

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6518761号
(P6518761)

(45) 発行日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日(2019.4.26)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 19/02	(2006.01)	C 1 2 P	19/02
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N 9/90	(2006.01)	C 1 2 N	9/90 Z N A
C 1 2 N 15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N 15/61	(2006.01)	C 1 2 N	15/61

請求項の数 20 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2017-521088 (P2017-521088)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月19日 (2015.10.19)
 (65) 公表番号 特表2017-531438 (P2017-531438A)
 (43) 公表日 平成29年10月26日 (2017.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/011007
 (87) 国際公開番号 W02016/064146
 (87) 国際公開日 平成28年4月28日 (2016.4.28)
 審査請求日 平成29年4月18日 (2017.4.18)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0143703
 (32) 優先日 平成26年10月22日 (2014.10.22)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 508139664
 シージェイ チェイルジェダン コーポレ
 ーション
 C J C H E I L J E D A N G C O R P
 O R A T I O N
 大韓民国ソウル市中区東湖路330 シー
 ジェイ チェイル ジェダンセンター
 C J C h e i l j e d a n g C e n t
 e r , 3 3 0 , D o n g h o - r o , J u
 n g - g u , S e o u l , R e p u b l i
 c O f K o r e a
 (74) 代理人 100114890
 弁理士 アイゼル・フェリックス=ライ
 ンハルト

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タガトース製造用の組成物とフルクトースからタガトースを製造する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1~7のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質または前記タンパク質を発現する菌株を含む、フルクトースからタガトースを製造するためのタガトース製造用組成物。

【請求項2】

前記タンパク質は、フルクトースの4番炭素の位置をエピ化してタガトースに転換する酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記タンパク質は配列番号1のアミノ酸配列からなっていて、またロドテルムス・マリヌス (Rhodothermus marinus) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記タンパク質は配列番号2のアミノ酸配列からなっていて、またサーモトガ・ペトロフィラ (Thermotoga petrophila) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記タンパク質は配列番号3のアミノ酸配列からなっていて、またサーモトガ・レティンガエ (Thermotoga lettingae) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

前記タンパク質は配列番号 4 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクター・マスラニイ (*Thermoanaerobacter mathranii*) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記タンパク質は配列番号 5 のアミノ酸配列からなっていて、またディクチオグロムス・ツルギダム (*Dictyoglomus turgidum*) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記タンパク質は配列番号 6 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクテリウム・キシラノリチクム (*Thermoanaerobacterium xylanolyticum*) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記タンパク質は配列番号 7 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクター・シドロフィラス (*Thermoanaerobacter siderophilus*) 由来の酵素タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記菌株は、各々配列番号 1 ないし 7 のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換されたことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 11】

前記タンパク質は配列番号 1 のアミノ酸配列からなっていて、またロドテルムス・マリヌス (*Rhodothermus marinus*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 60 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 90 であり、最適活性 pH が 6.0 ~ 9.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記タンパク質は配列番号 2 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモトガ・ペトロフィラ (*Thermotoga petrophila*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 90 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 9.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 13】

前記タンパク質は配列番号 3 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモトガ・レティンガエ (*Thermotoga lettingae*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 90 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 9.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記タンパク質は配列番号 4 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクター・マスラニイ (*Thermoanaerobacter mathranii*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 80 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 10.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 15】

前記タンパク質は配列番号 5 のアミノ酸配列からなっていて、またディクチオグロムス・ツルギダム (*Dictyoglomus turgidum*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 90 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 9.0 であることを特徴とする、請求

50

項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記タンパク質は配列番号 6 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクテリウム・キシラノリチウム (*Thermoanaerobacterium xylinolyticum*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 53 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 90 であり、最適活性 pH が 6.0 ~ 9.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記タンパク質は配列番号 7 のアミノ酸配列からなっていて、またサーモアナエロバクター・シデロフィラス (*Thermoanaerobacter siderophilus*) 由来の酵素タンパク質であり、かつ、前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 80 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 10.0 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 18】

請求項 1 から 17 までのいずれか一つに記載の組成物をフルクトースに反応させる工程を含みながら、前記反応に、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、ニッケルイオン、コバルトイオン、鉄イオン、マンガンイオン、銅イオン、カルシウムイオン及びこれらの混合物からなる群から選択される一つ以上の金属イオンを追加で含む、フルクトースからタガトースを製造する方法(ただし、(i)前記タンパク質が配列番号 1 のアミノ酸配列からなる場合、前記反応中にリチウムイオン、カリウムイオン及びナトリウムイオンを含まず、(ii)前記タンパク質が配列番号 2 ないし 5 及び 7 のいずれかのアミノ酸配列からなる場合、前記反応中にカルシウムイオン、銅イオン、リチウムイオン、カリウムイオン及びナトリウムイオンを含まず、かつ、(iii)前記タンパク質が配列番号 6 のアミノ酸配列からなる場合、前記反応中にカルシウムイオン、銅イオン、マンガンイオン、リチウムイオン及びナトリウムイオンを含まない)。

【請求項 19】

前記反応は、下記の a) ないし c) の条件で行われることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

- a) 50 ~ 80 の反応温度、
- b) pH 6.0 ~ 9.0 の反応 pH、
- c) 5% (w/v) ~ 60% (w/v) のフルクトース濃度

【請求項 20】

上記の金属イオンがマグネシウムイオン、亜鉛イオン、ニッケルイオン、コバルトイオン、鉄イオン、マンガンイオン、またはこれらの混合物であることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タガトース製造用の組成物とフルクトースからタガトースを製造する方法であり、より詳細には、高温菌微生物由来の好熱性フルクトース 4 - エピメラーゼをコードする遺伝子、および前記酵素を利用してフルクトースからタガトースを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タガトースはフルクトース (D - fructose) のエピマーであり、タガトースは砂糖とほとんど区別がつかない天然の甘さを有し、物理的性質も砂糖と類似である。タガトースは、牛乳、チーズ、カカオなどの食品、リンゴとミカンのような甘い味の天然果実に存在する少量の天然甘味料であり、カロリーは 1.5 kcal / g であって砂糖の 1 / 3 程度であり、GI (Glycemic index、血糖指数) は 3 であって砂糖の 5 % 水準であるにもかかわらず、砂糖と類似な甘さを有し、様々な健康機能性があるため、

多様な製品に適用した場合、健康と味を同時に満足させる代替甘味料として利用できる。

【0003】

従来知られているタガトースの生産方法では、主にガラクトースを原料とする化学的方法（触媒反応）と生物学的方法（異性化酵素反応）がある（大韓民国公開特許第2009-0082774号、2009年07月31日公開）。前記反応の原料であるガラクトースを経済的に得るためにガラクトースを含有する様々な基礎原料とこれからガラクトースの収得、タガトースの製造に関する研究が行われてきた。ガラクトースを得るための代表的な基礎原料は乳糖であり、国際市場における原乳と乳糖の生産量、需要、供給量などによって乳糖または乳糖を含有する製品の価格の不安定性が存在し、安定したタガトースの生産原料の供給には限界がある。

10

【0004】

特に、2012年前後の国際乳糖価格の急激な上昇は、中国の急激な経済成長に伴い乳糖を含む脱脂/全脂粉乳などの需要が急増したことと気候温暖化に伴う酪農国の年間牛乳生産量の減少が主な原因であった。この原料価格の不安定性のせいで安定したタガトース生産が困難な実情である。したがって、日常でよく使われている一般糖（スクロース、グルコース、フルクトースなど）を使用してタガトースを製造できる新たな方法が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来は、ガラクトースを得るために、食品原料として乳糖以外に食品原料において利用可能な副産物である脱タンパクホエイ（whey permeate）、植物系バイオマスである落葉松などの多様な生物資源から分解するガラクトースを利用して、タガトースを生産した。

