[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 9/24
C12N 15/56 C12N 15/63
C12P 19/12 C12P 19/14
C07H 3/04

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99123896.6

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1180081C

[22] 申请日 1999.9.10 [21] 申请号 99123896.6

[30] 优先权

[32] 1998. 9.11 [33] JP [31] 258394/1998

[32] 1998.12.11 [33] JP [31] 352252/1998

[32] 1999. 1.26 [33] JP [31] 016931/1999

[71] 专利权人 株式会社林原生物化学研究所

地址 日本冈山县

[72] 发明人 山本拓生 丸田和彦 久保田伦夫
福田惠温 三宅俊雄

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 黄革生

权利要求书 5 页 说明书 80 页 附图 9 页

[54] 发明名称 一种非还原性糖形成酶及利用该酶制备糖类的方法

[57] 摘要

一种非还原性糖形成酶和一种海藻糖释放酶，它们具有适中的温度范围内，即 40 或 45℃以上且 60℃以下的范围内的最适温度；并且具有酸性 pH 范围内，即小于 pH7 的最适 pH。 例如，可通过在营养培养基中培养能够产生这些酶的微生物或通过重组 DNA 技术而以需要的量获得这两种酶。

ISSN1008-4274

1. 一种生产糖类的方法，包括以下步骤:

（a）使还原性的部分淀粉水解物受到非还原性糖形成酶的作用而形成非还原性糖，其中所述非还原性糖形成酶能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且在温育 60 分钟时具有 40℃以上但是低于 60℃的最适温度，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，或者与 SEQ ID NO: 1 至少 80％同源的氨基酸序列；和

（b）从所得混合物中收集生成的非还原性糖或含有该非还原性糖的糖类组合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中步骤（a）还包括使还原性的部分淀粉水解物受到海藻糖释放酶的作用，所述海藻糖释放酶能够特异地水解具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，水解位点在海藻糖结构部分和剩余部分之间的位置，并且当温育 30 分钟时具有 45℃以上但是低于 60℃的最适温度，其氨基酸序列是 SEQ ID NO: 9，或者与 SEQ ID NO: 9 至少 80％同源的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述非还原性糖形成酶具有下面的物理化学特性:

（1）作用

从葡萄糖聚合程度为 3 或更高的还原性部分淀粉水解物形成具海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖;

（2）分子量

根据十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳测得为 75,000±10,000 道尔顿;

（3）等电点

用两性电解质等电电泳，等电点为 4.5±0.5;

（4）最适温度

当于 pH6.0 温育 60 分钟时为 50℃;

（5）最适 pH

当于 50℃温育 60 分钟时为 pH6.0;

（6）热稳定性

当于 pH7.0 温育 60 分钟时，在高达 55℃的温度下稳定;和

（7）pH 稳定性

当于 4℃温育 24 小时时，在 pH5.0 至 10.0 的 pH 稳定。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述非还原性糖形成酶可通过表达一种 DNA 而获得，该 DNA 具有 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，或者其中因遗传密码的简并性而有一个或多个碱基被其它碱基所替代、但并不改变由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列的突变体，或者它们的互补核苷酸序列。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述 DNA 还包括 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列。

6. 根据权利要求 2 的方法，其中所述海藻糖释放酶具有下面的物理化学特性:

（1）作用

在海藻糖结构与其余部分之间的位点特异性地水解具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖;

（2）分子量

根据十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳测得为 62,000±5,000 道尔顿;

（3）等电点

用两性电解质等电电泳，为 4.7±0.5;

（4）最适温度

当于 pH6.0 温育 30 分钟时为 50℃－55℃;

（5）最适 pH

当于 50℃温育 30 分钟时为 pH6.0;

（6）热稳定性

当于 pH7.0 温育 60 分钟时，在高达 50℃的温度下稳定;和

（7）pH 稳定性

当于 4℃温育 24 小时时，在 pH 4.5 至 10.0 时稳定。

7. 根据权利要求 2 的方法，其中所述海藻糖释放酶可通过表达一种 DNA 而获得，该 DNA 具有 SEQ ID NO: 17 所示的核苷酸序列，或者其中因遗传密码的简并性而有一个或多个碱基被其它碱基所替代、但并不改变由 SEQ ID NO: 17 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列的突变体，或者它们的互补核苷酸序列。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述 DNA 还具有 SEQ ID NO: 18 所示的核苷酸序列。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的还原性部分淀粉水解物是葡萄糖多聚化程度为 3 或更高、包含直链淀粉和/或麦芽寡糖、并且可通过将淀粉或淀粉状物质进行酸和/或淀粉水解酶的作用而获得。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中使选自包括α－淀粉酶、β－淀粉酶、葡糖淀粉酶、淀粉脱支酶、环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶和α－葡糖苷酶的组中的一种或多种酶在形成非还原性糖的步骤中进一步作用于该还原性的部分淀粉水解物。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中步骤（a）还包括将所得混合物中的剩余还原性糖氢化形成糖醇的步骤。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中步骤（b）还包括用离子交换剂对所得混合物进行柱层析以除去杂质的步骤。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的非还原性糖是选自包括海藻糖、α－葡糖基海藻糖、α－麦芽糖基海藻糖、α－麦芽三糖基海藻糖、α－麦芽四糖基海藻糖和α－麦芽五糖基海藻糖的组的成员。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述海藻糖通过从所得混合物中进行结晶的步骤而收集。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法，其中所述海藻糖包含选自下组的一个或多个成员：非还原性糖，糖醇，葡萄糖，麦芽糖，麦芽三糖和其它还原性寡糖。

16. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述海藻糖为含水晶体或无水晶体形式。

17. 一种非还原性糖形成酶，它能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且在温育 60 分钟时具有 40℃以上但是低于 60℃的最适温度，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，或与 SEQ ID NO: 1 至少 80％同源的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的非还原性糖形成酶，其具有 SEQ ID NO: 2 或 3 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 17 所述的非还原性糖形成酶，其具有 SEQ ID NO: 4－6 任一所示的氨基酸序列。

20.根据权利要求 17 的非还原性糖形成酶，它具有下面的物理化学特性:

（1）作用

从葡萄糖聚合程度为 3 或更高的还原性部分淀粉水解物形成具海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖;

（2）分子量

根据十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳测得为 75,000±10,000 道尔顿;

（3）等电点

用两性电解质等电点电泳，为 4.5±0.5;

（4）最适温度

当于 pH6.0 温育 60 分钟时为 50℃;

（5）最适 pH

当于 50℃温育 60 分钟时为 pH6.0;

（6）热稳定性

当于 pH7.0 温育 60 分钟时，在高达 55℃的温度下稳定;和

（7）pH 稳定性

当于 4℃温育 24 小时时，在 pH5.0 至 10.0 的 pH 稳定。

21. 根据权利要求 17 所述的非还原性糖形成酶，它来源于微生物。

22. 根据权利要求 21 所述的非还原性糖形成酶，其中所述的微生物是节杆菌属（*Arthrobacter*）的一种。

23. 根据权利要求 22 所述的非还原性糖形成酶，其中所述的微生物是保藏号为 FERM BP－6450 的节杆菌 S34。

24.一种 DNA，其具有 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，或者其中因遗传密码的简并性而有一个或多个碱基被其它碱基所替代、但并不改变由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列的突变体，或者它们的互补核苷酸序列。

25. 根据权利要求 24 所述的 DNA，它具有 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列。

26. 根据权利要求 24 所述的 DNA，它已经插入到可自主复制的载体中。

27. 根据权利要求 26 所述的 DNA，它已经导入到适当的宿主中。

28.一种非还原性糖形成酶，其可通过表达权利要求 24－27 中任一项的 DNA 而获得；该非还原性糖形成酶能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且具有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列，或者与 SEQ ID NO: 1 所示序列至少 80％同源的氨基酸序列。

29. 生产权利要求 17 的非还原性糖形成酶的方法，其中包括步骤:

在营养培养基中培养能够形成所述非还原性糖形成酶的微生物，以便形成所述非还原性糖形成酶；和

从得到的培养物中收集形成的酶。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述的微生物是节杆菌属的种。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述的微生物是保藏号为 FERM BP－6450 的节杆菌 S34。

32. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述的微生物是通过向适当的宿主中导入

权利要求 24 所述的 DNA 而制备的转化体。

33. 根据权利要求 29 所述的方法，其中包括通过选自由透析，盐析，过滤，浓缩，分离沉降，凝胶过滤层析，离子交换层析，疏水层析，反相层析，亲和层析，凝胶电泳，和等电聚焦组成的组中的一种或多种技术收集产生的非还原性糖形成酶的步骤。

一种非还原性糖形成酶及利用该酶制备糖类的方法

技术领域

本发明涉及一种非还原性糖形成酶、一种海藻糖释放酶以及用这些酶制备糖的方法。

背景技术

海藻糖是由2摩尔在其还原性残基上结合的葡萄糖所组成的二糖，并且广泛见于自然界中，例如在微生物、真菌、藻类、昆虫、甲壳类等。由于该糖长期以来被看作是基本上无还原性并具有满意的保湿功能的糖，所以预计其可用于广泛的领域，包括食品、化妆品及药品。然而，尽管其杰出的预期功能，但没有建立该糖有效的制备方法，故这限制了海藻糖的用途。因而，强烈期待能够廉价供应海藻糖。

作为对这种期待的建议，本发明者通过他们的深入研究已经建立了从原料淀粉酶促制备海藻糖的方法。该方法特征在于以下的步骤，即将还原性的部分淀粉水解物经过非还原性糖形成酶的作用，这将由还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且还原性的部分淀粉水解物经海藻糖释放酶的作用，该酶作用于具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖从而水解海藻糖结构部分与其余部分之间的位点。这些酶及其方法公开于由与本发明相同的申请者申请的日本专利公开No. 143,876/95, 213,283/95, 322,883/95, 298,880/95, 66,187/96, 66,188/96, 73,504/96, 84,586/96, 和336,388/96中。因此，获得了海藻糖的廉价制备。

在研究期间，他们获得了独到的发现，即该非还原性糖形成酶可用于新制备非还原性糖，这种方法克服了传统的存在于还原性部分淀粉水解物中的缺陷。作为问题，还原性部分淀粉水解物如糊精和麦芽糖寡糖具有可用作增甜剂及能量补充糖源的优势，但作为其缺点，由于其还原性而与其他物质具有高度反应性和当与氨基酸和/或蛋白共存时易于褐变反应以及容易损坏其质量。为了克服此问题，仅仅知道用高压氢化作用方法等将还原性部分淀粉水解物转换成糖醇的方法。然而，在实际使用中，该方法需要较多的热量和鉴于使用氢的安全

性考虑而建立的装备，这样便导致了更高的成本及较多的劳动力消耗。相反，前述的非还原性糖形成酶按照前面所述作用于还原性部分淀粉水解物，形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且此反应由于为酶促反应而在相对较为温和的条件下进行。利用该酶的作用，本发明者建立了用该酶制备非还原性糖的有效新方法，其可克服存在于还原性部分淀粉水解物中的传统缺陷。由于这些发现，开发 海藻糖及非还原性糖的适当用途充斥于 多个领域。并因此扩大了这些糖的用途且现在显著增加了这些糖在多个领域中的需求。

在这些条件下，在该领域中更加期望制备 海藻糖及具有海藻糖结构的非还原性糖的更为有效的方法。这种期望的关键是建立具有各种最佳条件的非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶，并且提供各种可用于这些糖制备的这些酶的来源。因此，根据可与上述酶联合使用以制备所需糖的另一种酶的最佳条件以及设备和制备糖的最终用途，最佳的酶可选自各种类型的酶，从而导致有效制备这些糖。通常已知的非还原性糖形成酶可分成具有相对较低的大约 40℃或更低最适温度的那些种类和具有相对较高的大约 60℃或更高最适温度的那些种类。尽管通常已知的海藻糖释放酶可分成具有相对较低的大约 45℃或更低最适温度的那些种类和具有相对较高的大约 60℃或更高最适温度的那些种类。然而，至今还没有发现具有大约 50℃适中温度范围最适温度的非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶。

在用于从淀粉原料制备糖的糖相关性酶中，主要的一组酶具有适中温度范围的最适温度。在制备前述海藻糖和非还原性糖的方法中需要这些酶；至今还没有建立具有适中温度范围的最适温度的非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶，从而还没有认识到用这 2 种酶中任意一种或同时用此二者以及上述糖相关性酶以充足的产量制备这些糖的方法。根据用于制备这些糖的设备及其最终用途，需要有在其酶促反应中具有适中温度范围的最适温度的酶。还远不能说已经建立了用非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶以满意的高产量制备糖的方法。如上述，还强烈需要建立具有适中温度范围的最适温度的非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶和用于制备包括非还原性糖在内的糖的方法。

发明内容

鉴于此，本发明的第一个目的是提供具有适中温度范围的最适温度的非还原性糖形成酶。

本发明的第二个目的是提供编码该非还原性糖形成酶的 DNA。

本发明的第三个目的是提供用于制备该非还原性糖形成酶的方法。

本发明的第四个目的是提供具有适中温度范围的最适温度的海藻糖释放酶。

本发明的第五个目的是提供编码该海藻糖释放酶的 DNA。

本发明的第六个目的是提供用于制备该海藻糖释放酶的方法。

本发明的第七个目的是提供能够产生非还原性糖形成酶和/或海藻糖释放酶的微生物。

本发明的第八个目的是提供用该非还原性糖形成酶和/或海藻糖释放酶制备包括非还原性糖的糖的方法。

为了达到上面的目的，本发明者广泛地筛选了土壤中能够实现这些目的的微生物。结果，他们发现，一种从日本 Ako-Shi, Hyogo 的土壤中新分离的微生物，产生的酶能够解决上面的问题。本发明者从该微生物中单独分离出了所需的非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶，并鉴定了其特性，揭示这两种酶均具有适中温度范围的最适温度。对该微生物的鉴定证实其为节杆菌属的一种新的微生物，命名为节杆菌属的种 S34。该微生物于 1998 年 8 月 6 日保藏于国立工业科技与人类技术研究所，Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, 日本，并被接受且以许可号 FERM BP-6450 由该研究所保存。

本发明者继续研究，从该微生物，节杆菌属的种 S34, FERMBP-6450 中分离编码上面鉴定酶的 DNA，破译核苷酸序列，并测定该酶的氨基酸序列。本发明者证实节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 以及其中以常规方式导入了上面所得 DNA 的转化子产生了所需量的酶。同时证实，这样得到的酶可有利地用于在适中温度范围内制备包含海藻糖和具有海藻糖结构的非还原性糖的糖类。本发明根据这些发现得以完成。

本发明的第一个目的是通过新的非还原性糖形成酶加以解决，该酶可以从还原性部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元，并具有适中温度范围的最适温度。

本发明的第二个目的是通过编码非还原性糖形成酶的 DNA 加以解决。

本发明的第三个目的是通过制备非还原性糖形成酶的方法加以解决，该方法特征在于包括培养能够产生该酶的微生物和从培养物中收集所产生的酶的步骤。

本发明的第四个目的是通过一种新的海藻糖释放酶加以解决，该酶特异性地水解具有海藻糖结构作为末端单元并且在海藻糖部分和其余部分之间的一个

位点葡萄糖聚合程度至少为了的非还原性糖，并且具有适中温度范围内的最适温度。

本发明的第五个目的是通过编码海藻糖释放酶的DNA解决。

本发明的第六个目的是通过制备海藻糖释放酶的方法解决，该方法的特征在于包括培养能够产生该酶的微生物和从培养物中收集所产生的酶的步骤。

本发明的第七个目的是通过选自节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450及其突变体的微生物加以解决。

本发明的第八个目的是通过制备糖的方法加以解决，包括以下步骤，即让上面2种酶中任意一种或2种作用于还原性部分淀粉水解物以制备非还原性糖，并收集非还原性糖或具有相对较低还原性且含有非还原性糖的糖组合物。

本发明提供了一种生产糖类的方法，包括以下步骤：（a）使还原性的部分淀粉水解物受到非还原性糖形成酶的作用，该酶能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且在温育60分钟时具有40℃以上但是低于60℃的最适温度，其氨基酸序列为SEQ ID NO: 1，或者与SEQ ID NO: 1至少80％同源的氨基酸序列，或者因一或多个氨基酸的取代、插入和/或缺失而与SEQ ID NO: 1有所不同的氨基酸序列；和（b）从所得混合物中收集生成的非还原性糖或含有该非还原性糖的糖类组合物。

本发明还提供了一种非还原性糖形成酶，它能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且在温育60分钟时具有40℃以上但是低于60℃的最适温度，其氨基酸序列为SEQ ID NO: 1，或与SEQ ID NO: 1至少80％同源的氨基酸序列，或者因一或多个氨基酸的取代、插入和/或缺失而与SEQ ID NO: 1有所不同的氨基酸序列。

本发明还提供了一种DNA，其具有SEQ ID NO: 7所示的核苷酸序列，或者其中因遗传密码的简并性而有一个或多个碱基被其它碱基所替代、但并不改变由SEQ ID NO: 7所示核苷酸序列所编码的氨基酸序列的突变体，或者它们的互补核苷酸序列。

本发明还提供了一种非还原性糖形成酶，其可通过表达上述DNA而获得；该非还原性糖形成酶能够从还原性的部分淀粉水解物形成具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖，并且具有SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列，或者与SEQ ID NO: 1所示序列至少80％同源的氨基酸序列，或者因一或多个氨基酸的取代、插入和/或缺失而与SEQ ID NO: 1有所不同的氨基酸序列。

本发明又提供了一种生产上述非还原性糖形成酶的方法，其中包括步骤:

在营养培养基中培养能够形成所述非还原性糖形成酶的微生物，以便形成所述非还原性糖形成酶; 和

从得到的培养物中收集形成的酶.

本发明最后提供了一种微生物，它是保藏号为 FERM BP－6450 的节杆菌属之种 S34.

