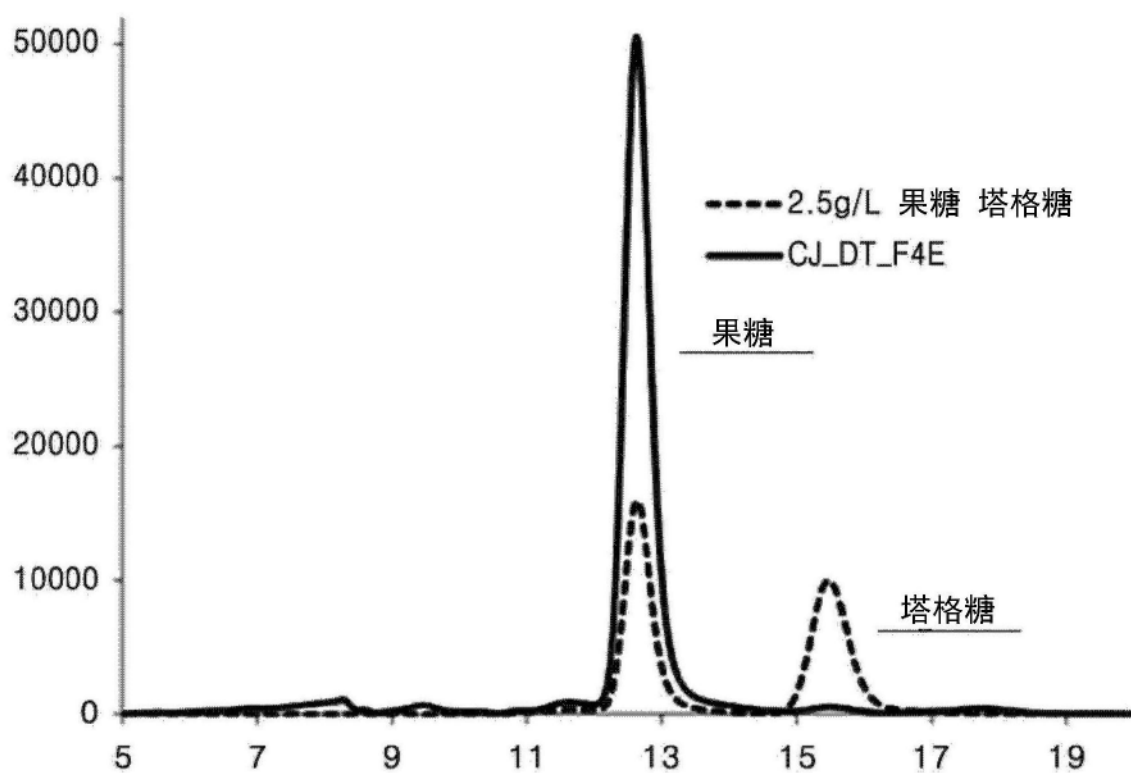


图7

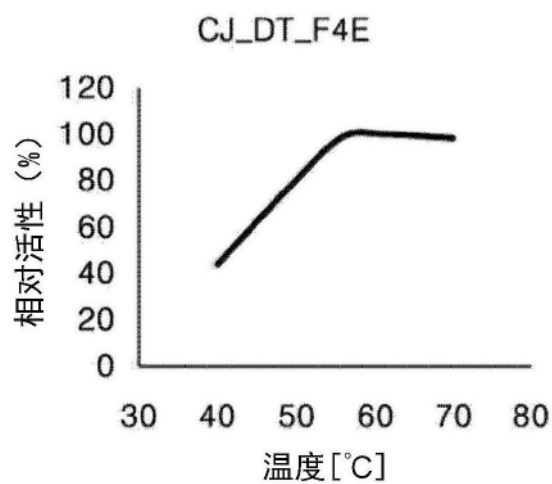


图8

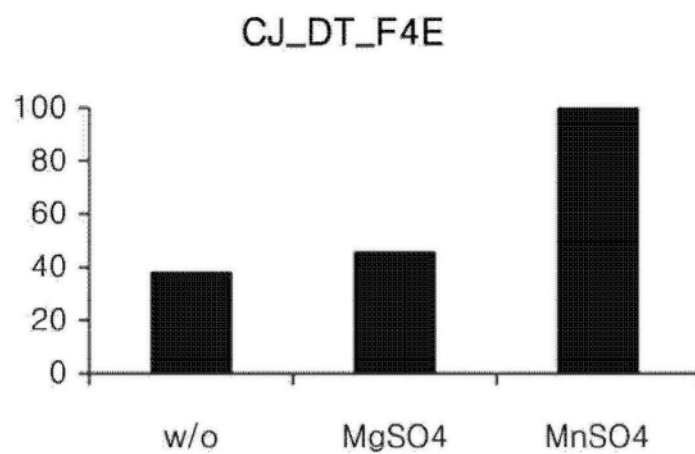


图9