20

【0006】

しかし、原料の安定的な需給と投資効率などを考慮すると、産業的に利用できる水準、またはその水準まで製造が可能である適切な原料は存在しない。

【0007】

本発明が解決しようとする課題は、ガラクトースからタガトースを生産する従来の方法に比べて、産業的適用に適切な一般糖からタガトースを生産する、タガトース製造用の組成物とタガトースの生産方法を提供することである。

30

【0008】

具体的には、本発明は、従来にはその機能が解明されなかったタンパク質であって、D-フルクトース4-エピメラーゼ活性を有し、フルクトースからタガトースを高収率で製造することができる新たな酵素タンパク質、これをコードする遺伝子、これを用いたタガトース製造用の組成物とフルクトースからタガトースを製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一実施例は、本発明の配列番号1ないし配列番号7のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質または前記タンパク質を発現する菌株を含む、フルクトースからタガトースを製造するための組成物を提供する。

40

【0010】

また、本発明の他の実施例は、本発明の一実施例の組成物をフルクトースと反応させる工程を含む、フルクトースからタガトースを製造する方法を提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、フルクトースの4番炭素位置をエピ化してタガトースを生産する活性を有する酵素である新たなD-フルクトース4-エピメラーゼを開発し、日常でよく使われている原料のフルクトースを使用し製造原価を低減することで、経済的かつ高収率でタガトース

50

スを製造することが可能になる。

【0012】

また、本発明では、価格変動が激しい乳糖ではなく、普遍化された原料であるフルクトースを使用して製造費用を節減することによって、経済的かつ高収率のタガトースを製造方法を提供することができる。

【0013】

一般的にフルクトースをグルコースまたは砂糖から工業的に製造できることは周知の事実であるため、本発明で提示する工程の原料は、フルクトース以外に、より低価格で生産できるように、フルクトースを全体または一部に含有した形で使用する場合まで拡張することができる。すなわち、本発明は、タガトースを澱粉質、粗糖または砂糖から酵素的転換を介して生産することを含む。

10

【0014】

また、本発明は、フルクトースを利用してタガトースを製造し、現在重要な食品材料として脚光を浴びているタガトースを効率的に大量生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1a～図1gは、各々の高温性微生物由来の7種のD-フルクトース4-エピメラーゼを発現するための組換えベクターの開裂地図である。

【図2】図2a～図2gは、フルクトースを基質として、D-フルクトース4-エピメラーゼ反応による、各々の高温性微生物由来の7種のタガトース生成を示すHPLCグラフである。

20

【図3】図3a～図3gは、各々高温性微生物由来の7種のD-フルクトース4-エピメラーゼの温度による活性を示すグラフである。

【図4】図4a～図4gは、各々高温性微生物由来の7種のD-フルクトース4-エピメラーゼのpH変化による活性を示すグラフである。

【図5】図5a～図5gは、各々高温性微生物由来の7種のD-フルクトース4-エピメラーゼの活性を、金属イオンの種類による活性の比較評価グラフである。

【図6】図6a～図6gは、各々7種の高温性微生物から由来したタンパク質のアミノ酸配列(配列番号1～配列番号7)を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0016】

以下、具体的な実施例により本発明をさらに詳しく説明する。しかし、本発明は下記実施例に限定されず、本明細書に記載のない内容は、本発明の技術分野または類似分野における熟練者なら十分な認識と類推が可能であるため、その説明を省略する。

【0017】

本明細書において前記用語「n番炭素の位置」は、IUPACで定める炭素番号の付与規則に基づいて決められる炭素の位置を意味し、Cnで表現することができる。nは1以上の整数である。例えば、「4番炭素の位置でエピ化」されることを「C4-エピ化」で表現することができる。

【0018】

40

本発明の一実施例では、配列番号1～配列番号7のいずれか一つのアミノ酸配列からなるタンパク質または前記タンパク質を発現する菌株を含む、フルクトースからタガトースを製造するための、タガトース製造用の組成物を提供する。

【0019】

一般的に、単糖類は、アルドヘキソース(aldohexose)とケトヘキソース(ketohexose)に分類される。アルドヘキソースは、六個の炭素原子からなるアルドースで一端にアルデヒド基を有するものを意味し、非限定的な例で、グルコース(glucose)、ガラクトース(galactose)、アロース(allulose)、グロース(gulose)、アルトロース(altriose)、マンノース(mannose)、タロース(talose)、イドース(idose)がある。

50

【0020】

また、本明細書のケトヘキソースは、六個の炭素原子からなりケトン基を有する単糖類を意味し、非限定的な例で、フルクトース (fructose)、タガトース (tagatose)、プシコース (psicose)、ソルボース (sorbosose) があり、具体的には、フルクトースであり得る。前記フルクトースと前記タガトースは、本明細書において特に記載のない限り、D-フルクトースまたはD-タガトースを意味する。

【0021】

本発明の一実施例では、前記配列番号1～配列番号7のいずれか一つのアミノ酸配列は、フルクトースの4番炭素の位置をエピ化してタガトースを生産する活性を有する酵素であり得る。

10

【0022】

具体的には、本発明の発明者らは、高温性ロドテルムス (Rhodothermus) 属、サーモアナエロバクター (Thermoanaerobacter) 属、サーモトガ (Thermotoga) 属、ディクチオグロムス (Dictyoglomus) 属に属する微生物を利用した。高温性微生物が生産する酵素は、中温性微生物 (mesophile) が生産する酵素と同じ機能を有し、極限反応 (高温など) 条件で安定的な反応ができ、中温性微生物の汚染防止、基質の溶解度が低い物質の溶解度の増加、反応速度の増加など、多くの利点があるため、中温性酵素を利用したときの産業的な欠点を克服することができると考えられる。前記高温性微生物からフルクトース4-エピマー酵素をスクリーニングし、最終的に各々の微生物に含まれる遺伝子の中で、フルクトースをタガトースに変換できる酵素を発現するポリヌクレオチドを初めて解明し、これにより、タンパク質の効果的な過発現 (overexpression) に最適化したポリヌクレオチド配列を合成し、これを組換えベクターに挿入して発現させ、フルクトースをタガトースに変換する活性を有する酵素を提供する。

20

【0023】

前記配列番号1～配列番号7のいずれか一つのアミノ酸配列は、前記配列からなるタンパク質をそれぞれコードする遺伝子を含む組換えベクターで形質転換されたものであり得る。

【0024】

前記形質転換用の菌株は、Escherichia coli、Corynebacterium glutamicum、Aspergillus oryzae、または Bacillus subtilis などがある。前記 E. coli で形質転換された菌株は、例えば、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - RM (寄託番号: KCCM11576P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - TAM (寄託番号: KCCM11577P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - TAS (寄託番号: KCCM11578P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - TAX (寄託番号: KCCM11579P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - TP (寄託番号: KCCM11580P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - TL (寄託番号: KCCM11581P)、Escherichia coli BL21 (DE3) - pET21a - DT (寄託番号: KCCM11582P) であり、2014年10月6日に韓国微生物保存センター (Korean Culture Center of Microorganisms、ソウル市西大門区弘済1洞361-221 儒林ビル) に寄託し、各々の寄託番号は、KCCM11576P、KCCM11577P、KCCM11578P、KCCM11579P、KCCM11580P、KCCM11581P、KCCM11582P である。

30

40

【0025】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ロドテルムス・マリヌス (Rhodothermus marinus) 由来の酵素で