附图说明

图 1 显示温度对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的非还原性糖形成酶活性的影响.

图 2 显示 pH 对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的非还原性糖形成酶活性的影响.

图 3 显示温度对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的非还原性糖形成酶稳定性的影响.

图 4 显示 pH 对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的非还原性糖形成酶稳定性的影响.

图 5 为本发明重组 DNA pGY1 的限制性图谱. 粗体线显示来自节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的核苷酸序列. 粗体线内的黑箭头显示编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列，而斜箭头显示编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列.

图 6 为本发明重组 DNA pGY2 的限制性图谱. 粗体线显示来自节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的核苷酸序列. 粗体线内的黑箭头显示编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列.

图 7 为本发明重组 DNA pGY3 的限制性图谱. 黑箭头显示来自节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列.

图 8 显示温度对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的海藻糖释放酶活性的影响.

图 9 显示 pH 对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的海藻糖释

放酶活性的影响。

图 10 显示温度对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的海藻糖释放酶稳定性的影响。

图 11 显示 pH 对来自本发明节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的海藻糖释放酶稳定性的影响。

图 12 为本发明重组 DNA pGZ2 的限制性图谱。粗体线显示来自节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的核苷酸序列。粗体线内的斜箭头显示编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列。

图 13 为本发明重组 DNA pGZ3 的限制性图谱。斜箭头显示来自节杆菌属的种 S34, FERM BP-6450 的核苷酸序列。

具体实施方式

本发明涉及一种非还原性糖形成酶和一种海藻糖释放酶，以及用这 2 种酶中任意 1 种或同时用这二者制备糖的方法。本发明中所称的词语“非还原性糖形成酶”代表具有从还原性部分淀粉水解物形成具海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖这种作用的酶。本发明中所称的词语“海藻糖释放酶”代表能够特异性地水解具有海藻糖结构作为末端单元、葡萄糖聚合程度至少为 3 的非还原性糖、并且水解位点位于海藻糖部分和其余部分之间的酶。本发明中所称的词语“适中温度范围”代表通常用于从淀粉物质通过酶促反应而制备糖的反应温度中的适中温度范围。在这些方法的大多数情况下，使用大约 10℃到 100℃及其周围温度的不同反应温度。本发明的非还原性糖形成酶具有这种酶的功能，并且具有适中温度范围的最适温度，优选具有高于 40℃低于 60℃的温度范围，且更为优选地，除了最适温度外，其具有酸性 pH 范围内的最适 pH。本发明的海藻糖释放酶具有这种酶的功能，并且具有适中温度范围内的最适温度，优选高于 45℃低于 60℃的温度范围，且更为优选地，除了最适温度外，其具有酸性 pH 范围内的最适 pH。本发明的这些酶不应限制其出处和来源。

按照如下测定本发明非还原性糖形成酶的活性：将 1ml 酶溶液加入到 4ml 于 20mM 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）中作为底物的 1.25 w/v%的麦芽糖五糖中，并将混合物于 50℃培养 60 分钟。将此反应混合物加热至 100℃10 分钟从而终止酶促反应，用去离子水将反应混合物准确稀释 10 倍，然后根据 Somogyi-Nelson 方法测定稀释液的还原能力。作为对照，按上述类似地处理已经于 100℃加热 10 分钟而使酶失活的酶溶液。本发明酶的 1 单位活性定义为，当按上述测定方法测

定时，每分钟去除 1μmol 麦芽糖五糖还原能力的酶量．根据此测定方法测定本发明中所称的酶的最适温度。通过以下方法加以测定，即在不同的温度包括 50℃时调节酶促反应温度，使预定量的酶在测定的不同温度作用于底物，根据测定中的不同温度测定还原能力的降低水平，然后对测得的降低水平进行相互比较，确定显示最高活性的本发明酶的最适温度。

按照如下测定本发明海藻糖释放酶的活性：将 1ml 酶溶液加入到 4ml 于 20mM 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）中作为底物的 1.25 w/v%麦芽三糖基海藻糖，即α-maltotetraosyl-α-D-葡萄糖苷中，并将混合液于 50℃培养 30 分钟，然后通过加热 Somogyi 铜溶液而终止酶促反应，并且根据 Somogyi-Nelson 方法测定还原能力。作为对照，用已经于 100℃加热 10 分钟而失活的酶溶液，按上述类似地进行测定。本发明酶的 1 单位活性定义为，当按上述测定方法测定时，每分钟增加 1μmol 葡萄糖还原能力的酶量。根据此测定方法测定本发明中所称的酶的最适温度。通过以下方法加以测定，即在不同的温度包括 50℃时调节酶促反应温度，使预定量的酶在测定的不同温度作用于底物，并且根据测定中的不同温度测定还原能力的增加水平，然后对测得的增加水平进行比较，确定显示最高活性的本发明酶的最适温度。

解释基于此氨基酸序列的本发明非还原性糖形成酶，总体上，该酶具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，并且在有些情况下具有 SEQ ID NO:2 到 6 的氨基酸序列作为其部分序列。除了具有上述整个氨基酸序列的这些酶之外，本发明还包括另几种酶，其包括选自其中任何一种氨基酸序列中的一部分，或同时具有本发明非还原性糖形成酶功能和上述最适温度。这些酶的氨基酸序列的实例有这些，它们在其氨基酸序列内含有与本发明非还原性糖形成酶特性的表达有关的部分氨基酸序列或氨基酸残基，并且其中一个或更多个氨基酸被不同的氨基酸所取代或向其中添加了氨基酸和/或缺失了除上述氨基酸序列或氨基酸残基外的其它氨基酸。在本发明中所称的被不同的氨基酸所取代的氨基酸序列实例包括这些，其中组成 SEQ ID NO:1 氨基酸序列不到 30％并且优选不到 20％的氨基酸序列被具有类似特性和结构的其它氨基酸所取代。这种氨基酸分组的实例有：作为酸性氨基酸组的天冬氨酸与谷氨酸，作为碱性氨基酸的赖氨酸、精氨酸与组氨酸之一，作为酰胺型氨基酸的天冬酰胺与谷氨酰胺之一，作为羟基氨基酸的丝氨酸与苏氨酸之一，作为支链氨基酸的缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸之一。含有选自 SEQ ID NO:1

到6的氨基酸序列中任何一种的一部分的本发明酶其它氨基酸序列的实例有这些，即它们可能与SEQ ID NO:1氨基酸序列具有基本上类似的立体结构，即氨基酸的替代、缺失和/或添加被导入到SEQ ID NO:1氨基酸序列中。该蛋白的立体结构可通过以下方法加以估计，即对市售数据库进行筛选，以获得具有与目的序列有关的氨基酸序列并且已揭示了其立体结构的蛋白质的立体结构，参照选出的立体结构，并且用商业上可得到的软件观看立体结构。本发明非还原性糖形成酶的上述氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少57%，优选至少70%，更为优选至少80%的同源性。

如上所述，该非还原性糖形成酶不应限于特定的出处/来源。这些酶的实例有源自微生物，即节杆菌属微生物，节杆菌属的种S34，FERM BP-6450，及其变异体的那些酶。这些变异体可通过以下方法获得，即用已知的诱变剂，如N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍、甲基磺酸乙酯、紫外线和转座子，以常规方式处理节杆菌属的种S34，FERM BP-6450；筛选能够产生非还原性糖形成酶并且具有适中温度范围的最适温度、通常在高于40℃而低于60℃温度范围的温度具有最适温度的所需突变体。源自节杆菌属的种S34，FERM BP-6450的酶通常具有SEQ ID NO:1到6的氨基酸序列。源自突变体节杆菌属的种S34，FERM BP-6450微生物以及其它微生物的其它非还原性糖形成酶包含SEQ ID NO:1到6的氨基酸序列中任意一种的全部或部分序列。其它酶的具体实例包括作为本发明非还原性糖形成酶起作用、最适温度在适中温度范围中、通常在高于40℃而低于60℃的温度范围中的重组酶。此重组酶可通过对编码本发明非还原性糖形成酶的DNA应用重组DNA技术而得到，可具有SEQ ID NO:1到6的氨基酸序列中任意一种的全部或部分序列。

本发明大多数非还原性糖形成酶具有以下的理化特性:

（1）作用

从葡萄糖聚合程度为3或更高的还原性部分淀粉水解物形成具海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖;

（2）分子量

根据十二烷基磺酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）约为75,000±10,000道尔顿;

（3）等电点（pI）

用两性电解质等电点电泳，约为4.5±0.5;

（4）最适温度

当于pH6.0温育60分钟时大约为50℃;

（5）最适pH

当于50℃温育60分钟时大约为pH6.0;

（6）热稳定性

当于pH7.0温育60分钟时，在高达约55℃的温度下稳定;和

（7）pH稳定性

当于4℃温育24小时时，在大约pH5.0至10.0的pH稳定。

通过下述的制备方法，本发明非还原性糖形成酶可以预定的量获得。

本发明提供了编码本发明非还原性糖形成酶的DNA。这样的DNA在制备重组蛋白形式的酶时十分有用。一般地，此DNA包括编码与本发明非还原性糖形成酶不同出处/来源的酶的那些DNA.这些DNA的实例有含有全部或部分SEQ ID NO:7的核苷酸序列或与其互补序列的那些DNA。包括全部SEQ ID NO:7的核苷酸序列的DNA编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列。含有全部或部分SEQ ID NO:7的核苷酸序列的DNA包括以下DNA，它们具有与本发明非还原性糖形成酶的特性表达有关的氨基酸序列、并且具有相应于该氨基酸序列的核苷酸序列，以及导入了一个或更多个碱基替代、缺失和/或添加而仍然维持与本发明非还原性糖形成酶的特性表达有关的核苷酸序列的SEQ ID NO:7核苷酸序列。根据本发明的DNA应该包括根据遗传密码子的简并而以不同碱基替代一个或更多个碱基的那些DNA。根据本发明的DNA也包括那些含有编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列并且进一步包括选自以下的一个或多个其它附加核苷酸序列的DNA：核糖体结合序列，如起始密码子，终止密码子和Shine-Dalgarno序列；编码信号肽的核苷酸序列，适当限制酶的识别序列；调节基因表达的启动子和增强子核苷酸序列；以及终止子，所以这些序列都常用于重组DNA技术中而用于制备重组蛋白。例如，由于部分及全部的SEQ ID NO:8核苷酸序列作为核糖体结合序列而起作用，故可任意地将部分及全部SEQ ID NO:8核苷酸序列连接到编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列上游的DNA用于制备重组蛋白形式的酶。

如上所述，编码本发明非还原性糖形成酶的DNA不应限制其出处/来源，并且，它们可根据用包含编码本发明酶至少一部分氨基酸序列，如SEQ ID NO:1

氨基酸序列的核苷酸序列的DNA进行的杂交，通过筛选不同来源的DNA而加以制备。这些来源的实例有节杆菌属的微生物，并且优选为节杆菌属的种S34，FERM BP-6450及其突变体，所有这些来源均产生非还原性糖形成酶。为了筛选这些微生物，可以使用该领域中用于筛选或克隆DNA的常规方法，如筛选重组文库的方法、PCR方法及其改进的方法。筛选的结果是所需DNA可以通过按常规方式收集以预期方式杂交的DNA而获得。一般地，这样得到的DNA包括部分或全部SEQ ID NO:7核苷酸序列。例如，包括全部SEQ ID NO:7核苷酸序列的DNA一般从节杆菌属的种S34，FERM BP-6450获得。包括部分SEQ ID NO:7核苷酸序列的DNA可通过类似地从非上述菌株来源的能够产生本发明非还原性糖形成酶的微生物中筛选DNA而获得。通过从用一种或更多种常规突变导入技术而导入上述DNA中一个或更多个碱基替代、添加和/或缺失的DNA中筛选编码具有本发明酶特性酶的DNA，可以制备这样的DNA。也可根据编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列，如SEQ ID NO:7的核苷酸序列，用常规化学合成法而得到此DNA。一旦获得，便可应用或使用PCR方法和可自主复制的载体将本发明DNA扩增至所需的水平。

本发明编码非还原性糖形成酶的DNA包括导入适当载体中的重组形式的DNA。只要该DNA可以得到，那么一般可通过重组DNA技术而相对容易地制备重组DNA。只要其能够在适当的宿主中自主地复制，那么任何类型的载体均可用于本发明中。这些载体的实例有用大肠杆菌作为宿主的pUC18，pBluescript II SK(+)，pKK223-3，λgt. λC等；用芽孢杆菌属微生物的pUB110，pTZ4，pC194，ρ11，ϕ1，ϕ105等；和用2种或更多种微生物作为宿主的pHY300PLK，pHV14，TRp7，YEp7，pBS7等。本发明中将该DNA插入载体中的方法可以是本领域中常用的方法。含有该DNA的基因及可自主复制的载体首先用限制酶消化和/或用超声破碎仪处理，然后连接得到的DNA片段和载体片段。通过用特异性切割该DNA的限制酶，特别是kpnI，AccI，BamHI，BstXI，EcoRI，HindIII，NotI，PstI，SacI，SalI，SmaI，SpeI，XbaI，XhoI等来促进连接。为了连接该DNA片段和载体，如果必要，首先将其退火，然后在体内或体外用DNA连接酶作用。这样得到的重组DNA可在适当宿主中基本上不受限制地复制。

编码非还原性糖形成酶的本发明DNA进一步包括该DNA已导入适当载体中的转化子。通过将该DNA或上述获得的重组DNA导入适当的宿主中将其转化，可容易地制备这些转化子。作为宿主，可以使用来自植物和动物的细胞以及微生物，

它们在本领域中常用，并根据重组DNA中的载体而挑选。作为宿主的微生物包括埃希氏杆菌属、芽孢杆菌属和节杆菌属以及其它放线菌、酵母、真菌等。为了将此DNA导入这些宿主微生物，可以使用常规的感受态细胞方法和原生质体方法。编码非还原性糖形成酶并导入本发明转化子中的DNA可存在于染色体外的分离形式中，或以掺入形式存在于染色体中。掺入宿主染色体中的DNA具有能在其中稳定保持的特征，用于制备本发明重组蛋白比较有利。

本发明海藻糖释放酶可以需要的量通过下面制备酶的方法而得到，该方法特征在于其包括在营养培养基中培养能够产生该酶的微生物和从所得培养物中收集产生的酶。只要其能够产生酶，用于此方法中的微生物可不同于前面的属或种。这些微生物的实例有节杆菌属的微生物，节杆菌属的种S34，FERM BP-6450，其变异体以及可通过将编码该酶的DNA导入到适当的宿主中而得到的转化子。

只要前述的微生物能在其中生长并且产生此酶，则用于培养产生本发明非还原性糖形成酶的任何营养培养基均可使用。一般地，此营养培养基含有碳源和氮源，且如果必要，可加入矿物质。碳源的实例有糖如糊精、淀粉、部分淀粉水解物、葡萄糖等，和如糖蜜和酵母提取物之类含有糖的物质，以及有机酸如葡糖醛酸和琥珀酸。碳源的浓度根据所用的类型加以挑选，一般为30w/v%，并且优选15 w/v%或更低。适用于本发明中的氮源的实例有含有无机氮的物质，如铵盐、硝酸盐等；含有有机氮的物质，如尿素、玉米浆、酪蛋白、蛋白胨、酵母提取物、牛肉提取物等。根据用途，可选择性使用无机成份，如钙、镁、钾、钠，磷酸，锰，锌，铁，铜，钼，钴的盐等。

用于制备本发明酶的培养条件可选择性地使用适用于培养相应微生物的适当条件。例如，用节杆菌属的微生物，包括节杆菌属的种S34，FERM BP-6450的情况时，培养温度一般在20-50℃，优选在25-37℃的范围；培养pH一般在pH 4-10，优选在pH5-9的范围；培养时间在10-150小时的范围。用这些条件，在有氧条件下培养该微生物。当使用通过将编码本发明非还原性糖形成酶的DNA导入适当的宿主中而制备的转化子时，该转化子在下面的有氧条件下培养，如20-65℃的培养温度，pH2-9的培养pH和1-6天的培养时间，尽管它们依微生物的属、种、品系或型以及载体而变化。这样得到的培养物在细胞级分中一般含有本发明酶。在培养通过用芽孢杆菌属微生物作为宿主而得到的转化子时，根据用于转化宿主的载体，得到的培养基在上清液中可能含有本发明酶。这样得到的培养物中

本发明酶的含量通常在每ml培养物中0.01-1,000个单位，尽管其依据所用微生物的属、种、品系以及培养条件而变化。

从得到的培养物中收集本发明非还原性糖形成酶。收集方法没有限制。通过分离和收集任何一种发现具有该酶主要活性的细胞级分和培养物上清，并且如果必要则对收集的级分进行适当的纯化从而收集含有该酶的纯化级分，可以得到本发明酶。为了分离细胞级分与培养物上清，可以任意使用常规的固-液分离方法，如用预先覆盖滤膜和平纹及中空纤维膜进行离心和过滤。从分离的细胞级分和培养物上清中收集所需的级分。对于细胞级分，将细胞破碎成细胞碎片，然后将其分离成细胞提取物和不溶性细胞级分，再收集任意一种所需级分。如果必要，可通过常规方法将不溶性细胞级分溶解。作为裂解细胞的方法，可任意使用任何一种下面的技术，包括超声处理、以细胞壁裂解酶如溶菌酶和葡聚糖酶处理以及机械压力负荷。为了裂解细胞，可以用任何一种上述技术直接处理培养物，然后以任何一种上述的固-液分离方法处理所得混合物以收集液体级分。这样可任意得到细胞提取物。