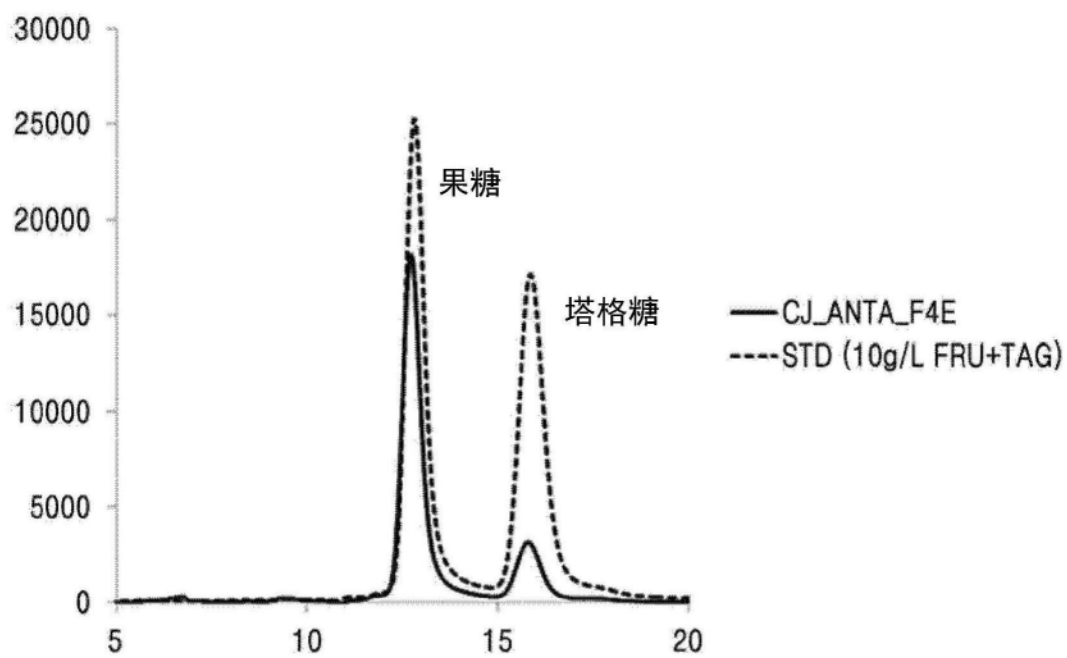


图10

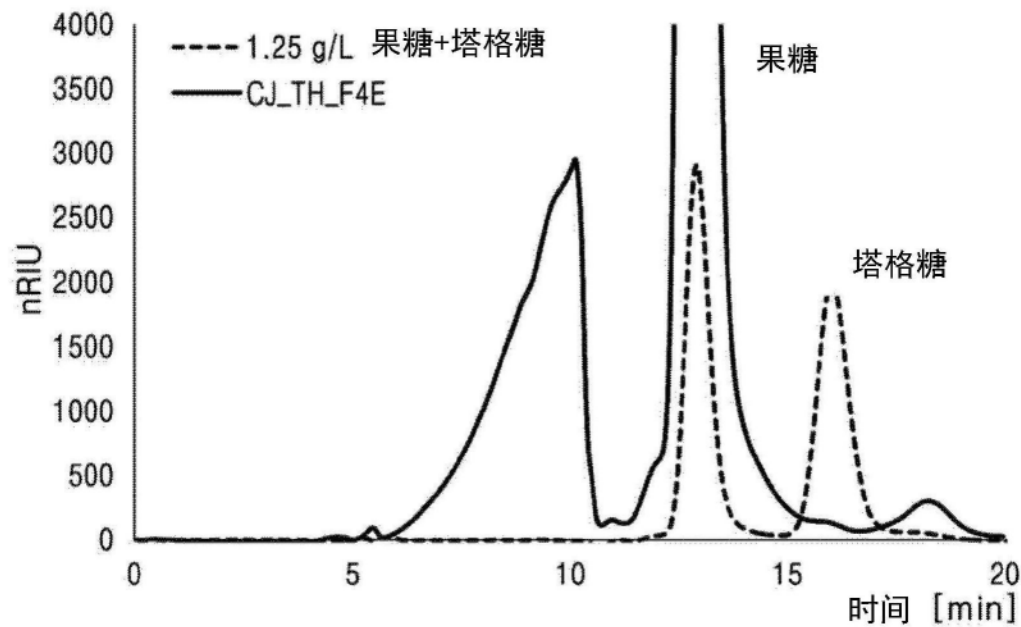


图11

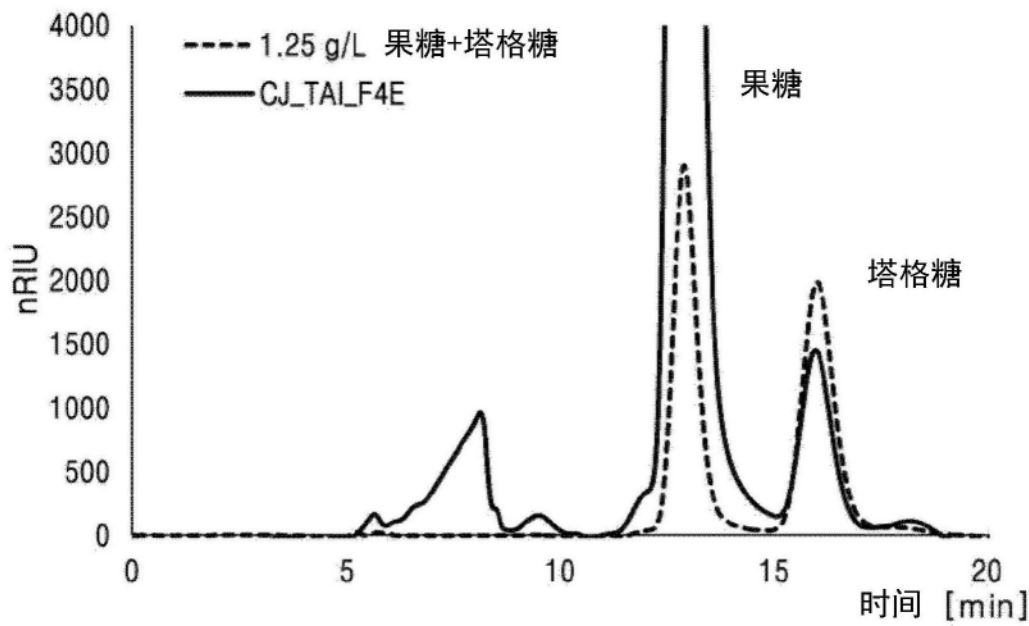


图12