50

あり得る。

【0026】

前記タンパク質は、分子量が55kDa~60kDaであり、最適活性温度が50~90であり、最適活性pHが6.0~9.0であり得る。

【0027】

より具体的に、前記最適活性温度は60~80であり、前記最適活性pHは7.0~9.0であり得る。

【0028】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質は、サーモトガ・ペトロフィラ(Thermotoga petrophila)由来の酵素であり得る。

10

【0029】

前記タンパク質は、分子量が55kDa~58kDaであり、最適活性温度が50~90であり、最適活性pHが7.0~9.0であり得る。

【0030】

より具体的に、前記最適活性温度は70~90であり得る。

【0031】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質は、サーモトガ・レティンガエ(Thermotoga lettingae)由来の酵素であり得る。

20

【0032】

前記タンパク質は、分子量が55kDa~58kDaであり、最適活性温度が50~90であり、最適活性pHが7.0~9.0であり得る。

【0033】

より具体的に、前記最適活性温度は60~80であり得る。

【0034】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質は、サーモアナエロバクター・マスラニイ(Thermoanaerobacter mathranii)由来の酵素であり得る。

【0035】

前記タンパク質は、分子量が55kDa~58kDaであり、最適活性温度が50~90であり、最適活性pHが7.0~10.0であり得る。

30

【0036】

より具体的に、前記最適活性温度は70~90であり、最適な活性pHは8.0~10.0であり得る。

【0037】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号5のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ディクチオグロムス・ツルギダム(Dictyoglomus turgidum)由来の酵素であり得る。

【0038】

前記タンパク質は、分子量が55kDa~58kDaであり、最適活性温度が50~90であり、最適活性pHが7.0~9.0であり得る。

40

【0039】

より具体的に、前記最適活性温度は60~80であり得る。

【0040】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質は、サーモアナエロバクテリウム・キシラノリチウム(Thermoanaerobacterium xyliantolyticum)由来の酵素であり得る。

【0041】

前記タンパク質は、分子量が53kDa~58kDaであり、最適活性温度が50~

50

90 であり、最適活性 pH が 6.0 ~ 9.0 であり得る。

【0042】

より具体的に、前記最適活性温度は 60 ~ 80 であり、前記最適 pH は 6.0 ~ 8.0 であり得る。

【0043】

具体的に、本発明における一実施例の配列番号 7 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、サーモアナエロバクター・シデロフィラス (Thermoanaerobacter siderophilus) 由来の酵素であり得る。

【0044】

前記タンパク質は、分子量が 55 kDa ~ 58 kDa であり、最適活性温度が 50 ~ 80 であり、最適活性 pH が 7.0 ~ 10.0 であり得る。 10

【0045】

より具体的に、前記最適活性温度は 60 ~ 80 であり、前記最適 pH は 8.0 ~ 10.0 であり得る。

【0046】

本発明における他の実施例は、本発明の一実施例のいずれか一つの組成物をフルクトースに反応させる工程を含む、フルクトースからタガトースを製造する方法であり得る。

【0047】

具体的に、前記反応は、50 ~ 80 で行われ得る。

【0048】

また、前記反応は、pH 6.0 ~ 9.0 で行われ得る。 20

【0049】

また、前記反応には、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、ニッケルイオン、コバルトイオン、鉄イオン、マンガンイオン、またはこれらの混合物がさらに含まれ得る。

【0050】

また、基質として作用するフルクトースは、5% (w/v) ~ 60% (w/v) の濃度であり得る。

【0051】

本発明の一実施例によれば、フルクトースは砂糖やグルコースから得ることができる。これにより、グルコース、フルクトース、砂糖のように日常でよく使われている安価な原料を使用して高収率のタガトースを製造する方法を提供し、タガトースの大量生産が可能になる。 30

【0052】

したがって、本発明における一実施例のいずれか一つの組成物をフルクトースと反応させる工程の前に、砂糖を加水分解したり、グルコースをエピ化したりして、フルクトースを得る工程をさらに行うことができる。

【0053】

前記加水分解に使用される酵素は、
- フルクトフラノシターゼ、インベルターゼ、サッカラーゼなどの
- D - フルクトシダーゼ; スクララーゼ、
- グルコシダーゼ、および
- D - グリコシドヒドロラーゼからなる群より選択された一つ以上であることができる
が、これらに限定されない。 40

【0054】

前記グルコースのエピメラーゼは、グルコースイソメラーゼまたはホスホグルコイソメラーゼであり得るが、これらに限定されない。

【実施例】

【0055】

実施例 1 : D - フルクトース 4 - エピメラーゼを生産する組換え菌株の製造

【0056】

下表 1 のように、高温性微生物 7 種から由来した配列番号 1 ~ 配列番号 7 (図 6 a ~ 図 6 g) のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを制限酵素 Nde I と Xho I を使 50

用して、発現ベクター-pET21a (Novagen)の制限酵素によって切断された部位に挿入し、組換えベクター-pET21a-RM、pET21a-TAM、pET21a-TAS、pET21a-TAX、pET21a-TP、pET21a-TL、pET21a-DTを製造した(図1a~図1g)。前記組換えベクターをヒートショック法(heat shock)(Sambrook and Russell: Molecular Cloning。)によって大腸菌BL21(DE3)(invitrogen)を形質転換し、組換え菌株を製造した。

【0057】

【表1】

高温性微生物のリスト

RM	<i>Rhodothermus marinus</i>
TAM	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>
TAS	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i> SR4
TAX	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>
TP	<i>Thermotoga petrophila</i>
TL	<i>Thermotoga lettingae</i>
DT	<i>Dictyoglomus turgidum</i>

10

20

【0058】

形質転換された組換え菌株を5mlのLB-アンピシリン培地(Difco)に接種した後、600nmで吸光度(OD)が1.5に達するまで37、180rpmで振とう培養し、これを再び500mlのLB-アンピシリン培地に接種し、目的とする酵素の過剰発現を誘導するため、初期に5mMのラクトースを添加して、37の振とう培養器で培養した。培養条件は37、180rpmで16時間維持した。その後、遠心分離機で4000rpm、20分間遠心分離して、菌体のみを回収した。

【0059】

製造された前記組換え菌株は、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-RM(寄託番号:KCCM11576P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-TAM(寄託番号:KCCM11577P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-TAS(寄託番号:KCCM11578P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-TAX(寄託番号:KCCM11579P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-TP(寄託番号:KCCM11580P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-TL(寄託番号:KCCM11581P)、Escherichia coli BL21(DE3)-pET21a-DT(寄託番号:KCCM11582P)と命名し、2014年10月6日に韓国微生物保存センター(Korean Culture Center of Microorganisms)(ソウル市西大門区弘済1洞361-221儒林ビル)に寄託した。各々の寄託番号はKCCM11576P、KCCM11577P、KCCM11578P、KCCM11579P、KCCM11580P、KCCM11581P、KCCM11582Pである。

30

40

【0060】

実施例2: D-フルクトース4-エピメラーゼ精製と特性の確認

【0061】

2-1: D-フルクトース4-エピメラーゼの精製

【0062】

50

実施例1で回収された菌体全7種を溶解バッファー (l y s i s b u f f e r) (5 0 m M K - p h o s p h a t e) に混濁させた後、超音波振動機 (U l t r a s o n i c p r o c e s s o r) を使用し4 で10分間破碎した。破碎液を60 振とう培養器で30分間熱処理をした後、13,000rpmで10分間遠心分離して上澄み液だけを確保した。確保した上澄み液を予め溶解バッファー (l y s i s b u f f e r) で平衡させたQ - セファロース (S e p h a r o s e) D E A E にかけた後、50mM K - ホスフェート (p h o s p h a t e) 200mM NaClが含まれた緩衝溶液を順次的に流すことで目的タンパク質を精製した。溶出されたタンパク質は、酵素活性測定用の緩衝溶液 (50mM K - p h o s p h a t e , p H 7) に交換し透析した後、次の実験に使用した。また、精製された7種のD - フルクトース4 - エピメラーゼである、RM、TAM、TAS、TAX、TP、TL、DTはSDS - PAGEによって、分子量が各々約58kDa、56kDa、56kDa、55kDa、56kDa、57kDa、57kDaであることを確認した。