用于进一步纯化本发明非还原性糖形成酶的方法包括一般纯化糖相关性酶的常规方法，如盐析、透析、过滤、浓缩、凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、反相层析、亲和层析、凝胶电泳和等电点电泳。这些方法可根据目的联合使用。从通过这些方法分离而得到的级分中，收集通过非还原性糖形成酶的方法测得具有所需活性的级分，从而获得纯化至所需水平的本发明非还原性糖形成酶。根据下述实施例中方法，本发明酶可纯化至电泳纯的水平。如上所述，该方法提供以下形式的本发明非还原性糖形成酶，包括培养物、细胞级分、培养物上清级分、细胞裂解物、细胞提取物、可溶和不溶的细胞级分、部分纯化的酶级分和纯化的酶级分形式。这些级分可能含有其它类型的本发明海藻糖释放酶。使用前，这样获得的非还原性糖形成酶可用常规的方式加以固定。固定的方法有，例如结合至离子交换剂上的方法、共价结合/吸附到树脂和膜上，用高分子量物质的截流固定方法。这样获得的非还原性糖形成酶可任意用于制备糖的方法中，包括下述用于制备糖的本发明方法。特别地，由于本发明非还原性糖形成酶具有适中温度范围的最适温度，并且优选具有酸性pH范围内的最适pH，故当其与本发明下述的海藻糖释放酶、具有酸性pH范围内最适pH的淀粉脱支酶和在适中的温度范围中有效发挥作用的环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶联合使用时，其可有利地用

于制备糖。

解释基于此氨基酸序列的本发明海藻糖释放酶，总体上，该酶具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列，并且在有些情况下具有SEQ ID NO:10到16的氨基酸序列作为其部分序列。除了具有上述整个氨基酸序列的这些酶之外，本发明还包括另几种酶，其包括选自其中的任何一种氨基酸序列的一部分或同时具有本发明海藻糖释放酶功能和上述最适温度。这些酶的氨基酸序列的实例有这些，它们在其氨基酸序列内含有与本发明海藻糖释放酶特性的表达有关的部分氨基酸序列或氨基酸残基，并且其中一个或更多个氨基酸被不同的氨基酸所取代或向其中添加了氨基酸和/或缺失了除上述氨基酸序列或氨基酸残基外的其它氨基酸。在本发明中所称的被不同的氨基酸所取代的氨基酸序列实例包括这些，其中组成SEQ ID NO:9氨基酸序列不到30％并且优选不到20％的氨基酸序列被具有类似特性和结构的其它氨基酸所取代。这种氨基酸分组的实例有：作为酸性氨基酸的天冬氨酸与谷氨酸，作为碱性氨基酸的赖氨酸、精氨酸与组氨酸之一，作为酰胺型氨基酸的天冬酰胺与谷氨酰胺之一，作为羟基氨基酸的丝氨酸与苏氨酸之一，作为支链氨基酸的缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸之一。含有选自SEQ ID NO:9到16的氨基酸序列中任何一种的一部分的本发明酶其它氨基酸序列的实例有这些，即它们可能与SEQ ID NO:9氨基酸序列具有基本上类似的立体结构，即氨基酸的替代、缺失和/或添加被导入到SEQ ID NO:9氨基酸序列中。蛋白的立体结构可通过以下方法加以估计，即对市售数据库进行筛选，以获得具有与目的序列有关的氨基酸序列并且已揭示了其立体结构的蛋白质的立体结构，参照选出的立体结构，并且用商业上可得到的软件观看立体结构。本发明海藻糖释放酶的上述氨基酸序列与SEQ ID NO:9具有至少60％，优选至少70％，更为优选至少80％的同源性。

如上所述，该海藻糖释放酶不应限于特定的出处/来源。这些酶的实例有源自微生物，即节杆菌属微生物，节杆菌属的种S34，FERM BP-6450，及其变异体的那些酶。这些变异体可通过以下方法获得，即用已知的诱变剂如N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍、甲基磺酸乙酯、紫外线和转座子，以常规方式处理节杆菌属的种S34，FERM BP-6450；筛选能够产生海藻糖释放酶并且具有适中温度范围的最适温度、通常在高于45℃而低于60℃温度范围的温度具有最适温度的所需突变体。源自节杆菌属的种S34，FERM BP-6450的酶通常具有SEQ ID NO:9到16的氨基酸序列。源自突变体节杆菌属的种S34，FERM BP-6450微生物以及其它

微生物的其它海藻糖释放酶包括SEQ ID NO:9到16的氨基酸序列中任意一种的全部或部分序列。其它酶的具体实例包括作为本发明海藻糖释放酶起作用、最适温度在适中温度范围中、通常在高于45℃而低于60℃的温度范围中的重组酶。此重组酶可通过对编码本发明海藻糖释放酶的DNA应用重组DNA技术而得到，可具有SEQ ID NO:9到16的氨基酸序列中任意一种的全部或部分序列。

本发明大多数海藻糖释放酶具有以下的理化特性:

（1）作用

在海藻糖结构与其余部分之间的位点特异性水解具有海藻糖结构作为末端单元的非还原性糖;

（2）分子量

根据十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)约为62,000±5,000道尔顿;

（3）等电点(pI)

用两性电解质等电电泳约为4.7±0.5;

（4）最适温度

当于pH6.0温育30分钟时大约为50℃－55℃;

（5）最适pH

当于50℃温育30分钟时大约为pH6.0;

（6）热稳定性

当于pH7.0温育60分钟时，在高达大约pH50℃的温度下稳定;和

（7）pH稳定性

当于4℃温育24小时时，在大约pH 4.5至10.0时比较稳定。

通过下述的制备方法，本发明海藻糖释放酶可以预定的量获得。

本发明提供了编码本发明海藻糖释放酶的DNA。这样的DNA在制备重组蛋白形式的酶时十分有用。一般地，此DNA包括编码与本发明海藻糖释放酶不同出处/来源的酶的那些DNA。这些DNA的实例有含有全部或部分SEQ ID NO:17的核苷酸序列或与其互补的序列的那些DNA。包含全部SEQ ID NO:17的核苷酸序列的DNA编码SEQ ID NO:9的氨基酸序列。含有全部或部分SEQ ID NO:17核苷酸序列的DNA包括以下DNA，它们具有相应于与本发明海藻糖释放酶的特性表达有关的氨基酸序列的核苷酸序列，以及导入了一个或更多个碱基替代、缺失和/或

添加而仍然维持与本发明海藻糖释放酶的特性表达有关的核苷酸序列的 SEQ ID NO:17 核苷酸序列。根据本发明的 DNA 应该包括根据遗传密码子的简并而以不同碱基替代一个或更多个碱基的那些 DNA。根据本发明的 DNA 也包括那些含有编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列，并且进一步包括选自以下的一个或多个其它附加核苷酸序列的 DNA：核糖体结合序列，如起始密码子，终止密码子和 Shine-Dalgarno 序列；编码信号肽的核苷酸序列，适当限制酶的识别序列；调节基因表达的启动子和增强子核苷酸序列；以及终止子，所以这些序列都常用于重组 DNA 技术中而用于制备重组蛋白。例如，由于部分及全部 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列作为核糖体结合序列而起作用，故可任意地将部分及全部 SEQ ID NO:8 核苷酸序列连接到编码本发明海藻糖释放酶核苷酸序列上游的 DNA 用于制备重组蛋白形式的酶。

如上所述，编码本发明海藻糖释放酶的 DNA 不应限制其出处/来源，并且，它们可根据用包含编码本发明酶至少一部分氨基酸序列，如 SEQ ID NO:9 氨基酸序列的核苷酸序列的 DNA 进行的杂交，通过筛选不同来源的 DNA 而加以制备。这些来源的实例有节杆菌属的微生物，并且优选为节杆菌属的种 S34，FERM BP-6450 及其突变体，所有这些来源均产生海藻糖释放酶。为了筛选这些微生物，可以使用该领域中用于筛选或克隆 DNA 的常规方法，如筛选重组文库的方法、PCR 方法及其改进的方法。筛选的结果是所需 DNA 可以通过按常规方式收集以预期方式杂交的 DNA 而获得。一般地，这样得到的 DNA 包括部分或全部 SEQ ID NO:17 核苷酸序列。例如，包括全部 SEQ ID NO:17 核苷酸序列的 DNA 一般从节杆菌属的种 S34，FERM BP-6450 获得。包括部分 SEQ ID NO:17 核苷酸序列的 DNA 可通过类似地从非上述菌株来源的能够产生本发明海藻糖释放酶的微生物中筛选 DNA 而获得。通过从用一种或更多种常规突变导入技术而导入上述 DNA 中一个或更多个碱基替代、添加和/或缺失的 DNA 中筛选编码具有本发明酶特性的酶的 DNA，可以制备这样的 DNA。也可根据编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列，如 SEQ ID NO:17 的核苷酸序列，用常规化学合成法而得到此 DNA。一旦获得，便可应用或使用 PCR 方法和可自主复制的载体将本发明 DNA 扩增至所需的水平。

本发明编码海藻糖释放酶的 DNA 包括导入适当载体中的重组形式的 DNA。只要该 DNA 可以得到，那么一般可通过重组 DNA 技术而相对容易地制备重组 DNA。只要其能够在适当的宿主中自主地复制，那么任何类型的载体均可用于本发明

中．这些载体的实例有用大肠杆菌作为宿主的 pUC18, pBluescript II SK(+), pKK223-3, λgt. λC 等；用芽孢杆菌属微生物的 pUB110, pTZ4, pC194, ρ11, ϕ1, ϕ105 等；和用 2 种或更多种微生物作为宿主的 pHY300PLK, pHV14, TRp7, YEp7, pBS7 等。本发明中将该 DNA 插入载体中的方法可以是本领域中常用的方法。含有该 DNA 的基因及可自主复制的载体首先用限制酶消化和/或用超声破碎仪处理，然后连接得到的 DNA 片段和载体片段。通过用特异性切割该 DNA 的限制酶，特别是 kpnI, AccI, BamHI, BstXI, EcoRI, HindIII, NotI, PstI, SacI, SalI, SmaI, SpeI, XbaI, XhoI 等来促进连接。为了连接该 DNA 片段和载体，如果必要，首先将其退火，然后在体内或体外用 DNA 连接酶作用。这样得到的重组 DNA 可在适当宿主中基本上不受限制地复制。

编码海藻糖释放酶的本发明 DNA 进一步包括该 DNA 已导入适当载体中的转化子。通过将该 DNA 或上述获得的重组 DNA 导入适当的宿主中将其转化，可容易地制备这些转化子。作为宿主，可以使用来自植物和动物的细胞以及微生物，它们在本领域中常用，并根据重组 DNA 中的载体而挑选。作为宿主的微生物包括埃希氏杆菌属、芽孢杆菌属和节杆菌属以及其它放线菌、酵母、真菌等。为了将此 DNA 导入这些宿主微生物，可以使用常规的感受态细胞方法和原生质体方法。编码海藻糖释放酶并导入本发明转化子中的 DNA 可存在于染色体外的分离形式中，或以掺入形式存在于染色体中。掺入宿主染色体中的 DNA 具有能在其中稳定保持的特征，用于制备本发明重组蛋白比较有利。

前述用于获得本发明 DNA(包括重组 DNA 和转化子)的技术以及用于获得 DNA 和重组蛋白的技术常用于本领域中;例如，在 J. Sambrook 等编，由冷泉港实验室出版社（1989）出版的“分子克隆实验手册”第 2 版中详细公开了用于获得所需 DNA 的方法和所获得的 DNA 在制备中的应用。例如，日本专利 No. 2,576,970 公开了用目的基因缺陷的微生物作为宿主而稳定转化 DNA 的方法。日本专利公开 No. 157,987/88 公开了可在芽孢杆菌属微生物中有效表达目的 DNA 的一种载体。日本专利公表 No. 502,162/93 公开了稳定导入所需 DNA 至细菌染色体中的方法。日本专利公表 No. 506,731/96 公开了用重组 DNA 技术有效制备淀粉水解酶的方法。日本专利公表 No. 500,543/97 和 500,024/98 公开了用真菌有效制备重组蛋白的宿主—载体系统。常用于本领域中的这些方法可任意用于本发明中。

在本领域中，当所需的 DNA 可用上述方法得到时，通常可提供该 DNA 被导

入适当植物和动物中的转化子，即转基因植物和动物。以DNA形式导入适当载体中、编码非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶的本发明DNA也包括转基因植物和动物。为了得到转基因动物，大体上可通过以下方法获得，即，将仅编码本发明任意一种酶的DNA或者与其它所需DNA（如启动子及增强子）一起，插入根据宿主动物的种类而选择的适当载体中，通过如显微注射和电穿孔方法，或通过用含有该重组DNA的重组病毒的感染方法，将得到的重组DNA导入宿主动物的受精卵或胚胎干细胞。宿主动物的实例有常规实验用啮齿类，如小鼠、大鼠和仓鼠；和常用作家养动物的哺乳动物，如山羊、绵羊、猪和母牛，所以这些均具有容易饲养的优势。将得到的导入有该DNA的细胞移植到与细胞相同种的假孕雌性动物的输卵管或子宫内。之后，从自然产或破腹产新生动物中获得转基因动物，通过杂交或PCR方法证实其中导入有编码本发明酶的DNA。这样便获得了转基因动物形式的本发明DNA。转基因动物的有关内容详细公开于由Masami MATSUMURA, Hiroto OKAYAMA 和Tadashi YAMAMOTO编、由日本东京Yodosha有限公司出版的“Jikken-Igaku-Bessatsu-Shin-Idennshi-Kogaku-Handbook”（遗传工程手册）第269－283页（1996）中。获得转基因植物的方法包括，例如，提供对植物具有感染性的农杆菌属微生物载体，将编码本发明任一种酶的DNA导入该载体中，再将得到的重组DNA导入植物体中或原生质体中，或者以包括编码本发明任一种酶的核苷酸序列的DNA包被重金属颗粒并且直接将包被的颗粒用粒子枪注射入植物体内或原生质体内。尽管各种植物可用作宿主植物，但它们通常包括可食用植物，如土豆、大豆、小麦、大麦、水稻、玉米、番茄、莴苣、苜蓿、苹果、桃、瓜等。通过对上面转化的植物体或原生质体应用杂交或PCR方法，筛选出含有所需DNA的转化子。此转化的原生质体可再生成植物体，作为转基因植物形式的本发明DNA。转基因植物技术一般公开于由Jane K. Setlow编，美国纽约Plenum出版公司出版的《遗传工程》（1994）16卷第93-113页中。前述转基因动植物形式的DNA可用作本发明非还原性糖形成酶和/或海藻糖释放酶的来源，并可用作含有海藻糖或具有海藻糖结构的非还原性糖的食用动植物。

本发明海藻糖释放酶可以需要的量通过下面制备酶的方法而得到，该方法特征在于其包括在营养培养基中培养能够产生该酶的微生物和从所得培养物中收集产生的酶。只要其能够产生本发明海藻糖释放酶，用于此方法中的微生物可为不同的属或种。这些微生物的实例有节杆菌属的微生物，节杆菌属的种S34，FERM

BP-6450，其变异体以及可通过将编码该酶的DNA导入到适当的宿主中而得到的转化子。

只要前述的微生物能在其中生长并且产生此酶，则用于培养产生本发明海藻糖释放酶的任何营养培养基均可使用。一般地，此营养培养基含有碳源和氮源，且如果必要，可加入矿物质。碳源的实例有糖如糊精、淀粉、部分淀粉水解物、葡萄糖等，和如糖蜜和酵母提取物之类含有糖的物质，以及有机酸如葡糖醛酸和琥珀酸。碳源的浓度根据所用的类型加以挑选，一般为30w/v%，并且优选15 w/v%或更低。适用于本发明中的氮源的实例有含有无机氮的物质，如铵盐、硝酸盐等；含有有机氮的物质，如尿素、玉米浆、酪蛋白、蛋白胨、酵母提取物、牛肉提取物等。根据用途，可选择性使用无机成份，如钙、镁、钾、钠，磷酸，锰，锌，铁，铜，钼，钴等的盐。

用于制备本发明海藻糖释放酶的培养条件可选择性地使用适用于培养相应微生物的适当条件。例如，用节杆菌属的微生物，包括节杆菌属的种S34，FERM BP-6450的情况时，培养温度一般在20-50℃，优选在25-37℃的范围；培养pH一般在pH 4-10，优选在pH5-9的范围；培养时间在10-150小时的范围。用这些条件，在有氧条件下培养该微生物。当使用通过将编码本发明海藻糖释放酶的DNA导入适当的宿主中而制备的转化子时，该转化子在下面的有氧条件下培养，如20-65℃的培养温度，pH2-9的培养pH和1-6天的培养时间，尽管它们依微生物的属、种、品系或型以及载体而变化。这样得到的培养物在细胞级分中一般含有本发明酶。在培养通过用芽孢杆菌属微生物作为宿主而得到的转化子时，根据用于转化宿主的载体，得到的培养基在上清液中可能含有本发明酶。这样得到的培养物中本发明酶的含量通常在每ml培养物中0.01-3,000个单位，尽管其依据所用微生物的属、种、品系以及培养条件而变化。

从得到的培养物中收集本发明海藻糖释放酶。收集方法没有限制。通过分离和收集任何一种发现具有该酶主要活性的细胞级分和培养物上清，并且如果必要则对收集的级分进行适当的纯化从而收集含有该酶的纯化级分，可以得到本发明酶。为了分离细胞级分与培养物上清，可以任意使用常规的固-液分离方法，如用预先覆盖的滤膜和平纹及中空纤维膜进行离心和过滤。从分离的细胞级分和培养物上清中收集所需的级分。对于细胞级分，将细胞破碎成细胞碎片，然后将其分离成细胞提取物和不溶性细胞级分，再收集任意一种所需级分。如果必要，

可通过常规方法将不溶性细胞级分溶解。作为裂解细胞的方法，可任意使用任何一种下面的技术，包括超声处理、以细胞壁裂解酶如溶菌酶和葡聚糖酶处理以及机械压力负荷。为了裂解细胞，可以用任何一种上述技术直接处理培养物，然后以任何一种上述的固-液分离方法处理所得混合物以收集液体级分。这样可任意得到细胞提取物。