10

【0063】

2 - 2 : D - フルクトース4 - エピメラーゼの温度、pHの変化による活性の分析

【0064】

実施例2 - 1で精製された酵素7種のpHおよび温度変化によるD - フルクトース4 - エピメラーゼの活性を確認するために、様々なpHと温度で、酵素とフルクトース基質を反応させ、活性を確認した。

【0065】

活性測定は50mMフルクトース、酵素1mg/ml、0.1mMのNiSO₄で、各々のpHと温度範囲で行われ、氷で反応を停止させた後、HPLCで分析した。前記HPLC分析は、SUGAR - SP0810 (Shodex) カラムを使用して80 で、移動相で水を0.6ml/分の流速で流しながら行い、示差屈折率検出器 (R e f r a c t i v e I n d e x D e t e c t o r) でタガトースを検出してタガトースの生産性を分析した。

20

【0066】

最初pHを7にして、温度による活性を評価するために、40 ~ 90 でタガトースの生産性を測定した結果、7種の前記酵素のうちTAM、TPの2種の場合、80 で最大転換率を示し、RM、TAS、TAX、TL、DTの5種の場合、70 で最大変換率を示した (図3a ~ 図3g) 。

30

【0067】

また、pH変化による活性を調べるために、70 で、50mMのナトリウムアセテート (s o d i u m a c e t a t e , p H 4 ~ 6) 、50mMのK - ホスフェート (p h o s p h a t e , p H 6 ~ 8) 、50mMのTris - HCl (p H 7 ~ p H 9) の緩衝溶液をそれぞれ使用し、最大活性を示すpHを調べた結果、類似種別にpH特性が異なり、特にpH7 ~ pH9で高活性を示すことを確認した。

【0068】

具体的に、TAXはpH7、TP、TL、RM、DTはpH8、TAS、TAMはpH9で活性が特に高かった。また、各々のpHに相当する緩衝溶液の中でTris - HCl 緩衝溶液で最大活性を示し、緩衝溶液の中で最高の活性を示すことが確認された (図4a ~ 図4g) 。

40

【0069】

図5a ~ 図5gに示すように、実施例2 - 1の酵素は、フルクトースからタガトースの製造が可能であることを確認した。

【0070】

2 - 3 : D - フルクトース4 - エピメラーゼにおける金属イオン要求性の分析

【0071】

既知のエピメラーゼ (プシコース3 - エピメラーゼ) 、異性化酵素 (グルコース異性化酵素、アラビノース異性化酵素) は、金属イオンが必要であることが知られている。前記

50

実施例 2 - 1 で得られた D - フルクトース 4 - エピメラーゼに対しても、金属イオンの影響を調べた。

【 0 0 7 2 】

前記実施例 2 - 1 で精製された 7 種のタンパク質に、金属イオンである NiSO_4 、 NiCl_2 、 CuCl_2 、 MnCl_2 、 CaCl_2 、 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 MgCl_2 、 FeSO_4 、 NaCl 、 LiCl 、 KCl または CoCl_2 を各々 1 mM ずつ処理し、酵素活性を測定した。対照群は金属イオンを処理しなかったものを使用した。測定された前記各金属イオンを処理した場合の酵素活性を対照群の酵素活性と比較して、図 5 a ~ 図 5 g に示した。

【 0 0 7 3 】

図 5 a ~ 図 5 g に示したように、実施例 2 - 1 の酵素は、ニッケルイオンとコバルトイオン添加によって活性が増加し、金属イオン要求性があることを分かった。特に、 NiSO_4 を添加した場合、最高活性を示すことを確認した。

【 0 0 7 4 】

実施例 3 : フルクトースからタガトースの製造

【 0 0 7 5 】

前記実施例 2 で選ばれた最適酵素反応条件で、タガトースの生産性を確認した。具体的には、実施例 2 - 1 で精製した D - フルクトース 4 - エピメラーゼを 1 mg / ml の濃度で使用し、反応温度は、前記 7 種の酵素のうち TAM、TP の 2 種は 80 °C で、RM、TAS、TAX、TL、DT の 5 種は 70 °C で、50 mM の Tris - HCl 緩衝溶液を各々の pH 別に作成し、TAX は pH 7、TP、TL、RM、DT は pH 8、TAS、TAM は pH 9 と、硫酸ニッケル 0.1 mM の条件下で 20 g / L (約 110 mM の濃度) のフルクトースと反応させた。

【 0 0 7 6 】

前記実施例 2 - 2 と同じ方法である HPLC 分析を行った (図 2 a ~ 図 2 g)。前記反応で生成されたタガトースの生産量を定量した結果で、フルクトースでタガトースへの転換率を測定した。その結果は、表 2 のとおりである。

【 0 0 7 7 】

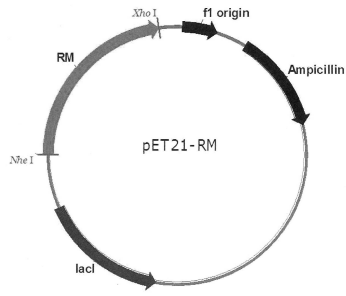
【表 2】

	フルクトース濃度 (g/L)	タガトース (g/L)	転換率 (%)
RM	20	3.8	19.0
TAX	20	1.7	8.6
TAM	20	3.3	16.7
TAS	20	2.5	12.4
TP	20	3.6	18.1
TL	20	3.9	19.4
DT	20	2.5	12.6

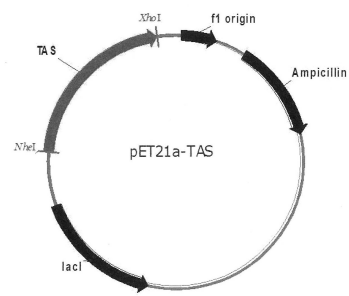
【 0 0 7 8 】

得られた前記反応終了液 (タガトースとフルクトースの混合液) を脱色 (活性炭利用)、イオン精製、クロマトグラフィー、結晶化工程を経て、最終的に結晶タガトースを得ることができる。