用于进一步纯化本发明海藻糖释放酶的方法包括一般纯化糖相关性酶的常规方法，如盐析、透析、过滤、浓缩、凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、反相层析、亲和层析、凝胶电泳和等电点电泳。这些方法可根据目的联合使用。从通过这些方法分离而得到的级分中，收集通过海藻糖释放酶的方法测得具有所需活性的级分，从而获得纯化至所需水平的酶。根据下述实施例中方法，本发明酶可纯化至电泳纯的水平。如上所述，该方法提供以下形式的本发明海藻糖释放酶，包括培养物、细胞级分、培养物上清级分、细胞裂解物、细胞提取物、可溶和不溶的细胞级分、部分纯化的酶级分和纯化的酶级分形式。这些级分中可能含有其它类型的本发明非还原性糖形成酶。使用前，这样获得的海藻糖释放酶可用常规的方式加以固定。固定的方法有，例如结合至离子交换剂上的方法、共价结合/吸附到树脂和膜上，用高分子量物质的截流固定方法。这样获得的海藻糖释放酶可任意用于制备糖的方法中，包括下述用于制备糖的方法。特别地，由于本发明海藻糖释放酶具有适中温度范围中的最适温度，并且优选具有酸性 pH 范围的最适 pH，故当其与本发明上述的非还原性糖形成酶、具有酸性 pH 范围内最适 pH 的淀粉脱支酶和在适中的温度范围中有效发挥作用的环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶联合使用时，其可有利地用于制备糖。

本发明提供了通过用本发明前述的酶制备包含非还原性糖的糖类的方法；此方法包括以下步骤：使非还原性糖形成酶和/或海藻糖释放酶作用于还原性部分淀粉水解物以形成非还原性糖，以及收集得到的非还原性糖或具有较低还原性的非还原性糖组合物。在该方法中，一种或更多种其它非本发明非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶以及其它糖相关性酶的使用不应该排除在本发明之外。用于本发明方法中的还原性部分淀粉水解物可以不依赖于其出处/来源而加以使用。本发明中所称的非还原性糖包括一般的非还原性糖，如海藻糖和具有海藻糖结构的糖。

用于本发明制备糖类的方法中的还原性部分淀粉水解物可以，例如通过常

规方法液化淀粉或淀粉状物质而获得。此淀粉包括地面淀粉，如玉米淀粉、水稻淀粉和小麦淀粉；以及地下淀粉，如土豆淀粉、甜菜淀粉和木薯淀粉。为了液化这些淀粉，一般将它们在水中悬浮成淀粉悬液，优选为至少 10w/w%的浓度，并且更为优选具有大约 20 到 50 w/w%的浓度，并且以机械、酸和/或酶处理。使用相对较低程度的液化比较让人满意，优选地，DE（葡萄糖当量）低于 15，更为优选 DE 低于 10。当用酸液化时，用盐酸、磷酸、草酸等处理淀粉，然后在使用前用碳酸钙、氧化钙、碳酸钠等中和得到的混合物至所需的 pH。用酶液化淀粉时，使用α-淀粉酶，特别是热稳定的α-淀粉酶比较让人满意。这样得到的液化淀粉可进一步用α-淀粉酶、形成麦芽三糖的淀粉酶、形成麦芽四糖的淀粉酶、形成麦芽五糖的淀粉酶、形成麦芽六糖的淀粉酶等处理，得到的反应混合物可用作还原性部分淀粉水解物。淀粉相关性酶的特性详细描述于由 Pergamon 出版社出版的《淀粉酶和相关酶手册》，18-81 和 125-142 页（1988）中。

将这样得到的还原性部分淀粉水解物用本发明非还原性糖形成酶和/或海藻糖释放酶作用，并且如果必要，进一步用一种或更多种淀粉相关性酶作用，如α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡糖淀粉酶、淀粉脱支酶如异淀粉酶和支链淀粉酶、环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶(cyclomatodextrin glucanotransferase)、α-葡糖苷酶和β-呋喃果糖苷酶。用于酶促反应的条件为适于所用酶的那些条件；一般地，酶促反应条件选自 pH4-10 和 20-70℃，并且优选 pH5-7 和 30-60℃。特别地，非还原性糖可通过在适中温度范围，即高于 40℃但低于 60℃或高于 45℃但低于 60℃的温度下及微酸性或酸性 pH 条件通过酶促反应而有效制备。使不同酶作用于还原性部分淀粉水解物的顺序没有限制，一种可在另一种酶之前或之后使用，或任意将多种酶同时作用于底物。

根据酶促条件和反应时间以及非还原性糖或含有该糖的较低还原性的糖组合物的最终用途而适当设定酶量。对于本发明非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶而言，前者以大约 0.01 到 100 单位/g 固体还原性部分淀粉水解物的量使用，后者以大约 1 到 10,000 单位/g 固体还原性部分淀粉水解物的量使用。环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶以大约 0.05 到 500 单位/g 固体还原性部分淀粉水解物，d.s.b 的量使用。用这些酶获得的反应混合物一般含有海藻糖、α-葡糖基海藻糖、α-麦芽糖基海藻糖、α-麦芽三糖基海藻糖、α-麦芽四糖基海藻糖或α-麦芽五糖基海藻糖。在上面方法中，当联合使用时，本发明非还原性糖形成酶和海藻糖释放

酶与淀粉脱支酶和环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶一起特征性更多地产生大量的海藻糖和具有海藻糖结构的相对低分子量的非还原性糖。

从得到的反应混合物中，收集非还原性糖和具有较低还原性的糖组合物。在这些制备步骤中，可适当选择通常加工糖的方法。将得到的反应混合物经过滤和离心从而去除不溶性物质，然后用活性炭脱色而纯化得到的溶液，用 H-或 OH-形式的离子交换剂脱盐，并且浓缩成糖浆产物。如果必要，此糖浆产物可进一步纯化成具有较高纯度的非还原性糖；在纯化中，可以使用一种或更多种方法，例如，柱层析分级分离，如离子交换柱层析，用活性炭或硅胶的柱层析；用有机物如丙酮和乙醇的分离沉淀；用具有适当分离能力的膜的分离；和碱处理以分解和去除剩下的还原性糖。特别地，离子交换柱层析可适当地用于本发明中作为工业规模制备目的糖。具有改进纯度的非还原性糖例如，可通过用在日本专利公开 No. 23,799/83 和 72,598/83 中所述的强酸性阳离子交换树脂的柱层析以去除伴生的糖而任意地加以制备。在此情况下，可以利用任何固定床、移动床和半移动床方法。

如果必要，可用淀粉酶如α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡糖淀粉酶和α-葡糖苷酶水解得到的非还原性糖或含有非还原性糖的相对较低还原性的糖类，从而控制其甜度和还原能力或降低其粘度；这样得到的产物可进一步进行以下的处理，其中将剩余的还原性糖氢化成糖醇从而降低其还原能力。特别地，通过使葡糖淀粉酶或α-葡糖苷酶作用于非还原性糖或含有非还原性糖的相对较低还原性的糖类，可容易地制备海藻糖。通过使葡糖淀粉酶或α-葡糖苷酶作用于这些糖从而形成海藻糖和葡萄糖的混合物，并且对此混合物进行前述的纯化方法，如离子交换柱层析，以去去除葡萄糖，可获得高海藻糖含量的级分。高海藻糖含量的级分可任意纯化并且浓缩成糖浆产物。如果必要，此糖浆产物可浓缩成超饱和溶液，然后结晶水合或非水合的晶体海藻糖，并回收得到的晶体。

为了制备水合的晶体海藻糖，将纯度大约 60 w/w%或更高的大约 65-90 w/w%溶液置于结晶仪中，如果必要，在 0.1-20 w/v%晶种存在下，在 95℃或更低的温度下，并且优选在 10-90℃的温度下，逐渐冷却同时搅拌，从而获得含有水合的晶体海藻糖的糖膏。可任意使用连续结晶方法，从而在真空浓缩条件下完成结晶。

常规方法如分离、大块粉碎、流床颗粒化和喷雾干燥可用于本发明中，从

而从糖膏水合晶体海藻糖或含有海藻糖晶体的晶体糖类中分离。

在分离的情况，通常对糖膏进行桶式离心，从而将水合晶体海藻糖与母液分离，如果必要，通过喷洒少量冷水冲洗该水合晶体海藻糖，以利于制备具有较高纯度的水合晶体海藻糖。在喷洒干燥的情况，不具有或基本上不具有吸水性的结晶糖类通过下面方法可容易制备，包括通过高压泵喷头喷洒具有70-85 w/w%浓度（基于干燥固体，dsb）大约20-60％结晶度（基于干燥固体，dsb）的糖膏；用加热至60-100℃而不会融化所得晶体粉末的空气干燥得到的产物；并且老化得到的粉末大约1到20小时，同时向其中吹入热至30-60℃的空气。在大块粉碎的情况，不具有或基本上不具有吸水性的结晶糖类通过下面方法可容易制备，包括使具有10-20％w/w湿度含量和大约10-60％结晶度(d. s. b)的糖膏静置大约0.1到3天从而使全部组分结晶并固化成块；并且粉碎或切割得到的固体块。

为了得到无水结晶海藻糖，将上面得到的水化晶体海藻糖在70-160℃并且优选在80-100℃的温度于正常或减压下干燥；或者将具有不到10％湿度的相对高浓度和含量的海藻糖溶液置于结晶仪中，在晶种存在下于50-160℃并且优选在80-140℃的温度搅拌，从而制备含有非水合晶体海藻糖的糖膏，并且用诸如块粉碎、流床粒化和喷洒干燥之类方法在相对高温和干燥条件下处理此糖膏。

这样获得的非还原性糖或含有该成份并具有相对低还原性的糖组合物具有低的还原性和满意的稳定性；当与其它物质如氨基酸、寡肽或蛋白混合并一起处理时，它们不变成棕色、不产生令人不快的气味，并且不使后面的其它物质变质。即使具有相对低的还原性，但上述的糖仍具有相对低的粘度，并且那些具有平均相对较低葡萄糖聚合程度的糖类具有相对高的质量和甜度。这些糖可任意用于食品、化妆品和药品等领域中，如在以下的日本专利公开中所公开的领域。包括No. 66，187/96，66,188/96，73,482/96，73,506/96，73,504/96，336,363/96，9,986/97，154,493/97，252,719/97，66,540/98，和168,093/98；以及日本专利申请No. 236,441/97，256,219/97，268,202/97，274,962/97，320,519/97，338,294/97，55,710/98，67,628/98，134,553/98和214,375/98，所以这些均由与本发明相同的申请人申请过。

下面的实施例更为详细地描述本发明:

实施例1

能够产生非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶的微生物

本发明者广范地筛选土壤，以分离能够产生非还原性糖形成酶和海藻糖释放酶的微生物．结果，他们从日本Ako,Hyogo的土壤中分离到具有该特性的微生物，并且根据在由Takeji Hasegawa编由日本东京科学学会出版社出版的“Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei”（微生物的分类和鉴定）（1985）中所述的方法加以鉴定。结果如下:

细胞形态学结果

（1）当于37℃在营养琼脂培养基中培养时的细胞特征

通常以0.4-0.5×0.8-1.2um的杆状形式存在；以单一形式存在，但极少数情况下以多态形式存在;

无活动性;

不产芽孢;

非酸性快速；及

革兰氏染色：阳性。

（2）当于37℃在EYG营养琼脂中培养时的细胞特征

显示出杆状和球状的生长周期.

培养特性结果

（1）当于37℃在营养琼脂培养平板中培养时所形成菌落的特征

形状：2天培养后具有大约1-2mm直径的圆形菌落;

边缘：完整;

突出情况：突出;

光泽：潮湿光泽:

表面：平整；及

颜色：半透明或奶黄色。

（2）当于37℃在营养琼脂斜面中培养时形成菌落的特征

生长：满意；和

形状：线样。

（3）当于37℃在具有酵母提取物和蛋白胨的琼脂斜面中培养时形成菌落的特征

生长：满意；和

形状：线样.

（4）当于27℃在营养明胶培养基中穿刺培养时形成菌落的特征

没有液化明胶。

生理特性的结果

（1）甲基红测试：阴性

（2）VP测试：阳性

（3）吲哚的形成：阴性

（4）硫化氢的形成：阴性

（5）淀粉的水解：阳性

（6）明胶的液化：阴性

（7）柠檬酸的利用：阳性

（8）无机氮源的利用：利用硝酸盐但不利用铵盐

（9）色素的形成：无

（10）脲酶：阴性

（11）氧化酶：阴性

（12）过氧化氢酶：阳性

（13）生长范围：在pH 4.5-8.0和20-50 ℃的范围生长；并且最适温度30-45 ℃。

（14）氧气需求：需氧

（15）碳源的利用

L-阿拉伯糖：同化

D-葡萄糖：同化

D-果糖：不同化

D-半乳糖：不同化

L-鼠李糖：不同化

D-木糖：不同化

D-甘露糖：同化

棉籽糖：不同化

海藻糖：不同化

蔗糖：不同化

麦芽糖：不同化

乳糖: 不同化

D-半乳糖醇: 不同化

D-甘露糖醇: 不同化

葡萄糖醛酸: 同化

琥珀酸: 同化

烟酸: 不同化

L-马来酸: 同化

乙酸: 同化

乳酸: 同化

(16)从糖中形成酸

L-阿拉伯糖: 略微形成

D-葡萄糖: 略微形成

D-果糖: 不形成

D-半乳糖: 略微形成

L-鼠李糖: 略微形成

D-木糖: 略微形成

甘油: 略微形成

棉籽糖: 不形成

海藻糖: 略微形成

蔗糖: 略微形成

麦芽糖: 略微形成

乳糖: 不形成

(17)氨基酸的利用

不利用L-谷氨酸钠、L-天冬氨酸钠、L-组氨酸和L-精氨酸。

(18)对氨基酸的脱羧酶测试

对L-赖氨酸、L-鸟氨酸和L-精氨酸为阴性。

(19)脱氧核糖核酸酶: 阴性

(20)细胞壁的N-酰基类型: 乙酰基

(21)细胞壁的主要二氨基酸: 赖氨酸

(22)DNA的鸟嘌呤(G)加上胞嘧啶(C)的摩尔百分数: 71.2%

参照《伯杰氏系统细菌学手册》(Borgey's Manual of Systematic Bacteniology)第二卷（1984），将这些细菌学特性与已知微生物的特性进行比较。结果显示此微生物被鉴定为节杆菌属的新种。根据这些结果，本发明者将此微生物命名为“节杆菌属的种S34”（“Arthrobacter sp S34”）。该微生物于1998年8月6日以FERM BP-6450的许可号保藏于日本国际贸易与工业部工业科技署国立生物科学与人类技术研究所专利微生物保藏中心（1-3, Higashi, 1 chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566）并被接受。

根据《伯杰氏系统细菌学手册》第一卷（1984）中的DNA-DNA杂交方法，检测此鉴定出的微生物与保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC）（美国的国际微生物保藏库）的节杆菌属模式株DNA之间的同源性。示于下表1中的12种模式株分别以正常方式培养，并且从得到的培养物中收集增殖的细胞。通过下述实施例2-1中的种子培养物方法，培养节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450，然后收集增殖的细胞。根据常规方法，从每种模式株微生物中获得DNA，将该DNA的2微克等分液用限制酶PstI消化。将得到的消化的混合物分别点于“Hybond-N+”(一种由Amersham International, Arlington Heights, IL, USA商业化的尼龙膜)上，并且以常规的方式用碱处理，中和并干燥，从而将此DNA固定于尼龙膜上。取从节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450获得的1微克DNA并且用限制酶PstI消化。用由Amersham International, Arlington Heights, IL, USA商业化的 [α-^{32}P]dCTP，和“READY-TO-GODNA标记试剂盒”(一种由Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden商业化的DNA标记试剂盒)，将消化产物用同位素标记以获得探针。将该探针与上述固定于尼龙膜上的DNA在振荡条件下于65℃于“快速杂交缓冲液”（一种Amersham Corp., Div.,Amersham International, Arlington Heights, IL, USA商业化的杂交缓冲液）中杂交2小时。杂交后的尼龙模以常规的方式冲洗、干燥并且以常规方式进行放射自显影。放射自显影中观察到的杂交信号于“IMAGE MASTER”（一种由Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden商业化的图形分析系统上）进行分析，然后数字化表示杂交信号的强度。根据数字，通过以下方法计算来自模式株DNA的点的相对强度（%），即将节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450的DNA点的信号强度看作100，并且用作该微生物与模式株间DNA同源性的指标。结果列于表1中。

表1

微生物菌株	杂交信号强度
黑蓝节杆菌，ATCC 13752	42.0
金黄节杆菌，ATCC 13344	12.4
柠檬节杆菌，ATCC 11624	36.2
成晶节杆菌，ATCC 15481	31.6
球形节杆菌，ATCC 8010	55.1
烟草节杆菌，ATCC 15236	18.8
氧化节杆菌，ATCC 14358	28.3
滋养节杆菌，ATCC 13346	24.6
原玻璃蝇节杆菌，ATCC 19271	29.3
分枝节杆菌，ATCC 13727	98.6
产脲节杆菌，ATCC 7562	42.3
粘节杆菌，ATCC 19584	0.0
节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450	100

如表1中所示，来自分枝节杆菌模式菌株，ATCC 13727的DNA点的杂交信号强度高达98.6%。此数据显示在此实施例中所用的12种模式菌株中，节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450与其中的分枝节杆菌模式菌株，ATCC 13727具有最高的同源性。上述结果显示，节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450为与分枝节杆菌模式菌株，ATCC 13727密切相关的新的微生物。

实施例2

非还原性糖形成酶

实施例2-1

酶的制备

制备由以下成份所组成的营养培养基：1.0 w/v%的“PINE-DEX #4”（一种由Matsutani Chemical Ind.，东京，日本所商业化的糊精）、0.5 w/v%的蛋白

胨、0.1% w/v%的酵母提取物、0.1 w/v%的磷酸二氢钠、0.06 w/v%的磷酸氢二钾、0.05 w/v%的硫酸镁和水，并将培养基调节至pH7.0. 将大约100ml 等分的培养基置于500-ml Erlenmeyer瓶中，然后于120℃高压蒸汽灭菌20分钟并且冷却，然后接种节杆菌属的种 S34， FERM BP-6450种子液，并且在260 rpm的振荡条件下于37℃培养48小时，以获得种子培养物.

除了含有0.05 w/v%的“KM-75”（一种由日本东京Shi-Etsu化工有限公司商业化的抗泡沫剂）外，将与用于种子培养物中的相同的营养培养基大约20升置于30升的发酵罐中，灭菌，冷却至37℃，并且用1v/v%的种子培养物接种至该培养基中，然后在有氧并搅拌的条件下于37℃，及5.5-7.5的pH培养大约72小时.

取样得到的部分培养物并离心，从而分离成细胞和培养物上清. 将细胞超声破碎并且离心，从而从细胞提取物中收集上清. 对每个培养物上清及细胞提取物中非还原性糖形成酶活性的测定显示酶活性相对较低，后者相对于1毫升培养物中显示出大约0.1单位.

实施例 2-2

酶的纯化

将按实施例2-1中方法获得的大约80升培养物以8,000rpm离心30分钟，从而获得大约800克湿重细胞.将湿细胞悬浮于2升10M的磷酸盐缓冲液(pH7.0)中，并且用“MODEL UH-600”（一种日本东京SMT公司商业化的超声匀浆器）处理. 得到的培养物以10,000 rpm离心30分钟，从而获得大约2升的培养物上清. 向此培养物上清中加入硫酸铵并且使其溶解，从而得到0.7的饱和度,使该混合物在4℃静置24小时并以10,000 rpm离心30分钟从而获得沉淀物. 将这样获得的沉淀物溶解于10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）中，并且对与上述同样的新鲜缓冲液制品透析48小时，然后将透析的内部溶液以10,000 rpm离心30分钟从而去除不溶性物质. 将大约1升的所得溶液用装入了大约1.3升“SEPABEADS FP-DA13 GEL”（一种由日本东京Mitsubishi化工有限公司商业化的阴离子交换剂)的柱进行离子交换柱层析.用含有从0M增加到0.6M盐的10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）这种线性梯度缓冲液进行洗脱步骤. 分级分离柱中的洗脱物,分别分析这些级分的非还原性糖形成酶活性.结果发现,在用具有大约0.2M盐浓度的缓冲液洗脱后收集到的级分中发现有异常高的酶活性.

将硫酸铵加入到得到的溶液中以得到1M的浓度，使该混合物在4℃静置12小时，以10,000 rpm离心30分钟从而收集上清．将这样得到的的上清用装入了“BUTYL TOYOPEARL 650M GEL”（一种由日本东京Tosoh公司商业化的疏水凝胶)的柱进行疏水柱层析.所用的凝胶体积大约300ml,用含有1M硫酸铵的10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）平衡后使用．在进样过程中用含有从1M降低到0M硫酸铵的10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）线性梯度缓冲液进行洗脱步骤．分级分离柱中的洗脱物，并且分别分析这些级分的非还原性糖形成酶活性．结果，在以具有大约0.75M盐浓度的缓冲液洗脱后收集到的级分中发现有异常高的酶活性，将这些级分合并在一起．

将获得的溶液于10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）中透析，将所得透析过的内部溶液以10,000 rpm离心30分钟从而收集上清，然后将此上清用装入大约40ml“DEAE TOYOPEARL 650S GEL”（一种由日本东京Tosoh公司商业化的阴离子交换剂）的柱进行离子交换柱层析．在进样过程中用含有从0M增加到0.2M的线性盐水溶液进行洗脱步骤．分级分离柱中的洗脱物，并且分别分析这些级分的非还原性糖形成酶活性．结果，在以具有大约0.15M盐浓度的缓冲液洗脱后收集到的级分中发现有异常高的酶活性．将这样得到的溶液进一步用装入了大约380ml“ULTROGEL^{R} AcA44 GEL”（一种由法国Sepracor/IBF s.a. Villeneuve la Garenne商业化的用于凝胶柱层析的凝胶）的柱进行凝胶柱层析，然后收集具有所需酶活性的级分．上述纯化步骤中非还原性糖形成酶活性、比活性和产率的水平列于表2中．

表2

纯化步骤	非还原性糖形成酶活性	比活性（单位/mg蛋白）	产率（%）
细胞提取物	8,000	-	100
以硫酸铵盐析后透析内部溶液	7,500	0.2	94
来自SEPABEADS柱的洗脱物	5,200	0.7	65
来自疏水柱的洗脱物	2,600	6.3	33
来自TOYO PEARL的洗脱物	910	67.4	11
凝胶过滤洗脱物	59.0	168	0.7

将从上面凝胶过滤层析中洗脱和收集的溶液以常规方式用7.5 w/v%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，得到单一的蛋白条带。该数据显示来自此凝胶过滤层析的洗脱物为纯化至电泳纯形式的非还原性糖形成酶纯化标本。

实施例2-3

酶的特性

实施例2-3（a）

作用

制备含有葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖或

麦芽七糖的20%水溶液作为酶底物并且与利用实施例2-2方法获得的非还原性糖形成酶纯化标本的2单位/克底物(d.s.b)混合，在50℃于pH6.0酶促反应48小时。将此反应混合物脱盐，并且用日本东京Mitsubishi化工有限公司商业化的“MCI GEL CK04SS COLUMN”2根层析柱（它们串联使用）进行高效液相色谱（下文简称“HPLC”）分析，然后测定反应混合物的糖组成。用于HPLC的条件和仪器如下：用“CO-8020”（一种由日本东京Tosoh公司商业化的柱烤炉）将柱维持于85℃。以0.4ml/min的流速送入水作为流动相。洗脱结果于“RI-8020”（一种由日本东京Tosoh公司商业化的差动式折射计）上进行分析。结果列于表3中。

表3

底物	反应产物	洗脱时间(分钟)	百分数(%)
葡萄糖	葡萄糖	57.2	100.0
麦芽糖	麦芽糖	50.8	100.0
麦芽三糖	葡糖基海藻糖	43.2	36.2
	麦芽三糖	46.2	63.8
麦芽四糖	麦芽糖基海藻糖	38.9	87.2
	麦芽四糖	42.3	12.8
麦芽五糖	麦芽三糖基海藻糖	35.4	93.0
	麦芽五糖	38.4	7.0
麦芽六糖	麦芽四糖基海藻糖	32.7	93.8
	麦芽六糖	35.2	6.2
麦芽七糖	麦芽五糖基海藻糖	30.2	94.2
	麦芽七糖	32.4	5.8

正如来自表3的结果证明，每个反应的产物基本包括剩余的底物和新形成的非还原性糖：α-葡糖基海藻糖，α-麦芽糖基海藻糖，α-麦芽三糖基海藻糖，α-麦芽四糖基海藻糖，或α-麦芽五糖基海藻糖(在表3，表示为葡糖基海藻糖，麦芽糖基海藻糖，麦芽三糖基海藻糖，麦芽四糖基海藻糖，或麦芽五糖基海藻糖)。在反应混合物中基本没有检测到其它多糖。将非还原性糖占每个反应的产物的百

分数认为和评估为生产率，结果表明葡萄糖多聚化程度为 3 的α－葡糖基海藻糖的产量是相对低的，具有葡萄糖多聚化程度为 4 或更高的糖如麦芽糖基海藻糖，α－麦芽三糖基海藻糖，α－麦芽四糖基海藻糖，和α－麦芽五糖基海藻糖的产量高达约 85％或更高。没有观察到从葡萄糖和麦芽糖形成非还原性糖。

实施例 2－3(b)

分子量

以常用方法，与日本东京日本 Bio-Rad 实验室出售的分子量标记平行试验，利用 10w/v%聚丙烯酰胺凝胶将按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶的纯化样品进行 SDS－PAGE。 在电泳后与分子量标记的位置比较，该非还原性糖形成酶显示分子量约为 75，000±10，000 道尔顿。

实施例 2－3(c)

等电点

利用含有 2w/v％可在 Pharmacia LKB Biotechnology AB，Uppsala,瑞典销售的“AMPHOLINE”(一种两性电解质)的聚丙烯酰胺凝胶，将按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶的纯化样品进行等电点电泳。在等电点电泳后，测量凝胶的 pH，表明非还原性糖形成酶具有约 4.5±0.5 的等电点。

实施例 2－3(d)

最适温度和 pH

利用按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶的纯化样品，检测温度和 pH 对非还原性糖形成酶的活性的影响。当检测温度的影响时，与酶活性的测试类似地进行实验，不同的是在不同温度让酶反应。在 pH 的影响的检测中，与酶活性的测试类似地进行了实验，不同的是利用适当的 20 毫摩尔/升缓冲液在不同 pH 与酶反应。在每个检测中，将每个反应系统中底物还原能力降低水平的相对值(%)计算成它相应的相对酶活性(%)。图 1 显示了温度影响的结果，图 2 显示了 pH 影响的结果。图 1 和 2 的横轴分别显示反应温度和反应 pH。如图 1 所示，当在 pH6.0 温育 60 分钟时，酶的最适温度约为 50℃。也如图 2 所示，当在 50℃温育 60 分钟时，酶的最适 pH 约为 pH6.0。

实施例 2－3(e)

热和 pH 稳定性

利用按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶的纯化样品，检测酶对

热和 pH 的稳定性。根据酶活性的测试的方法，通过利用 20 毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)稀释样品，在预定的温度温育稀释液 60 分钟，冷却温育的稀释液，和确定稀释液中剩余的酶活性，即可检测热稳定性。根据酶活性的测试方法，通过利用具有适当的不同 pH 的 50 毫摩尔/升缓冲液稀释样品，在 4℃温育稀释液 24 小时，调节稀释液 pH 到 pH6，确定稀释液中剩余的酶活性，即可检测酶的 pH 稳定性。图 3 和 4 中分别显示了酶的热和 pH 稳定性的结果。图 3 和 4 的横轴分别显示了酶的温育温度和 pH。如图 3 所示，酶在高达约 55℃的温度下稳定，如图 4 所示，酶在约 pH5.0-10.0 的 pH 范围是稳定的。

这些结果证明，按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶是具有中等温度范围的最适温度的本发明非还原性糖形成酶。

实施例 2－4

部分氨基酸序列

对蒸馏水透析按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶纯化样品的部分，以便获得蛋白质重量约 80 微克的样品用于分析 N－末端氨基酸序列。利用美国，Foster 市， 应用生物系统公司出售的蛋白质序列仪“473A 型蛋白质序列 仪”，分析N－末端氨基酸序列直到N末端的20个氨基酸残基。测序结果揭示出的N末端氨基酸序列是SEQ ID NO: 4的部分氨基酸序列。对10毫摩尔/升Tris-HCl 缓冲液(pH9.0)透析按实施例 2－2 的方法获得的非还原性糖形成酶纯化样品的部分，并且利用日本，东京，Tosoh公司出售的超滤膜“ULTRACENT－30”，以常用的方法浓缩到约1毫克/毫升溶液。在0.2毫升浓缩物中加入10微克日本东京Wako纯化化学工业公司出售的试剂胰蛋白酶“TPCK－TRYPSIN”，使其在30℃反应22小时，以便消化该酶形成肽。通过利用直径3.9毫米和长度150毫米的美国，Milford，Millipore公司，Waters Chromatography Div.，的产品“μBONDASPHERE C18 COLUMN”，将反应混合物进行反相 HPLC，以便分离肽。在大气温度下，利用含有0.1v/v%的三氟乙酸和在60分钟内从24v/v%增加到48v/v%的乙腈的水溶液加在柱中进行洗脱步骤，加洗脱液期间的流速是0.9毫升/分钟。通过在波长210纳米检测吸光值，从而检测从柱中洗脱下来的肽。与其它物质很好分离开的两个肽，即分离出了在约2小时保留时间洗脱的“S5”和在30分钟保留时间洗脱的“S8”，分别真空干燥，在含有50微升0.1v/v%三氟乙酸的50v/v%乙腈水溶液中溶解。将肽溶液进行蛋白质序列分析，以便分析多达 20 个氨基酸

残基。从肽“S5”和“S8”，获得了SEQ ID NO: 5和6的氨基酸序列。

实施例3

编码非还原性糖形成酶的DNA

实施例3－1

基因文库的构建和筛选

除了设定培养的温度和时间分别为27℃和24小时之外，与实施例2－1类似地培养节杆菌S34，FERM BP-6450。

离心培养物以便取出细胞，然后悬浮于适当量的Tris-EDTA-盐缓冲盐(下文中命名为“TES缓冲液”)(pH8.0)中．以占细胞悬浮液体积0.05w/v%的量混合溶菌酶，接着在37℃温育30分钟．在－80℃停留1小时以冷冻得到的混合物，然后与在60℃预热的TES缓冲液和苯酚混合物混合和充分搅拌，冷却和离心收集形成的上清液．在上清液中加入冷乙醇，然后收集形成的沉淀物，在适当量的SSC缓冲液中溶解(pH7.1)，与7.5微克核糖核酸酶和125微克蛋白酶混合，并且在37℃温育1小时．混合得到的混合物并且与氯仿/异戊醇混合搅拌，使其静置，接着收集形成的上层，在该层中加入冷乙醇，并且收集形成的沉淀物．利用冷的70v/v%乙醇漂洗沉淀，真空干燥获得DNA，接着在SSC缓冲液(pH7.1)中溶解，使浓度约为1毫克/毫升，并且在－80℃冷冻。

取50微升的DNA，与约50单位的限制酶KpnI混合，在37℃温育1小时以便消化DNA．根据试剂盒附带的方案，将3微克消化的DNA和0.3微克美国，加里弗尼亚，Stratagene克隆系统销售的质粒载体“pBluescript II SK(+)”利用Takara Shuzo公司，东京，日本销售的“DNA连接试剂盒”连接，称重，反应。根据常规的感受态细胞方法，利用连接产物转化100微升美国，加里弗尼亚，StratageneCloning Systems销售的大肠杆菌菌株“Epicurian Coli XL1-Blue”，由此获得了基因文库。

将这样获得的基因文库接种到含有10克/升胰蛋白胨，5克/升酵母提取物，5克/升氯化钠，75毫克/升氨苄青霉素钠盐，和50毫克/升，5－溴－4－氯－3－吲哚－β－半乳糖苷的琼脂营养培养基平板(pH7.0)上，并且在37℃温育18小时．将培养基上形成的白色菌落约5000个以常用方法固定在Amersham公司，Div.Amersham International，Arlington Heights，IL，美国销售的尼龙膜“HYBOND－N－＋”上．根据实施例2－4中显示的SEQ ID NO: 5氨基酸序列中

的 1－8 个氨基酸残基，化学合成具有 SEQ ID NO: 18 核苷酸序列的寡核苷酸，并且以常用方法，利用[γ-^{32}P]ATP 和 T4 多核苷酸激酶标记，以获得探针。利用该探针，通过常规菌落杂交方法筛选已经固定在尼龙薄膜上和前面获得的菌落。在含有 6×SSC，5×Denhalt 溶液，和 100 毫克/升变性鲸精子 DNA 的杂交溶液中在 65℃进行杂交 16 小时。在杂交后，利用 6×SSC，在 65℃洗涤上面的尼龙薄膜 30 分钟，利用含有 0.1w/v%SDS 的 2×SSC 在 65℃进一步洗涤 2 小时。以常用方法将得到的尼龙薄膜进行放射自显影，然后根据放射自显影观察到的信号，选择与探针强烈杂交的菌落，并且命名为“GY1”，作为转化体。

实施例 3－2

核苷酸序列的译码

根据常用方法，在含有 100 微克/毫升钠形式氨苄青霉素的 L 肉汤培养基(pH7.0)中接种转化体 GY1，并且在振摇条件下，在 37℃培养 24 小时。在完成培养后，通过离心从培养物收集增殖细胞，并且利用常规碱性 SDS 方法处理以便提取重组 DNA。将重组 DNA 命名为 pGY1。利用上面的探针，在常规 Southern 印迹技术上分析重组 DNA，pGY1，并且根据分析的数据，构建了如图 5 所示的限制图谱。如图 5 所示，表明了重组 DNA，pGY1 含有由包括黑线表示的来自节杆菌 S34，FERM BP-6450 的约 5，500 个碱基对(bp)的碱基组成的一段核苷酸序列，并且该重组 DNA 在限制酶 EcoRI 的两个识别位点之间的约 4，000bp 碱基的区域内，含有黑线区域内的黑箭头表示的编码本发明非还原性糖形成酶的核苷酸序列。根据这一结果，利用 EcoRI 完全消化重组 DNA pGY1，然后利用常规琼脂糖凝胶电泳分离和纯化约 4，000bp 的 DNA 片段。利用常规连接方法连接已经利用 EcoRI 消化的美国，加里弗尼亚 Stratagene Cloning System 销售的质粒载体“pBluescript II SK(+)”和该 DNA 片段。利用连接产物，转化美国，加里弗尼亚，Stratagene Cloning System 销售的大肠杆菌菌株“XL1－BLUE”以便获得转化体。以常用方法，从转化体提取重组 DNA，以常规方法证实它含有包括约 4000bp 碱基的前面所述 DNA 片段，并且命名为“pGY2”。导入了“pGY2”的转化体命名为“GY2”。