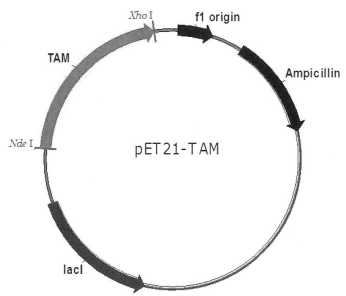
【 1 a 】



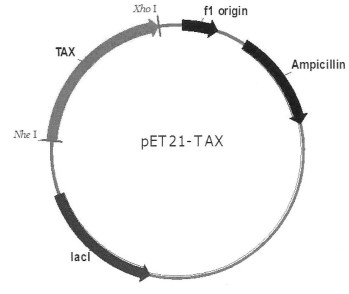
【 1 c 】



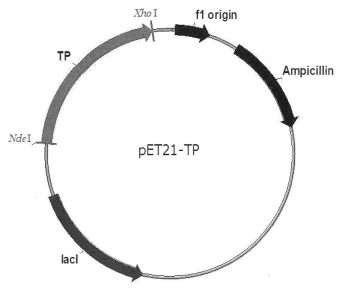
【 1 b 】



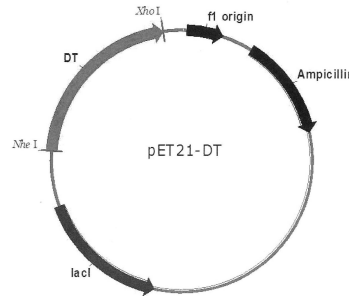
【 1 d 】



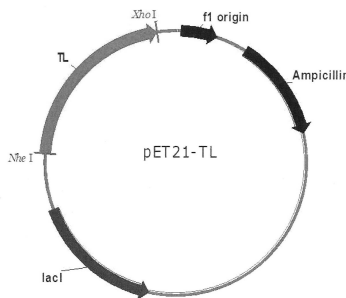
【 1 e 】



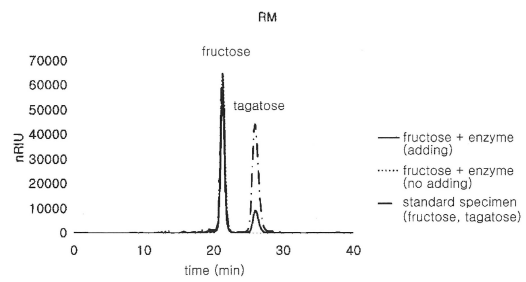
【 1 g 】



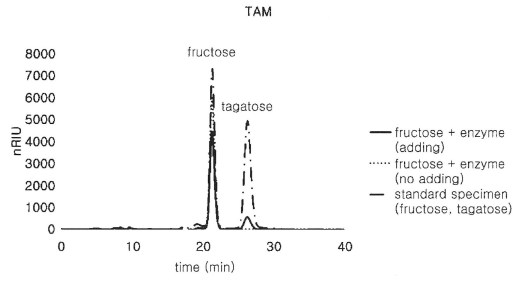
【 1 f 】



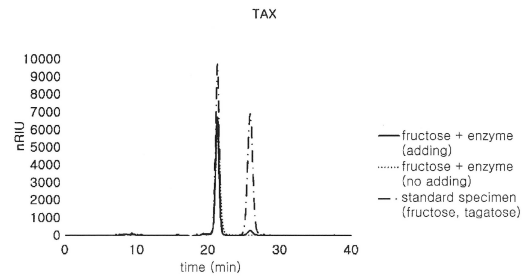
【 2 a 】



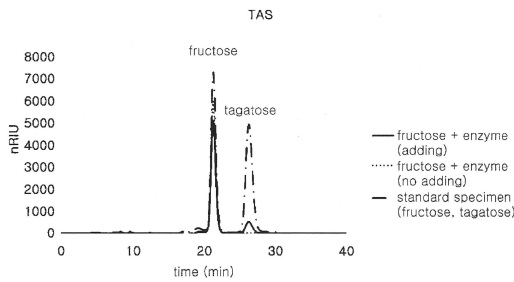
【 2 b 】



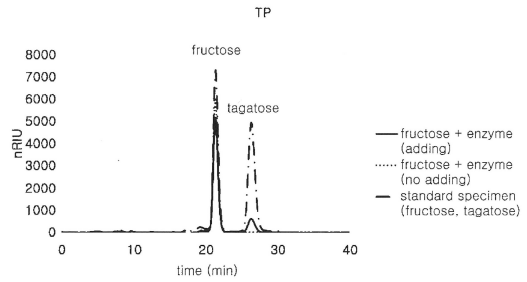
【 2 d 】



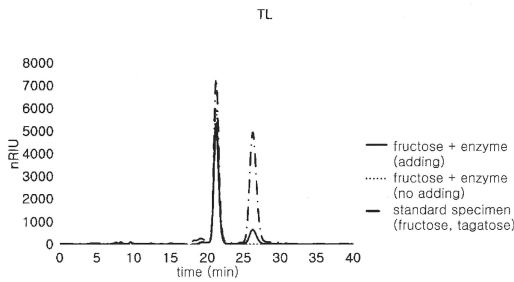
【 2 c 】



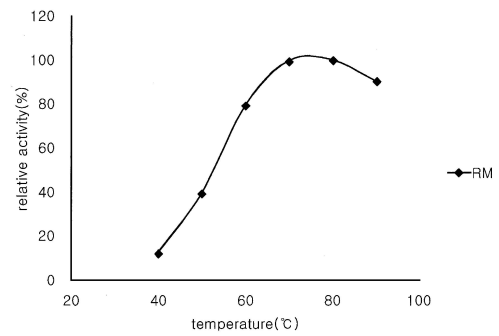
【 2 e 】



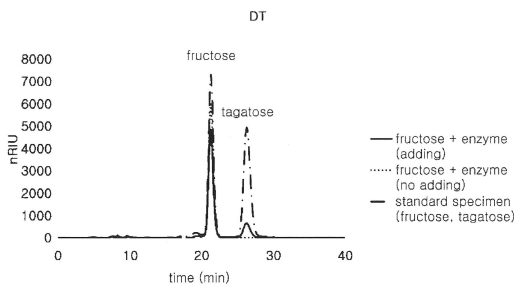
【 2 f 】



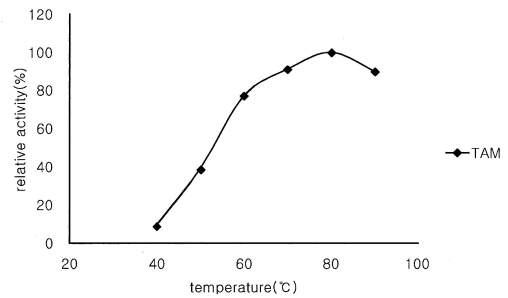
【 3 a 】



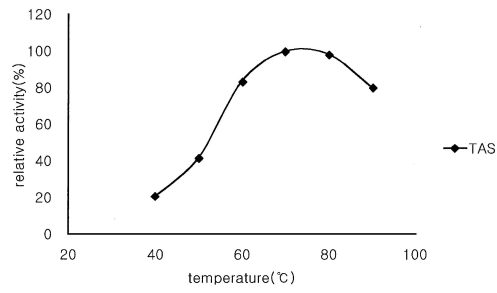
【 2 g 】



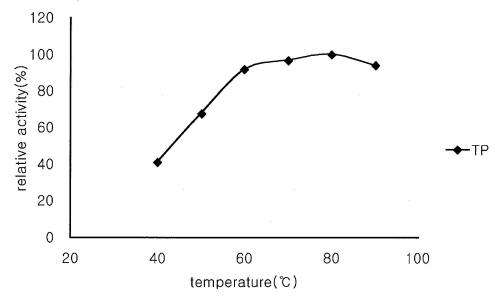
【 3 b 】



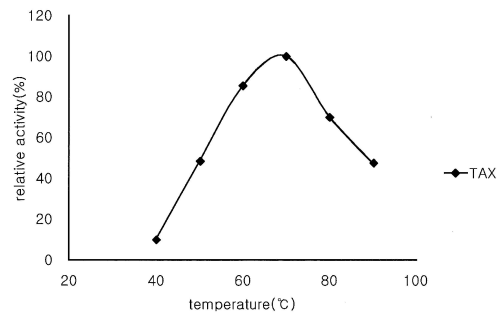
【 3 c 】



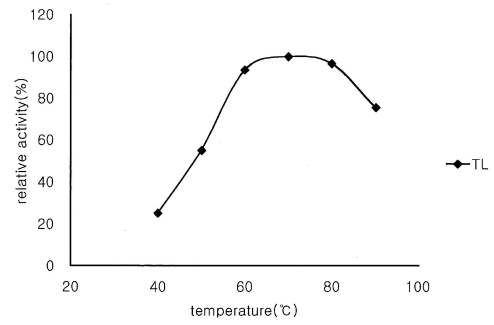
【 3 e 】



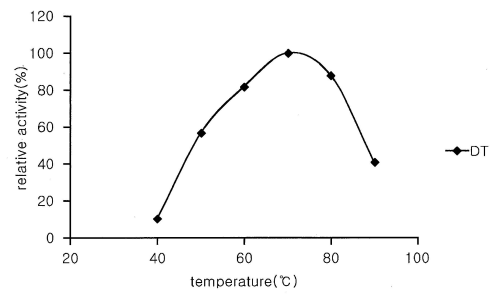
【 3 d 】



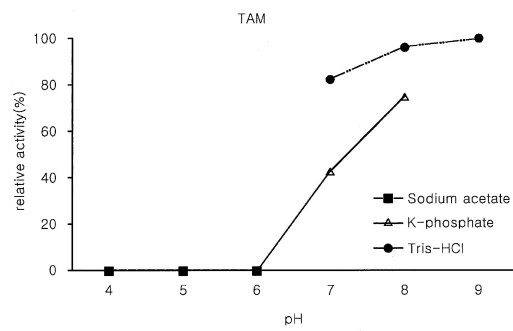
【 3 f 】



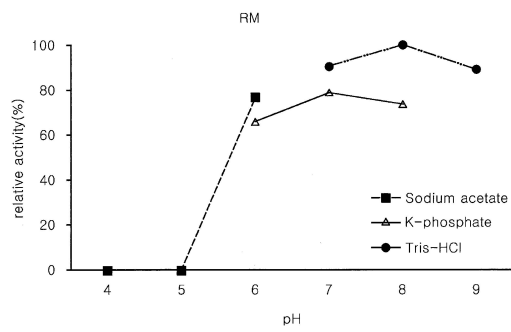
【 3 g 】



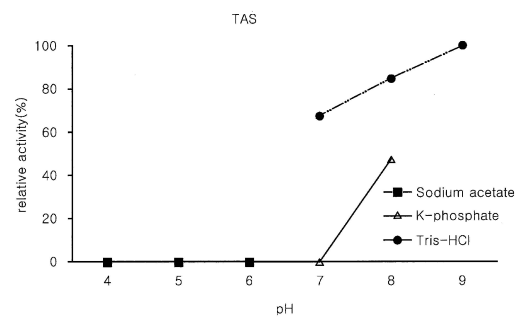
【 4 b 】



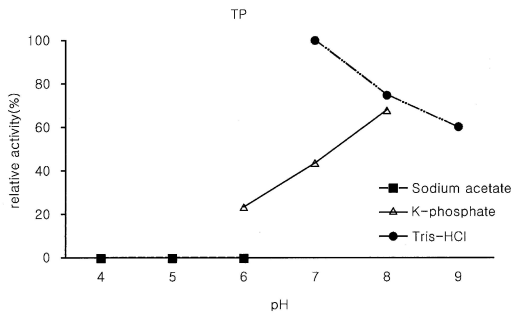
【 4 a 】



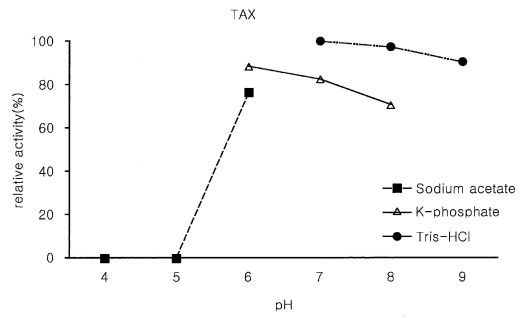
【 4 c 】



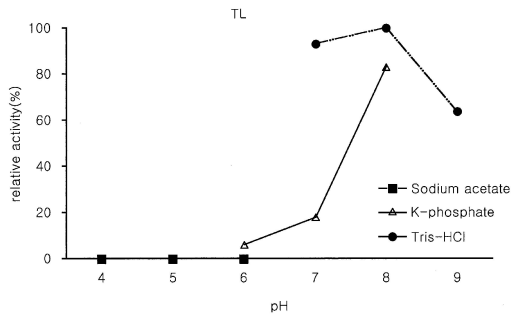
【 4 d 】



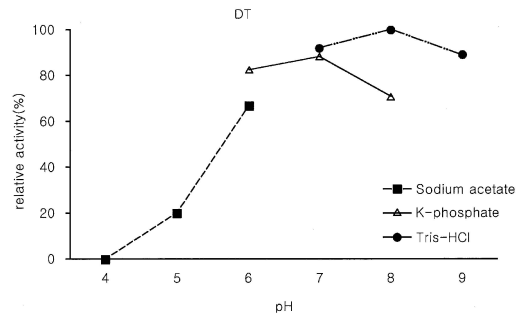
【 4 f 】



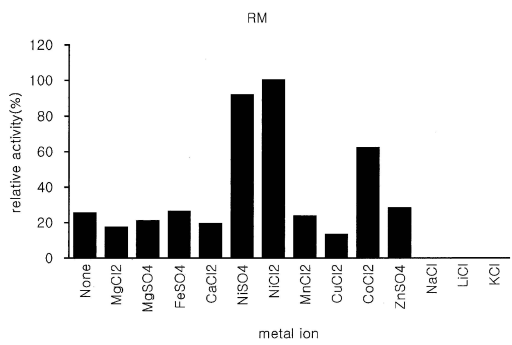
【 4 e 】



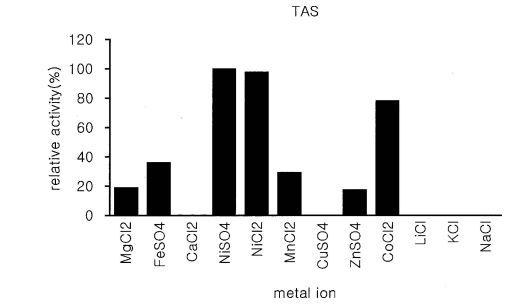
【 4 g 】



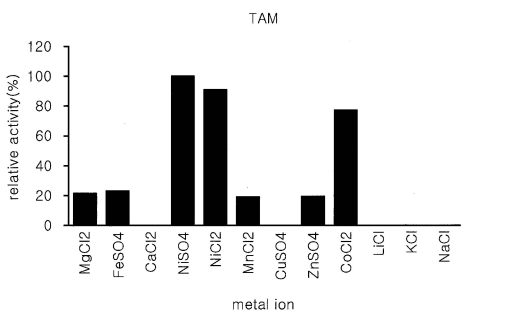
【 5 a 】



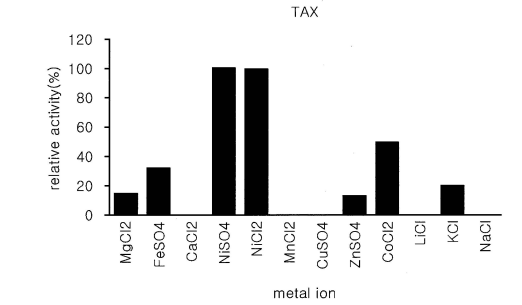
【 5 c 】



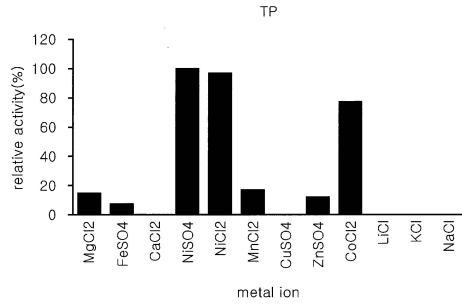
【 5 b 】



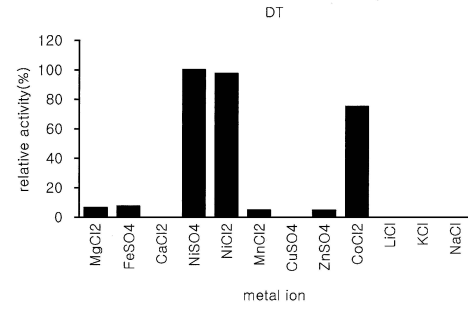
【 5 d 】



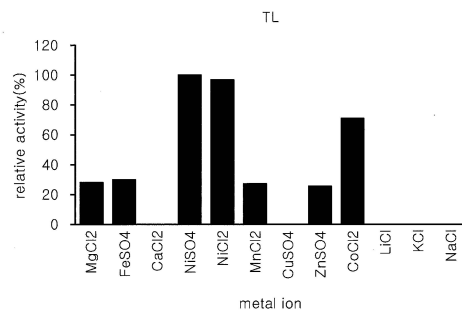
【 5 e 】



【 5 g 】



【 5 f 】



【 6 a 】

A amino acid sequence of protein derived from *Rhodothermus marinus*

```

M V T V L Q T L L Q R P R P L A E I D R A A L A R F L T D L I R Q Q V Y P A S L
E P T S E G V F F L A R D G R E K R L G I L S E A G L H D F E G A R H Q L S L D
G R T L I F Q S C P L T A A N A R A L R Q H L A W T A P R P L G L R A S V G C
G D R L G L A T P G H V R A V R K H K L A P V F A Q Q S I R E M T R T G R T P
Q Q V L D E A M W G V F Q E G W R Q G Y G A D A D H L K T E E D A D R C I
E A G F T F T I D P S A Y V D N E V D T A D A A T L E A K V A A L P W D A L
E T T L A D L R R A Y L G Q H F V G P Y E L S F E E R T L L Q A L A K Y G G A
I A H T A R V Y R H I A G R M G N R P F E L E M S V D E T E V P T S P A E H F
F V A R E L Q R L G V R W I S L A P R F V G R L E K G V D Y I G D L E E F E A H
L K L H V A I A R T L G P Y K L S L H S G S D K F A L Y P L F A R H A G E L F H
L K T A G T S Y L E A L R A V A E L D P P L F R E I L D F A R D R Y E T D R A T Y
H V S A L L E R V P K A S D V P D D A L P A L L E Q F D T R Q V L H V T F G S
V L T A D A D G R P R F R D R L L A V L Q E N E E T Y R L L E A H F D R H L
A P F D A K
    
```

【 6 b 】

A amino acid sequence of protein derived from *Thermotoga petrophila*

```

M V L K V F K D H F G R G Y E V Y E K S Y R E K D S L S F F L T K G E E G K I L
V V A G E K A P E G L S F F K K Q R V E G V S F F F C E R N H E N L E V L R K Y
F P D L K P V R A G L R A S F G T G D R L G I T T P A H V R A L K D S G L F P I
F A Q Q S V R E N E R T G R T W R D V L D D A T W G V F Q E G Y S E G F G A
D A D H V K R P E D L V S A A R E G F T M F T I D P S D H V R N L S K L T E K
E R N E K F E I L R K E R I D R I Y L G K K Y S V L G E K I E F D E K N L R D A
A L V Y Y D A I A H V D M M Y Q I L K D E T P D F D F E V S V D E T E T P T S
P L F H I F V V E E L R R R G V E F T N A L R F I G E W E K G I D Y K G D L A
Q F E R E I K M H A E I A R M F E G Y K I S L H S G S D K F S V Y P A F A S A T
G G L F H V K T A G T S Y L E A V K V I S M V N P E L F R E I Y R C A L D H F E
E D R K S Y H I S A D L S K V P E V E K V K D E D L P G L F E D I N V R Q L I H
V T Y G S V L K D A S L K E R L F K T L E Q N E E L F Y E T V A K H I K R H V D
L L K G
    
```

【 6 c 】

A amino acid sequence of protein derived from *Thermotoga lettingae*

```