以常用的二脱氧方法分析重组 DNA pGY2 的核苷酸序列，表明它含有包括起源于节杆菌 S34，FERM BP-6450 的 3252 个碱基对的 SEQ ID NO: 19 核苷酸序列。核苷酸序列编码如 SEQ ID NO: 19 平行所示的氨基酸序列。比较实施例 2－4 所证实作为本发明非还原性糖形成酶部分氨基酸序列的氨基酸序列 SEQ ID NO: 4

－6，发现 SEQ ID NO: 4－6 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 19 中的氨基酸 2－21，619－638，和 98－117 完全一致。这些数据表明，实施例 2 中获得的本发明非还原性糖形成酶包括 SEQ ID NO: 19 的氨基酸 2－757，或具有 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列，并且 SEQ ID NO: 19 的碱基 746－3013 的核苷酸序列，或 SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列编码节杆菌 S34 ，FERM BP-6450 的酶。重组 DNA pGY2 的结构在图 6 中。

根据 Lipman, David J. 在科学，227 卷，1，435－1，441(1985)中介绍的方法，利用软件开发公司，东京，日本销售的计算机程序“GENETYX－MAC, VER.8”比较按上面实施例 2 的方法获得的本发明非还原性糖类形成酶的氨基酸序列和具有非还原性糖类形成活性的已知酶的氨基酸序列，以便计算它们的同源性(%)。用作已知酶的酶是来自日本专利公开号 322，883/95 公开的节杆菌 Q36 和根瘤菌 M-11； 日本专利公开号 84，586/96 公开的嗜酸热硫化叶菌和 Sai-kohyo 号 WO95/34642 公开的硫磺矿硫化叶菌 KM1 的酶。如上面的公开物公开的，常用酶的最适温度不在中等温度范围。从 GenBank，，美国国家健康研究所(NIH)生产的 DNA 数据库，以登记号 D63343，D64128，D78001 和 D83245 可获得常用酶的氨基酸序列的信息。在表 4 中是获得的同源性。

表 4

用于氨基酸序列(*)比较的酶的起源	氨基酸序列的同源性
根瘤菌 M-11(D78001)	56.9%
节杆菌 Q36(D63343)	56.6%
硫磺矿硫化叶菌 KM1(D64128)	33.2%
嗜酸热硫化叶菌 ATCC33909(D83245)	31.4%

*: 在圆括号中的是基因库的登记号。

正如表 4 所示，实施例 2 中本发明的非还原性糖形成酶显示与最适温度位于中等温度范围以外的几种常用酶之间，氨基酸同源性最高的是来自根瘤菌 M-11 的酶，为 56.9%。数据表明，本发明的非还原性糖形成酶通常含有与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列至少 57％的同源性的氨基酸序列。对氨基酸序列的比较结果表明，实施例 2 的酶和上面鉴定的四类常用酶具有 SEQ ID NO: 2 和 3 的共同氨基酸序列。实施例 2 的酶具有 SEQ ID NO: 2 和 3 的部分氨基酸序列，因为它们对

应于SEQ ID NO: 1的氨基酸84－89和277－282。用作参照的四类酶具有定位于其对应部分的上述部分氨基酸序列。根据实施例2的任何本发明的酶和作为参照的酶具有从还原性部分淀粉水解物形成有海藻糖结构末端单元的形成非还原性糖类的共有活性的事实，表明有可能SEQ ID NO: 2和3的部分氨基酸序列与这种酶活性的表达相关。这些结果显示，本发明非还原性糖形成酶的特征可能在于含有SEQ ID NO: 2和3的氨基酸序列，并且具有中等温度范围的最适温度。

实施例3－3

利用DNA导入转化体

根据SEQ ID NO: 7核苷酸序列的5'和3'末端，以常用的方法化学合成了具有SEQ ID NO: 20和21核苷酸序列的寡核苷酸。在反应试管中将作为模板的实施例3－2中的100纳克重组DNA pGY2与作为有义和反义引物的85纳克每种寡核苷酸混合，并且将混合物与1.25单位日本，东京，Takara Shuzo公司销售的热稳定DNA聚合酶样品“PYROBEST”以及与5微升样品附带的缓冲液和4微升dNTP混合物混合。将得到的混合物利用无菌蒸馏水加到50微升体积，以便进行PCR。以下面的方式控制PCR的温度，将混合物处理25个连续的温育循环，每个循环包括95℃1分钟，98℃20秒，70℃30秒，和72℃4分钟，并最后在72℃温育10分钟。以常用的方式收集PCR产物DNA，获得约2，300bp的DNA。将这样得到的DNA与从瑞典，Uppsala，Pharmacia LKB Biotechnology AB销售的，已经利用限制酶EcoRI裂解，并且利用日本，东京Takara Shuzo公司销售的“DNA BLUNTING KIT”平端化的“pKK223-3”混合，并且通过常规连接方法连接。然后，以常用方法处理连接产物，以便获得导入了上面含有约2，300bp碱基的DNA的重组DNA。重组DNA的译码表明，它含有分别 在SEQ ID NO: 7核苷酸序列的5'和3'末端加入了核苷酸序列5'－ATG－3'和5'－TGA－3'的核苷酸序列。该DNA被称之为“pGY3”。重组DNA pGY3的结构在图7中。

以常用的方法将重组DNA pGY3导入大肠杆菌LE 392菌株，ATCC33572中，该菌株已经以常用方法感受态化，以便获得转化体。将常用的碱性SDS方法用于转化体以便提取DNA，然后以常用方法确证提取的DNA为pGY3，并且命名为“GY3”。这样即获得导入了编码本发明非还原性糖形成酶的DNA的转化体。

实施例3－4

利用DNA导入转化体

根据在瑞典，Uppsala，Pharmacia LKB Biotechnology AB销售的质粒载体“pKK223-3”中的启动子3'末端下游中的核苷酸序列，以常用方法合成具有SEQ ID NO: 22和23核苷酸序列的寡核苷酸，并且利用T4寡核苷酸激酶磷酸化它们的5'末端。使磷酸化的寡核苷酸退火，并且以常用连接方法与瑞典，Uppsala，药学LKB生物技术AB销售的质粒“pKK223－3”连接，所述的质粒已经利用EcoRI和PstI限制酶裂解。根据常用的方法，在大肠杆菌菌株中导入连接产物，然后培养该菌株，并利用碱性SDS方法处理以便提取DNA。这样获得的DNA具有与质粒载体“pKK223-3”类似的结构，并且在启动子的下游具有EcoRI，XbaI，SpeI和PstI限制酶的识别位点。本发明人命名该DNA为质粒载体“pKK4”。

除了利用含有SEQ ID NO: 24和25核苷酸序列的寡核苷酸以外，以类似于实施例3－3进行PCR，这两个序列是根据SEQ ID NO: 7的5'和3'末端部分核苷酸序列而化学合成得到的。作为PCR产物以常用方法收集DNA以便获得约2,300bp的DNA。利用限制酶，XbaI和SpeI裂解这样得到的DNA，通过常用连接方法与已经利用XbaI和SpeI裂解的上面的质粒载体pKK4进行连接。然后，以常用方法处理连接产物以便获得含有SEQ ID NO: 7核苷酸序列的重组DNA。将该重组DNA命名为“pKGY1”。

利用Horthon，Robert M.在《酶学方法》，217卷，270－279页(1993)报道利用了两步PCR的重叠延伸方法，修饰了上述DNA pKGY1中SEQ ID NO: 7 5'末端前面部分的核苷酸序列。除了利用作为有义和反义引物的SEQ ID NO: 26和27核苷酸序列的寡核苷酸（这些引物根据质粒载体pKK4的核苷酸序列化学合成），和作为模板的上述重组DNA pKGY1之外，类似于实施例3－3进行PCR的第一步骤PCR－A。平行地，，除了利用作为有义和反义引物的SEQ ID NO: 28和29核苷酸序列的寡核苷酸（这两个引物根据SEQ ID NO: 7的核苷酸序列以常用方法分别化学合成），和作为模板的上述重组DNA pKGY1之外，类似于实施例3－3进行PCR的第一步骤PCR－B。以常用方法收集作为第一步骤PCR－A产物的DNA，以便获得约390bp的DNA。以常用方法收集在第一步骤PCR－B中的DNA产物，以便获得约930bp的DNA。

除了利用DNA混合物，即第一PCR－A和第一PCR－B的产物作为模板，作为有义引物的SEQ ID NO: 26核苷酸序列的寡核苷酸序列，和作为反义引物的SEQ ID NO: 30核苷酸序列的寡核苷酸（这两个寡核苷酸根据SEQ ID NO: 7核苷酸序列

以常用方法化学合成）以外，类似于实施例3－3进行PCR第二步骤PCR－A。以常用方法收集作为PCR产物的DNA，以便获得约1，300bp的DNA。

利用限制酶EcoRI和BsiWI裂解第二个PCR－A中的产物DNA，并且以常用方法收集形成的含有约650bp的DNA。以常用方法收集利用EcoRI和BsiWI限制酶裂解上面的重组DNA pKGY1后形成的约6，300bp的DNA。以常用方法连接这些DNA，以常用方法处理连接产物，以便获得含有起源于第二步骤PCR－A、约650bp的DNA的重组DNA。通过常用的二脱氧方法译码DNA，表明获得的重组DNA含有以如上表明以5'末端到3'末端的顺序串联SEQ ID NO: 8的核苷酸序列，5'－ATG－3'代表的核苷酸序列，和5'－TGA－3'代表的核苷酸序列的核苷酸序列。将这样获得的重组DNA命名为“pGY4”。pGY4的结构基本与重组DNA pGY3相同，不同的是pGY4含有SEQ ID NO: 8的核苷酸序列。

利用“BMH71－18mutS”（日本，东京Takara Shuzo有限公司销售的大肠杆菌感受态细胞），以常用的方法导入重组DNA pGY4，以便获得转化体。利用碱性SDS方法处理转化体以便提取DNA，然后以常用方法鉴定pGY4。这样，即获得导入了编码本发明非还原性糖形成酶的DNA的转化体。

实施例4

制备非还原性糖形成酶

实施例4－1

利用节杆菌属的微生物制备酶

根据实施例2－1的方法，通过发酵罐培养节杆菌S34，FERM BP-6450约72小时。在培养后，利用SF膜浓缩得到的培养物以便产生约8升的细胞悬浮液。利用东京Dainippon药学公司销售的超级高压细胞裂解器“MINI－LABO”处理细胞悬浮液以便裂解细胞。离心得到的溶液，获得约8.5升上清液。当测量上清液中的非还原性糖形成活性时，显示1毫升培养物中约0.1单位的酶活性。在上清液中加入硫酸铵，使饱和度达到约0.7，以便盐析出，通过离心收集沉淀物，在10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)中溶解，对同样缓冲液的新鲜制剂透析。除了利用约2升离子交换树脂以外，如实施例2－2所述对所得透析过的内部溶液利用“SEPABEADS FP－DA13 GEL”（日本，东京Mitsubishi化学工业公司出售的阴离子交换器）进行离子交换柱层析，以收集具有非还原性糖形成酶的级分。合并各级分，对含有1摩尔/升硫酸铵的同样缓冲液的新鲜制剂透析，离心得到

的透析过的内部溶液以便收集形成的上清液。除了利用约300毫升凝胶以外，根据实施例2－2所述的方法对上清液进行疏水柱层析，以便收集具有非还原性糖形成酶的级分。然后，证明获得的酶具有在40℃以上但低于60℃的最适温度，即在中等温度范围的温度，并且具有低于pH7的酸性pH范围。

这样，得到了约2，600单位的本发明非还原性糖形成酶。

实施例4－2

利用转化体制备酶

将100毫升含有16克/升聚蛋白胨，10克/升酵母提取物，和5克/升氯化钠的水溶液放置于500毫升Erlenmeyer烧瓶中，在121℃高压蒸汽灭菌15分钟，冷却，无菌调节到pH7.0，并且与10毫克氨苄青霉素钠盐无菌混合，以便获得液体营养培养基。利用实施例3－2中的转化体GY2接种营养培养基，并且在通气－搅拌条件下在37℃温育约20小时，以便获得种子培养物。如种子培养物的情况中一样制备具有与种子培养物所用同样组成的7升培养基，放置于10升发酵罐中，利用70毫升种子培养物接种，接着在通气－搅拌条件下温育约20小时。从得到的培养物中通过常用方法离心收集细胞。在磷酸盐缓冲液(pH7.0)中悬浮收集的细胞，通过超声波处理进行裂解，并且离心除去不溶的物质，接着收集上清液以便获得细胞提取物。对10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)透析提取物。收集得到的透析过的内部溶液，证明它具有非还原性糖形成酶活性，最适温度在中等温度范围，即在40℃以上且低于60℃，并且最适pH在酸性pH范围，即小于pH7。

这样，获得了本发明的非还原性糖形成酶。在这一实施例的培养物中，生产了约0.2单位/毫升培养物的酶。

作为对照，在除了没有含有氨苄青霉素以外，其它组成与上述相同的营养培养基中，于同样条件下培养美国，加里弗尼亚，Stratagene Cloning Systems销售的“XL－BLUE”，大肠杆菌菌株。同样如上所述获得和透析了细胞提取物。在得到的透析过的内部溶液中检测不到非还原性糖形成酶的活性，意味着转化体GY2可用于生产本发明的非还原性糖形成酶。

实施例4－3

利用转化体制备酶

除了利用的是含有1w/v%麦芽糖，3w/v聚蛋白胨，1w/v%“MEAST PIG”（日

本，东京Asahi Breweries有限公司的产品），0.1w/v%磷酸氢二钾，100微克/毫升氨苄青霉素和水的液体营养培养基以外，与实施例4－2相同条件类似地培养实施例3－3中的转化体GY3。利用超声波处理得到的培养物以便裂解细胞，离心得到的混合物以便除去不溶的物质。当在得到的上清液中测试非还原性糖形成酶活性时，发现培养物含有约15个单位/毫升培养物的酶。根据实施例2－2的方法，纯化上清液中的酶，证明得到的纯化样品具有非还原性糖形成酶活性，最适温度在中等温度范围，即40℃以上且低于60℃，并且最适pH在酸性pH范围，即小于7的pH。这样得到了本发明的非还原性糖形成酶。

实施例4－4

利用转化体制备酶

按照实施例4－2所述类似地培养实施例3－4的转化体GY4，不同的是利用含有2w/v%麦芽糖，4w/v%的蛋白胨，1w/v%的酵母提取物，0.1w/v％的磷酸二氢钠，200微克/毫升氨苄青霉素，和水的液体营养培养基。利用超声波处理得到的培养物以便裂解细胞，离心得到的混合物以便除去不溶物质。当测试得到的上清液中的非还原性糖形成酶活性时，发现培养物含有约60单位/毫升培养物的酶。根据实施例2－2的方法，纯化上清液中的酶，证明得到的纯化样品具有非还原性糖形成酶活性，最适温度在中等温度范围，即40℃以上且低于60℃，并且最适pH在酸性pH范围，即小于7的pH。这样获得了本发明的非还原性糖形成酶。

实施例5

海藻糖释放酶

实施例5－1

酶的生产

根据实施例2－1的方法，通过发酵罐培养节杆菌S34,FERM BP-6450。然后，根据实施例2－2的方法，将得到的培养物取样，接着分离样品成细胞和上清液。从细胞中获得细胞提取物。当测试上清液和细胞提取物的海藻糖释放活性时，前者很少展示酶活性，而后者展示了约0.3单位/毫升培养物的酶。

实施例5－2

酶的制备

将根据实施例2－1的方法制备的约80升培养物以8,000rpm离心30分钟，

获得约800克湿重的细胞。在10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)中悬浮2升湿细胞，并且利用“MODEL UH600”（日本，东京MST公司出售的超声波匀浆器）处理。在10，000rpm离心得到的悬浮液30分钟，接着收集约2升的上清液。将上清液与硫酸铵混合，使饱和度达到0.7，接着在4℃停留24小时，在10,000rpm离心30分钟以便获得利用硫酸铵盐析出的沉淀。将沉淀溶解于10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)，对同样缓冲液的新鲜制剂透析48小时，以10，000rpm离心30分钟以便除去不溶物质。对约1升得到的透析过的内部溶液利用约1.3升“SEPABEADS FP－DA13 GEL”（日本，东京，Mitsubishi 化学工业公司销售的阴离子交换剂）进行离子交换柱层析。在上样过程中，利用含有从0摩尔/升升高到0.6摩尔/升的盐的线性10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)进行洗脱步骤。分级分离从柱中洗脱的洗脱物，测试各级分的海藻糖释放酶活性。结果在利用具有约0.2摩尔/升盐浓度的缓冲液洗脱的各级分中明显发现了酶活性，接着合并各级分。

向合并溶液中加入硫酸铵，使浓度达到1M，将混合物在4℃放置12小时，在10,000rpm离心30分钟，以收集上清液。利用装入“BUTYL TOYOPEARL 650M GEL”（日本东京Tosoh公司销售的一种疏水性凝胶）的柱子，对上清液进行疏水柱层析。使用前，将凝胶体积调到约300ml，并平衡于含有1M硫酸铵的10mM磷酸盐缓冲液（pH7.0）中。在上样过程中，利用铵盐水溶液从1M降至0M的线性梯度进行洗脱。对由柱中洗脱下来的洗脱物进行分级分离，分别检测各级分的海藻糖释放酶活性。结果在用铵盐浓度约0.5M的缓冲液洗脱下来的级分中明显发现有酶活性，合并各级分。

合并各组分，对10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)透析，以10,000rpm离心透析过的内部溶液30分钟。然后，收集得到的上清液，并且上样到日本，东京，Tosoh公司出售的阴离子交换剂DEAE－TOYOPEARL 650S－GEL”中。利用在加料过程中盐浓度从0摩尔/升增加到0.2摩尔/升的线性梯度水溶液进行洗脱步骤。分级分离来自柱的洗脱物，分别测试各组分的海藻糖释放酶活性。结果在利用铵浓度约0.15摩尔/升的缓冲液洗脱的各组分中明显发现了酶活性，合并各组分。利用约380毫升法国，Villeneuve la Garenne,Sepracor/IBF s.a.销售的用于凝胶过滤柱层析的凝胶“ULTROGEL® AcA44 RESIN”，对合并的溶液进行凝胶过滤层析，接着收集具有明显酶活性的各组分。各步骤中酶的含量，比活性

和产量在表5中.