M A E N I V E K F E K L F K G K Y K I Y S S I R K L E K S F F F M I R D Q K Q K
Y L I S I A K R I C E K F E G K K I G R I N D L D I L M C P T N D Y N C K V I R
T L F N I N P S V C K K N T S F G F G D R L G L A T P A H T T L I N K Y D V F P
V L A Q Q S V R E L S R T R H N F K D V L D S A I W G I F E S G Y E G E F G A
D A D H V K D I N D L M Q A A Y E G Y S M Y T V D P S D H V K N I D K I N Q
G E L V F E Y K S H P L R K E I E M I Y S G K V F S F E K S K F T M E D K E L F R
I F V T Y V D A I E H V V K C Y E A I K N T K K N F D F E V S I D E T S I P T S P
L A H I F I V H E L R R R G V D F Q T L A L R F V G W Q K A I D Y I G D L S V
L E S E L S M H C E I V K S L S G Y R L S L H S G S D K F S V Y R I F T H Y C D
G K L H V K T A G T S Y L E A I R T V A E A S P S L Y R N I H K Y A L T C F E K
D N T S Y H V T A D I N K I P D V D N V E D S K V V N L L D I P E V R Q L I H I
T Y G S V L T E K I N G K Y L F R D E I Y R I L H E N E F L H Y K R I R D H L G K
H L E L L K N
    
```

【 6 d 】

A amino acid sequence of protein derived from *Thermoanaerobacter mathranii*

```

M V E K S I L E K L T D F L L N H S F V L Y P N S L R K L K E D T Y I F V A K K D
A D K K I G I L T K E N F K L T S P Y F V E D K N V K E I D F Y L N L Y P L S F E
N Y L I L K N F G I S P T P C R Q K S S F G T G D R L G L V T P A H I V A L K E
Y P V F P V L A Q Q S P R E L E K T H R D F K D A L L K V I L G V L E A G Y T G
E F G A D A D H I K D E K Y L L R A I E A G Y T M Y T L D V S E L L T K I L D I S
S N Q V M Q I S P Q S K E I I E A F K G K K I S I S E E E Y T I R E D E L Y K S A L
I Y E K A M N F V E K V Y S I L K E K V K D F D L E I S I D E G E K D T T V E D H
I F V A E Y L H K K G I D F W S L A P K F P G E F Q K A I D Y K G D I N K F A V
E L K K H Y A I S Q Q L G G Y K L S L H S G S D K F S I Y E I F S E V T Q H S F H
I K T S G T S W L Q A V N L I F E K N K K L F Y E L Y K I A L N N L E E S K K A Y
K V L I D K D D F A E E P N L E N V Q I L S Q P E I K Q L F H I S Y G V L L D E K
K E E I Y D V L D K Y E E E H Y Q F V S A N I K N H L G K I F N N
    
```

【 6 e 】

A amino acid sequence of protein derived from *Dictyoglomus turgidum*

```

M L K L L N E S L K P L S I F I Y S E S L R K I N D D L Y I F V A K I K D L K K I G
I V K Q N Q I L Y F S S P Y F S E D K K I E G T N F L V N L Y P L N F E N Y Q K L
K E I I P I S P K V C D K K I S F G T G D R L G L I T S A Q L S A L K E Y D L F P I
L A Q Q S P R E L I K T K R D F K D V L L K S A M G V L E T G Y T G K Y G A D
A D H I K D E K Y L M E A I D A G Y T M Y T L D I S D F I E K I K D L S E K A L
K E K Y E K V S S F S K K I I D K Y A G K R V K I S D E E Y F E L S Y N E L C K S
A I V Y E K A L S F V E M V Y E I L K S K L S E F D I E V S I D E G E R D T T P E
D H F F V A Q F L H D K G I D F K S L A P K F P G E F Q K G I D Y I G D I K E F
E R A L K K H Y A L T K A L E G Y R L S L H S G S D K F S I Y K I F Y K I T E G N
F H I K T S G T S W L E A V K V I A K F F P D L F V E L Y Q I A L E N L E E S K K
A Y K V N I T K E E F P K E I K E D Y M E F L H K D N V R Q L F H I S Y G V L L
D E K R K E I Y D L L N Q K E K E H Y Q Y V S E N I K K H L K N L F E E E
    
```

【 6 f 】

A amino acid sequence of protein derived from *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*

MVGNVSSVLKESGFQIYPDSLRLKLGENTYIFVVKKQKEK
 MIGILSNDELKLEPYFSENKKISDNLQFNVYSFTFDNYV
 TLNGRFHIGPTICRENASFGTGDRGLATAAQLDALKKFN
 VFPILAQQSPRELVKTNRDFKDVLLKVVLVGVLETGYIGHY
 GADADHIKDEKYLLEGIDAGYTM YTLDLSEQLFDVSGAT
 SLEIKEKAKTLDVSRKIVEDFSGKSLNVGFGGHLVSEDEL
 LKSAVAYEAA M KFVEKVN DILKEKLNDFDLEISIDEGGKV
 TTLEDHLFVAEYLHRNGIDFFSIAPKFPGEFEKAIDYVGD
 VNEFERELKKHYDLTKLIGGYKLSLHSGSDKFSIYKIFSQT
 TEKNFHIKTSGT SWLQAVNLIYKSDKEFYRELYKIALSNLE
 ESKKSYKVLIKDDFKDEPELDNSEFIIRPEIKQLFHISFGV
 LLDLKGKEIKDMLYDYE E EHYK M VSDNIENHLKEIFYEK

【 6 g 】

A amino acid sequence of protein derived from *Thermoanaerobacter siderophilus*

MKEELSDYLLKNSFLLYPDSFRRLREDVYIFVAKKDSDDKKI
 GLLTNGNFKLSSPHFAEDKYVEELGFYINLYPLTYENYLIL
 KDNFGISPVTCKEKASFGTGDRGLATPAHIKALKNYNVF
 PVLAAQQSPRELVKTHRDFKDVFLKVLGVLEAGYAGGYG
 ADADHIKDEKYLIEAIDAGYTM YTLDSL DLLVKISD M PK S
 QLKEKAQSLSSQSREIIDRFK GKKFSISTDEDFAVSEDELY
 KSALTYEKAM KFVEKVY GILKDR LQHFDLEISIDEGEKDT
 TVEDHIFVAEYLHRKGDIFWLSLAPKFPGEFQKAIDYKGD I
 KKFTSGLKKHYFLSKKLG GYKLSLHSGSDKFSIYKIFNEIT
 EGNFHIKTSGT SWLQAINIIFERDKDLFNDLYKIALDNLEE
 SKKAYKVLIDRDDFPQTIQTEDSQILLKPEIKQLFHISYGV
 LLDERRKEIYEVLNKYEEHYEFVSKNIENHLKEIFNI

【 配列表 】

0006518761000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100116403
弁理士 前川 純一
- (74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康
- (74)代理人 100162880
弁理士 上島 類
- (72)発明者 キム ヤンヒ
大韓民国 1 6 5 0 7 キョンギド スウォンシ ヨントング セントラルタウンロ 1 0 7 2
0 2 - 6 0 9
- (72)発明者 ヤン スンジェ
大韓民国 1 6 6 8 8 キョンギド スウォンシ ヨントング テジャンロ 4 5 2 0 5 - 1 5
0 4
- (72)発明者 イ ヨンミ
大韓民国 1 6 5 1 6 キョンギド スウォンシ ヨントング グワンジョホスゴンウォンロ 4
5 1 0 0 7 - 2 1 0 5
- (72)発明者 パク イルヒャン
大韓民国 1 6 5 0 6 キョンギド スウォンシ ヨントング セントラルパークロ 1 2 7 ボン
ギル 5 - 1 2 4 0 1
- (72)発明者 キム ソンボ
大韓民国 1 3 5 6 7 キョンギド ソナムシ プンダング ヤンヒョンロ 1 3 8 8 1 0 -
6 0 2
- (72)発明者 チョ ヒュンクグ
大韓民国 0 6 0 6 5 ソウル カンナムグ ソルンロ 7 4 8 2 0 1 - 4 1 0
- (72)発明者 パク スンウォン
大韓民国 1 6 8 9 4 キョンギド ヨンジンシ ジフング グソンロ 4 1 1 8 0 1 - 2 0 0
2

審査官 佐藤 巖

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 9 6 8 1 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 5 / 0 7 6 5 6 3 (W O , A 1)
RANGARAJAN, M. and HARTLEY, B.S., *Biochem. J.*, 1 9 9 2 年, Vol.283, pp.223-233
KIM, H.J. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2 0 1 1 年, Vol.163, No.3, pp.444-451
RODIONOVA, I.A. et al., *Environ. Microbiol.*, 2 0 1 2 年, Vol.14, No.11, pp.2920-2934
hypothetical protein Rmar_1528[Rhodothermus marinus DSM 4252], GenBank/GenPept, Accession no. ACY48415.1, 2 0 1 3 年 1 2 月 1 1 日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, U R L , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACY48415.1?report=girevhist>
conserved hypothetical protein [Pseudothermotoga lettingae TMO], GenBank/GenPept, Accession no. ABV33391.1, 2 0 1 4 年 1 月 2 8 日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, U R L , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABV33391.1?report=girevhist>
hypothetical protein Dtur_0194 [Dictyoglomus turgidum DSM 6724], GenBank/GenPept, Accession no. YP_002352137.1, 2 0 1 4 年 5 月 1 6 日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, U R L , https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_002352137.1?report=girevhist
hypothetical protein Thexy_2043 [Thermoanaerobacterium xylanolyticum LX-11], GenBank/GenPept, Accession no. AEF18057.1, 2 0 1 3 年 1 2 月 3 1 日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, U R L , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEF18057.1?re>

port=girevhist

hypothetical protein Tpet_0480 [Thermotoga petrophila RKU-1], GenBank/GenPept, Accession no. ABQ46504.1, 2014年 1月28日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABQ46504.1?report=girevhist>

conserved hypothetical protein [Thermoanaerobacter mathranii subsp. mathranii str. A3], GenBank/GenPept, Accession no. ADH61429.1, 2014年 1月28日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADH61429.1?report=girevhist>

hypothetical protein ThesiDRAFT1_0550 [Thermoanaerobacter siderophilus SR4], GenBank/GenPept, Accession no. EIV99569.1, 2013年 1月17日, [retrieved on 2018-03-15], Retrieved from the Internet, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIV99569.1?report=girevhist>

BEERENS, K. et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012年, Vol.39, pp.823-834

LI, Z. et al., Beilstein J. Org. Chem., 2013年, Vol.9, pp.2434-2445

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 19/02

C12N 9/90

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/EMBASE/WPIDS(STN)

UniProt/GeneSeq