表5

步骤	海藻糖释放酶的活性(单位)	比活性(毫克/蛋白质)	产率(%)
细胞提取物	24，000	-	100
在利用硫酸铵盐析出后透析过的内部溶液	22，500	0.6	94
SEPABEADS柱的洗脱物	15，600	2.0	65
疏水柱的洗脱物	6，400	25.3	27
TOYOPEARL柱的洗脱物	4，000	131	17
凝胶过滤后的洗脱物	246	713	1.0

当以常用方法在7.5w/v%聚丙烯酰胺凝胶中电泳时，从上面的凝胶过滤层析洗脱和收集的溶液给出的是单一的蛋白质带．数据表明来自上面获得的凝胶过滤层析的洗脱物是纯化到电泳同质水平的纯化海藻糖释放酶.

实施例5－3

酶的特性

实施例5－3(a)

作用

将按后述实施例8－3方法得到的具有海藻糖结构的非还原性糖类－葡糖基海藻糖，α－麦芽糖基海藻糖，α－麦芽三糖基海藻糖，α－麦芽四糖基海藻糖，α－麦芽五糖基海藻糖；和作为还原性糖类的麦芽三糖，麦芽四糖，麦芽五糖，麦芽六糖，和麦芽七糖中任何一种溶解于水，成为作为底物的2w/v％底物水溶液．将每种底物水溶液与按实施例5－2的方法获得的海藻糖释放酶纯化样品以2单位/克底物d.s.b混合，并且在50℃和pH6.0酶反应48小时．根据实施例2－3(a)的方法，反应产物在脱盐后进行HPLC分析以便计算每个反应产物的糖组成．结果显示于表6中．在表6中，分别将α葡糖基海藻糖，α－麦芽糖基海藻糖，α－麦芽三糖基海藻糖，α－麦芽四糖基海藻糖，和α－麦芽五糖基海藻糖表

示为葡糖基海藻糖，麦芽海藻糖，麦芽三糖基海藻糖，麦芽四糖基海藻糖，和麦芽五糖基海藻糖。

表6

底物	反应产物	洗脱时间(分钟)	组成(%)
葡糖基海藻糖	海藻糖	48.5	16.8
	葡萄糖	57.2	8.2
	葡糖基海藻糖	43.3	75.0
麦芽糖基海藻糖	海藻糖	48.5	44.1
	麦芽糖	50.8	44.4
	麦芽糖基海藻糖	38.9	11.5
麦芽三糖基海藻糖	海藻糖	48.5	40.5
	麦芽三糖	46.2	59.0
	麦芽三糖基海藻糖	35.4	0.5
麦芽四糖基海藻糖	海藻糖	48.5	35.0
	麦芽四糖	42.1	64.2
	麦芽四糖基海藻糖	32.7	0.3
麦芽五糖基海藻糖	海藻糖	48.5	29.5
	麦芽五糖	38.2	70.2
	麦芽五糖海藻	30.2	0.3
麦芽三糖	麦芽三糖	46.2	100.0
麦芽四糖	麦芽四糖	42.1	100.0
麦芽五糖	麦芽五糖	38.2	100.0
麦芽六糖	麦芽六糖	35.2	100.0
麦芽七糖	麦芽七糖	32.6	100.0

由表6的结果明显看出，按实施例5-2中的方法获得的海藻糖释放酶能够特异地水解具有海藻糖结构作为末端单元、葡萄糖聚合化程度至少为3的非还原

性糖，水解位点位于海藻糖结构部分与剩余部分之间，形成海藻糖和葡萄糖聚合化程度为1或更高的还原性糖。而该酶不作用于麦芽糖寡糖，如麦芽三糖和低级糖类。

实施例5－3(b)

分子量

利用10w/v％的聚丙烯酰胺凝胶，对按实施例5－2的方法获得的海藻糖释放酶纯化样品和日本，东京，日本Bio-Rad实验室销售的分子量标记一起进行常规的SDS－PAGE。在电泳后，将凝胶上电泳样品的位置与标记比较，表明样品具有约62，000±5，000道尔顿的分子量。

实施例5－3(c)

等电点

利用含有2w/v％“AMPHOLINE”（瑞典，Uppsala,药学LKB生物技术AB销售的两性电解质）的聚丙烯酰胺凝胶，以常用的方法将按实施例5－2的方法获得的海藻糖释放酶的纯化样品进行等电电泳。在电泳后，测量凝胶的pH，它具有的等电点约4.7±0.5。

实施例5－3(d)

最适温度和pH

检测温度和pH对按实施例5－2方法获得的海藻糖释放酶纯化样品的酶活性的影响。根据酶活性测试法检测温度的影响，不同的是使酶在不同温度反应。根据酶活性测试法检测pH的影响，不同的是利用适当的20毫摩尔/升缓冲液使酶在不同pH反应。在每个方法中，计算每个系统中发现的还原 能力水平提高的相对值(％)，并且作为相对的酶活性(％)。温度和pH的影响结果分别在图8和9。图8和9中的横轴分别显示了酶的反应温度和pH。正如图8所示，当在pH6.0温育30分钟时，酶的最适温度是约50到约55℃，而当在50℃温育30分钟时，酶的最适pH是约pH 6.0。

实施例5－3(e)

对温度和pH的稳定性

检测按实施例5－2的方法获得的海藻糖释放酶纯化样品对温度和pH的稳定性。通过利用20毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)稀释样品，在不同温度温育稀释液60分钟，冷却得到的稀释液，并且测试稀释液中保留的酶活性，从而检测

对温度的稳定性。通过利用不同 pH 的 50 毫摩尔/升缓冲液(pH7.0)稀释样品，在 4℃温育稀释液 24 小时，调节到 pH6，并且测试稀释液中保留的酶活性，从而研究对 pH 的稳定性。温度和 pH 的稳定性结果分别在图 10 和图 11。图 10 和图 11 中的横轴分别显示了酶放置的温度和 pH。正如图 10 所示，酶在高达约 50℃的温度下稳定，而在 pH 范围 4.5 到约 10.0 是稳定的。

前面叙述的结果表明，按实施例 5－2 的方法获得的海藻糖释放酶是最适温度在中等温度范围的本发明的酶。

实施例 5－4

部分氨基酸序列

对蒸馏水透析按实施例 5－2 的方法获得的海藻糖释放酶纯化样品部分，并且制备成含有约 80ng 蛋白质的样品，以用于 N 末端氨基酸分析。利用美国，Foster 市，Applied Biosystems 销售的蛋白质测序仪“473A 型蛋白质测序仪”，分析 N 末端氨基酸序列至 N 末端的 20 个氨基酸残基。揭示的 N 末端氨基酸序列是 SEQ ID NO: 14 的部分氨基酸序列。

对 10 毫摩尔/升 Tris-HCl 缓冲液(pH9.0)透析按实施例 5－2 的方法获得的纯化海藻糖释放酶部分，并且利用日本，东京 Tosoh 公司销售的超滤膜“ULTRACENT－30”，以常用方法浓缩到约 1 毫克每毫升的浓度。在 0.2 毫升的浓缩物中加入 10 微克日本，东京 Wake Pure 化学工业有限公司销售的赖氨酰内肽酶试剂，并且在 30℃温育混合物 22 小时以便消化酶，形成肽。利用美国，MA，Milford，Millipore 公司 Water Chromatography Div. 销售的 4.5 毫米直径和 150 毫米长度的“NOVA－PAK C18 COLUMN”柱，对反应混合物进行反相 HPLC，以便在大气温度下分离肽。在加料过程中，以 0.9 毫升/分钟的速度，用含有从 24v/v%增加到 48v/v%的乙腈的 0.1v/v%的三氟乙酸水溶液线性梯度洗脱 60 分钟进行洗脱步骤。通过在 210 纳米的波长测量，监测来自柱的肽洗脱物。将两个肽，即滞留时间约为 18 分钟、命名为“RT18”和滞留时间约为 33 分钟命名为“RT33”并很好地与其它物质分离的两肽收集，真空干燥，并且分别在含有 200 微升 0.1v/v%三氟乙酸的 50v/v%乙腈水溶液中溶解。将肽溶液经过蛋白质测序仪测序，以便分析每个肽 N 末端的多达 20 个氨基酸残基。SEQ ID NO: 15 和 16 的氨基酸序列分别来自肽 RT18 和 RT33。

实施例 6

编码海藻糖释放酶的 DNA

实施例 6－1

构建和筛选基因文库

根据实施例 3－1，构建节杆菌 S34，FERM BP-6450 的基因文库，并且然后利用菌落杂交方法，在如实施例 3－1 的条件下进行筛选，不同的是利用按下面方法制备的、具有编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列的寡核苷酸作为探针；该探针是以常用方法，通过利用同位素[γ-^{32}P]ATP 和 T4 多核苷酸激酶标记具有 SEQ ID NO: 31 核苷酸序列的寡核苷酸制备的，该寡核苷酸根据含有实施例 5－4 中表明的 SEQ ID NO: 15 氨基酸 12－20 的氨基酸序列经化学方法合成。选择与探针强烈杂交的转化体。

根据实施例 3－2 的方法，从转化体提取重组 DNA，利用上面的探针，通过常规 Southern 影印技术进行分析。根据分析数据制成的限制图谱与实施例 3－1 和 3－2 中获得的重组 DNA pGY1 的图谱一致。正如图 5 所示，表明本实施例中的本发明重组 DNA 在由定位于 PstI 和 KpnI 限制酶的识别位点之间的约 2，200bp 碱基组成的区域内含有斜箭头表示的编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列。利用重组的 DNA pGY1，对编码本发明海藻糖释放酶的 DNA 进行核苷酸序列的译码。

实施例 6－2

核苷酸序列的译码

以常用方法，利用限制酶 PstI 完全消化按实施例 3－2 的方法获得的重组 DNA pGY1。经常规琼脂糖电泳除去得到的混合物中形成的约 3，300bp 的 DNA 片段，收集形成的约 5,200bp 的 DNA 片段。以常用方法进行 DNA 片段的连接反应，将连接产物用于转化“XLI－BLUE”（美国，加里弗尼亚，Stratagene Cloning System 销售的大肠杆菌菌株）。从得到的转化体中以常用方法提取重组的 DNA。证明了重组的 DNA 具有由约 2，200bp 碱基组成的区域。该区域含有编码本发明海藻糖释放酶的核苷酸序列，将该重组 DNA 命名为“pGZ2”。导入了 pGZ2 的转化体称为重组 DNA pGZ2。

常用的二脱氧方法分析重组 DNA pGZ2 的核苷酸序列，表明它含有起源于节杆菌 S34，FERM BP－6450 如 SEQ ID NO: 32 所示由 2，218bp 碱基组成的核苷酸序列。该核苷酸序列可能编码 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列。将氨基酸序列与作为实施例 5－4 中证实的本发明海藻糖释放酶部分氨基酸序列的 SEQ ID NO:

14到16比较。结果是，SEQ ID NO: 14，15和16的氨基酸序列分别与SEQ ID NO: 32氨基酸序列的氨基酸1－20，298－317和31－50一致。数据表明实施例5中的海藻糖释放酶含有SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列，SEQ ID NO: 32中的碱基477－2,201或SEQ ID NO: 17的核苷酸序列编码来自节杆菌S34，FERM BP-6450的该酶。 图12显示了前面所述的重组DNA pGZ2的结构。

根据实施例3－2的方法，相互比较按实施例5的方法获得的本发明海藻糖释放酶的上述氨基酸序列和具有海藻糖释放酶活性的其它常规酶，以便确定它们的同源性(%)。常规酶是起源于日本专利公开号298,880/95公开的节杆菌Q36；日本专利公开号298，880/95公开的根瘤菌M-11；Sai-Kohyo号WO95/34642公开的嗜酸热硫化叶菌ATCC33909和*硫磺矿*硫化叶菌KM1。所有这些酶的最适温度均位于中等温度范围之外。这些酶的氨基酸序列可以从基因库（美国国家健康研究院(NIH)制作的DNA数据库），以登记号D63343，D64130，D78001，和D83245获得。这些同源性的资料显示在表7中。

表7

进行氨基酸序列(*)比较的酶的来源	氨基酸序列的同源性
节杆菌Q36(D63343)	59.9%
根瘤菌M-11(D78001)	59.1%
嗜酸热硫化叶菌 KM1(D64130)	37.7%
*硫磺矿*硫化叶菌 ATCC33909(D83245)	36.0%

*: 圆括号中的数目是基因库的登记号。

正如表7中所示，实施例5中的本发明海藻糖释放酶显示与最适温度在中等温度范围外的几种常用酶中来自节杆菌Q36的酶具有最高的氨基酸同源性59.9%。数据表明本发明的海藻糖释放酶通常含有与SEQ ID NO: 9氨基酸序列至少60%同源性的氨基酸序列。对氨基酸序列的比较结果表明，实施例5的酶和上面鉴定的四个类型的常用酶具有SEQ ID NO: 10和13的共同氨基酸序列。实施例5的酶具有SEQ ID NO: 9中氨基酸148－153，185－190，248－254和285－291所示的部分氨基酸序列SEQ ID NO: 10到13。用作参照的四类酶具有定位于它们的对应部分的上述部分氨基酸序列。实施例5中的本发明任何酶和作为

参照的酶共同具有特异水解具海藻糖结构作为末端单元、葡萄糖聚合化程度至少为3的非还原性糖的活性，水解位点位于海藻糖结构部分和剩余部分之间的位置上，这一事实表明SEQ ID NO: 10到13的部分氨基酸序列与这样的酶活性的表达相关。这些结果表明，本发明海藻糖释放酶的特征可能在于它含有SEQ ID NO: 10到13的氨基酸序列，并且具有中等温度范围的最适温度。

实施例6-3

利用DNA导入的转化体

根据SEQ ID NO: 17的5'和3'末端核苷酸序列，以常用方法化学合成具有SEQ ID NO: 33和34碱基的寡核苷酸。在反应试管中混合作为有义和反义引物的85纳克每种寡核苷酸，和作为模板的实施例6-2中的100纳克重组DNA pGZ2，同时根据实施例3-3加入其它试剂。控制PCR的温度，使混合物经过25个循环的连续温育：95℃1分钟，98℃20秒，70℃30秒，和72℃4分钟，并且最后在72℃温育10分钟处理。以常用方法收集作为PCR产物的DNA，以便获得约1，700bp的DNA。将这样获得的DNA与“pKK233-3”（瑞典，Uppsala, Pharmacia LKB Biotechnology AB销售的一种质粒载体）混合，然后利用常用的连接方法连接，这一质粒事先已用限制酶EcoRI裂解，并且利用日本，东京，Takara Shuzo公司销售的“DNA BLUNTING KIT”平端化。然后，以常用方法处理连接产物，以便获得导入了上面含有约1，700bp碱基的DNA的重组DNA。以常用二脱氧方法译码重组DNA，显示它含有其中有5'TGA-3'的核苷酸序列加到SEQ ID NO: 17核苷酸序列的3'末端的核苷酸序列。将这一DNA命名为“pGZ3”。重组DNA pGZ3的结构在图13中。

以常用方法向已经以常用方法感受态化的大肠杆菌LE 392菌株，ATCC 33572中导入重组pGZ3以便获得转化体。将常用的碱性SDS方法用于转化体，提取DNA，并通过鉴定转化体为pGZ3，将其命名为“GZ3”。这样获得了导入了本发明海藻糖释放酶的转化体。

实施例6-4

导入DNA的转化体

除了利用分别具有SEQ ID NO: 35和36核苷酸序列的寡核苷酸作为有义和反义引物以外，类似于实施例6-3进行PCR。这些引物是根据SEQ ID NO: 17的5'和3'末端核苷酸序列化学合成的。以常用方法收集作为PCR产物的DNA，以

便获得约 1，700bp 的 DNA。利用限制酶 XbaI 和 SpeI 裂解上面获得的 DNA，以常用方法和已经利用限制酶 XbaI 和 SpeI 裂解按实施例 3－4 的方法获得的质粒载体“pKK4”一起连接。然后，以常用的方法处理连接的产物，以便获得含有 SEQ ID NO: 17 核苷酸序列的重组 DNA。将这样获得的重组 DNA 命名为“pKGZ1”。

同样如实施例 3－4 修饰包含在重组 DNA pKGZ 1 中 SEQ ID NO: 17 的 5'末端上面部分的核苷酸序列；除了利用上面的重组 DNA pKGZ1 作为模板，并利用 SEQ ID NO: 26 和 37 的寡核苷酸作为有义和反义引物这点不同以外，类似于实施例 3－3 进行作为第一 PCR－C 的 PCR，这些引物是以常用方法根据质粒载体 pKK4 的核苷酸序列化学合成的。平行地，除了利用上面的重组 DNA pKGZ1 作为模板，并利用 SEQ ID NO: 38 和 39 的寡核苷酸作为有义和反义引物这点不同以外，类似于实施例 3－3 进行作为第一 PCR－D 的 PCR，这些引物是根据 SEQ ID NO: 38 和 39 的核苷酸以常用方法化学合成的。以常用方法收集作为 PCR－C 产物的 DNA 以便获得约 390bp 的 DNA，而同样如上面所述收集作为 PCR－D 产物的另一 DNA 以便获得约 590bp 的 DNA。

除了利用作为第一 PCR－C 和第一 PCR－D 中的产物获得的 DNA 混合物，作为有义引物在第一 PCR－C 中利用的 SEQ ID NO: 26 寡核苷酸，和在第一 PCR－D 中利用的 SEQ ID NO: 39 寡核苷酸作为反义引物这一点不同以外，类似于实施例 3－3 进行第二 PCR－B 的 PCR。以常用方法收集作为 PCR 产物的 DNA，以便获得约 950bp 的 DNA。

利用限制酶 EcoRI 裂解作为第二 PCR－B 产物的 DNA，以常用方法收集形成的约 270bp 的 DNA。利用限制酶 EcoRI 裂解重组 DNA pKGZ1，同样如上面所述收集形成的约 5100bp 的 DNA。如通常所述连接这些 DNA，以常用方法处理以便获得含有来自第二 PCR－B 产物的约 270bp DNA 的重组 DNA。以常用二脱氧方法译码该重组 DNA，表明它含有 SEQ ID NO: 8 的核苷酸序列，SEQ ID NO: 17 之一，和由 5'－TGA－3'表示的一个核苷酸序列，顺序由 5'到 3'末端为指示的顺序。这样获得的重组 DNA 命名为“pGZ4”。重组 DNA pGZ4 具有与实施例 6－3 获得的重组 DNA pGZ3 基本同样的结构，不同的是它具有 SEQ ID NO: 8 的核苷酸序列。

向日本，东京，Takara Shuzo 有限公司销售的大肠杆菌感受态细胞“BMH71－18mutS”中导入重组 DNA pGZ4 以便获得转化体。利用常用的碱性 SDS 方法，从转化体提取 DNA，并且根据常用方法证明是 pGZ4。将它命名为“GZ4”。这样

即获得导入了编码本发明海藻糖释放酶的DNA的转化体。

实施例7

制备海藻糖释放酶

实施例7-1

利用节杆菌属的微生物制备酶

将节杆菌S34,FERM BP-6450的种子培养物接种在营养培养基中，并且根据实施例2-1的方法在发酵罐内培养约72小时。在温育后，过滤得到的培养物，并且利用SF-膜浓缩，获得约8升的细胞悬浮液，然后利用“MINI-LABO”（日本，东京Dainippon药学公司销售的超级高压细胞裂解器）处理以便裂解细胞。离心细胞裂解物以便收集和获得约8.5升的上清液作为细胞提取物。确定细胞提取物中的海藻糖释放酶活性，表明该培养物含有约0.3单位/毫升培养物的酶活性。向细胞提取物中加入硫酸铵，使饱和度达到0.7，以便盐析，然后离心获得沉淀。将沉淀溶解于10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)，对同样缓冲液的新鲜制剂透析。 除了用于离子交换器的树脂体积约2升这一点不同以外，根据实施例5-2的方法，利用日本东京，Mitsubishi化学公司销售的“SEPABEADS FP-DA13 GEL”对透析过的内部溶液进行离子交换层析，接着收集具有海藻糖释放酶活性的组分。合并各组分，对同样的缓冲液但含有1摩尔/升硫酸铵的新鲜制剂透析，然后离心透析溶液以便获得形成的上清液。除了利用约350毫升的凝胶这一点不同以外，根据实施例5-2的方法，利用日本东京Tosoh有限公司销售的疏水凝胶-“BUTYL TOYOPEARL 650M GEL”，对上清液进行疏水柱层析，然后收集具有海藻糖释放酶活性的各组分。证明收集的酶具有中等温度范围内的最适温度，即超过45℃但低于60℃的温度，并且具有酸性pH范围的最适pH，即pH小于7。

这样获得了约6，400单位的本发明海藻糖释放酶。

实施例7-2

利用节杆菌属的微生物制备酶

根据实施例7-1的方法，将节杆菌S34，FERM BP-6450的种子培养物接种到营养培养基中。 在1升得到的培养物中加入100毫克日本，东京Nagase生物化学有限公司销售的溶菌酶制剂“OVALBUMIN LYSOZYME”。然后，停止通气，在与培养中所用相同的温度和搅拌条件下保持培养物24小时，以裂解细胞。将

细胞裂解物在10，000rpm进行连续的离心，接着收集上清液作为细胞提取物。根据实施例7－1的方法，利用盐析处理细胞提取物，并且透析沉淀。根据实施例7－1的方法，对所得透析过的内部溶液利用日本东京，Mitsubishi 化学有限公司销售的产品“SEPABEADS FP－DA13 GEL”进行离子交换层析，以便收集具有海藻糖释放酶活性的各组分。合并的各组分含有约16，500单位的本发明海藻糖释放酶，和约5，500单位的本发明非还原性糖形成酶。这样获得了含有本发明的两类酶的酶制剂。

实施例7－3

利用转化体生产酶

在500毫升Erlenmeyer 烧瓶中放置100毫升含有16克/升 聚蛋白胨，10克/升酵母提取物，和5克/升氯化钠的水溶液，在121℃，高压蒸汽灭菌烧瓶15分钟，冷却，无菌调节到pH7.0，并与10毫克氨苄青霉素钠盐无菌混合，以便获得营养培养基。将实施例6－2中获得的转化体“GZ2”接种到液体培养基中，接着在通气搅拌条件下，在37℃培养约20小时，以便获得种子培养物。同样制备如种子培养物所用的同样的培养基的新鲜制剂7升，放置于10升发酵罐中，利用70毫升种子培养物接种，并且在通气搅拌条件下培养约20小时。通过以常用方法离心得到的培养物收集细胞。将收集的细胞悬浮于10毫摩尔/升的磷酸盐缓冲液(pH7.0)中，并且超声波处理裂解细胞。离心得到的混合物以便除去不溶物质，接着收集上清液作为细胞提取物。对10毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)透析细胞提取物。收集透析过的内部溶液，证明具有中等温度范围即45℃以上但60℃以下的最适温度，和酸性pH范围，即小于pH7的最适pH。

这样即获得本发明海藻糖释放酶。在这一实施例中，获得了约0.5单位/毫升培养物的海藻糖释放酶。

作为对照，在与上述相同但无氨苄青霉素的培养基的新鲜制剂中，利用与上述相同的培养条件培养美国，加里弗尼亚，Stratagene Cloning Syslem 销售的大肠杆菌菌株“XL1－Blue”，接着如上所述类似地收集和透析细胞提取物。未观察到海藻糖释放酶活性，意味着转化体GZ2可以有利地用于生产本发明的海藻糖释放酶。

实施例7－4

利用转化体生产酶

除了利用含有1w/v%麦芽糖，3w/v%聚蛋白胨，1w/v%日本，东京，Asahi Breweries有限公司销售的“MEAST PIG”，0.1w/v%磷酸氢二钾，100微克/毫升氨苄青霉素，和水的液体营养培养基之外，如实施例7－3同样培养实施例6－3的转化体GZ3。利用超声波处理得到的培养物以便裂解细胞，并且离心混合物以便除去不溶物质。在得到的上清液中测量海藻糖释放酶的活性，表明它含有约70单位/毫升培养物的酶。根据实施例5－2的方法，纯化上清液并且证明纯化的样品具有中等温度范围，即45℃以上但低于60℃的最适温度，和酸性pH范围，即pH小于7的最适pH。这样，获得了本发明的海藻糖释放酶。

实施例7－5

利用转化体生产酶

与实施例4－4类似地培养实施例6－4中的转化体GZ4。利用超声波处理得到的培养物以便裂解细胞，离心混合物以便除去不溶物质。测量得到的上清液中的海藻糖释放酶活性，表明它含有约250单位/毫升培养物的酶。根据实施例5－2的方法，纯化上清液，并且证明纯化的样品具有中等温度范围即45℃以上但60℃以下的最适温度，并且具有酸性pH范围即小于pH7的最适pH。这样获得了本发明的海藻糖释放酶。

实施例8

多糖生产

实施例8－1

非还原性糖糖浆的生产

通过加热使6w/w%土豆淀粉悬浮液明胶化，调节到pH4.5和50℃，与2，500单位/克淀粉d.s.b混合，酶促反应20小时。将反应混合物调节到pH6.5，在120℃高压蒸汽灭菌10分钟，冷却到40℃，与150单位/克淀粉，d.s.b的“TERMAMYL 60L”（丹麦，哥本哈根，Novo Nordisk Industri A/S销售的α－淀粉酶）混合，进行酶反应20小时同时保持温度。将反应混合物在120℃高压蒸汽灭菌20分钟，冷却到53℃，调节到pH5.7，与按实施例4－1的方法获得的非还原性糖形成酶1单位/克淀粉d.s.b混合，进行酶反应96小时。在97℃加热这样获得的反应混合物30分钟以便失活剩余的酶，冷却，过滤，以常用方法通过利用活性碳脱色进行纯化，并且利用离子交换剂脱盐，浓缩获得约70w/w%糖浆，产率为约90%的物质淀粉d.s.b。

具有24的低DE并含有各自量为11.5，5.7，29.5，3.5和2.8%d.s.b的α-葡萄糖基海藻糖，α-麦芽糖基海藻糖，α-麦芽三糖基海藻糖，α-麦芽四糖基海藻糖，和α-麦芽五糖基海藻糖的产物具有中等的和高质量的甜度，和满意的粘度和保湿能力。它可以在通常如食物，化妆品和药品的组合物中任意用作甜味剂，味道改良试剂，质量改善剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例8-2

含有非还原性糖的糖浆的生产

在33w/w%的玉米淀粉悬浮液中加入碳酸钙得到最后浓度为0.1w/w%，然后调节混合物pH到6.5，将每份淀粉与0.2w/w%d.s.b.的“TERMAMYL 60L”（丹麦，哥本哈根，Novo Nordisk Industri A/S销售的液化α-淀粉酶样品）混合，在95℃酶反应15分钟，以便液化淀粉。在120℃将液化淀粉高压蒸汽灭菌10分钟，冷却到53℃，与1单位/克淀粉d.s.b的来自日本，Okayama，Hayashibara生物化学实验室公司销售的施氏假单胞菌菌株的麦芽四糖形成酶，和2单位/克淀粉d.s.b.的按实施例4-2的方法获得的非还原性糖形成酶混合，并且酶反应48小时。将反应混合物与15单位日本，Osaka，Ueda化学有限公司销售的α-淀粉酶样品“α-AMYLASE 2A”混合，然后在65℃温育2小时，在120℃高压蒸汽灭菌10分钟，并且冷却。过滤得到的混合物，以常用方法利用活性炭处理颜色进行纯化，利用离子交换器脱盐，并且浓缩成约70w/w%糖浆，d.s.b，产率约是物质淀粉d.s.b的90%。

具有18.5的低DE并含有量分别为9.3，30.1，0.9，0.8和0.5%，d.s.b.的α-葡萄糖基海藻糖，α-麦芽糖基海藻糖，α-麦芽三糖基海藻糖，α-麦芽四糖基海藻糖，α-麦芽五糖基海藻糖的产物具有中等和高质量的甜度，和满意的粘度，和保湿能力。在通常如食物，化妆品，和药品的组合物中它可以任意用作甜味剂，味道改良剂，质量改善剂，稳定剂，填充剂，佐剂和赋形剂。

实施例8-3

非还原性糖的生产

将20w/w%的任何日本，Okayama,Hayashibara生物化学实验室公司生产的麦芽三糖，麦芽四糖，麦芽五糖，麦芽六糖和麦芽七糖的还原性部分淀粉水解物水溶液，与按实施例2-2的方法获得的非还原性糖形成酶的纯化样品以2单位/克还原性部分淀粉水解物混合，并且在50℃，pH6.0进行酶反应48小时。从上面

鉴定的还原性部分淀粉水解物的每一种分别形成了作为还原性糖的α－葡萄糖基海藻糖，α－麦芽糖基海藻糖，α－麦芽三糖基海藻糖，α－麦芽四糖基海藻糖，α－麦芽五糖基海藻糖。通过下面的连续处理以常用方法分级分离每种反应混合物中的糖：通过加热使剩余的酶失活，过滤，脱色，脱盐，浓缩和利用日本，东京 Tokyo 有机化学工业有限公司销售的“XT－1060(Na^+-形式)”（多聚化程度 4％的一种碱性金属强酸阳离子交换树脂）进行柱层析。用于柱层析的条件如下：内部柱温度设定为 55℃，在树脂中糖溶液的加载体积约为 5v/v%，作为流动床的加热到 55℃的水的流速设定为 SV(空间速度)0.13。收集来自每个柱的洗脱物，其中就糖组合物而言含有至少 95w/w%的任何上面鉴定的非还原性糖，d.s.b。在每个收集的洗脱物中加入氢氧化钠，得到 0.1 N 的浓度，在 100℃加热混合物 2 小时，以便分解剩余的还原性糖。将这样获得的反应混合物分别利用活性炭脱色，利用 H－和 OH－形式的离子交换器脱盐，浓缩，真空干燥，并粉碎成粉末α－葡萄糖基海藻糖，α－麦芽糖基海藻糖，α－麦芽三糖基海藻糖，α－麦芽四糖基海藻糖，α－麦芽五糖基海藻糖，纯度至少 99w/w%，d.s.b。

在常用的如食物，化妆品，和药品的组合物中，含有高纯度非还原性糖并具有更低 DE 的产物可以任意用作味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例 8－4

含有非还原性糖的结晶粉末的生产

制备了日本，Okayama，Hayashibara 生物化学实验室公司销售的麦芽五糖 20w/w%水溶液，与按实施例 4－3 的方法获得的非还原性糖形成酶以 2 单位/克麦芽五糖，d.s.b 混合，在 50℃酶反应 48 小时，导致约 75％的麦芽五糖转换成α－麦芽三糖基海藻糖。在 97℃加热反应混合物 30 分钟以便失活剩余的酶，然后冷却，过滤，通过利用活性炭脱色纯化，和利用离子交换器脱盐。

然后，将得到的溶液浓缩成就固体内容物而言约 75w/w%的溶液，与作为晶种的约 0.01w/v α－麦芽三糖基海藻糖晶体混合，放置 24 小时。然后，通过离心收集结晶的α－麦芽三糖基海藻糖晶体，利用少量冷水洗涤，并且以常用方法干燥以便获得具有相对高含量的非还原性糖的结晶粉末，产率约为 50％的物质固体，d.s.b。

在通常如食物，化妆品和药品的组合物中具有相对低的甜度，和小于 0.2

的极低DE，和含有至少99.0w/w%α－麦芽三糖基海藻糖作为非还原性糖的产物可任意用作味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例8－5

生产水合结晶海藻糖的方法

将玉米淀粉悬浮于水中成为30w/w%的淀粉悬浮液，然后与碳酸钙以0.1w/w%的量混合。调节混合物到pH6.0，然后与0.2w/w%/淀粉d.s.b.的“TERMAMYL 60L”（丹麦，哥本哈根，Novo Nordisk IndustriA/S销售的液化α－淀粉酶样品）混合，在95℃酶反应15分钟以便凝胶化和液化淀粉。在120℃高压蒸汽灭菌得到的混合物30分钟，冷却到51℃，调节到pH5.7，在与300单位/克淀粉，d.s.b.的日本，Okayama,Hayashibara生物化学实验室公司销售的异构淀粉酶样品；2单位/克淀粉d.s.b的日本，Okayama,Hayashibara生物化学实验室公司销售的环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶样品；2单位/克淀粉d.s.b.按实施例4－1的方法获得的非还原性糖形成酶；和10单位/克淀粉d.s.b.按实施例7－1的方法获得的海藻糖释放酶混合后，在同样的温度下酶反应64小时。在97℃加热反应混合物30分钟以便失活剩余的酶，然后冷却到50℃，与10单位/克淀粉d.s.b.的日本，Kyoto，Nagase生物化学有限公司销售的葡糖淀粉酶样品“GLUCOZYME”混合，进行酶反应24小时。在95℃加热这样获得的反应混合物10分钟以便失活剩余的酶，冷却，过滤，利用活性炭脱色纯化，利用离子交换器脱盐，浓缩到固体内容物约为60w/w%的溶液，或含有84.1w/w%海藻糖d.s.b的糖浆。浓缩糖浆至约83w/w%d.s.b的浓度，将浓缩物放置于结晶器中，与约0.1w/v%水合结晶海藻糖混合成糖浆，搅拌约2小时，以便结晶糖。通过离心收集得到的结晶，利用少量的水洗涤以便除去糖蜜，通过加热到45℃的空气干燥以便获得水合结晶海藻糖，纯度至少99%，产率约为50%的物质淀粉d.s.b.

因为产物基本无吸湿性并且容易操作，在通常的如食物，化妆品，和药品的组合物中可以任意用作甜味剂，味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例8－6

生产含有无水结晶海藻糖的结晶粉末的方法

利用实施例8－5的方法，制备水合结晶海藻糖，利用夹套旋转式真空干燥器真空干燥糖。在90℃和300－350mmHg进行干燥约7小时。在干燥后，将上面

的温度和压力恢复到大气温度和正常压力，然后收集含有至少90w/w%无水结晶海藻糖d.s.b的产物或结晶粉末。

由于无水结晶海藻糖可以吸收含水物质中的水分，本身变成水合结晶海藻糖，因此，富含该糖的产物可以任意用作无害安全的干燥剂，可以脱水或干燥包括食物产物，化妆品和药品，以及其材料和中间产物的组合物。在通常如食物，化妆品，和药品的组合物中，具有中等和高质量甜度的产品可以任意用作甜味剂，味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例8-7

生产海藻糖糖浆的方法

将27w/w%木薯淀粉悬浮液与碳酸钙混合以便获得最后浓度0.1w/w%，调节到pH6.0，与0.2w/w%/淀粉d.s.b的丹麦，哥本哈根，Novo Nordisk Industri A/S销售的液化α-淀粉酶样品“TERMAMYL 60L”混合，在95℃酶反应15分钟以便凝胶化和液化淀粉。在2公斤/平方厘米的压力高压蒸汽灭菌得到的混合物30分钟，冷却到53℃，调节到pH5.7，在与500单位/克淀粉d.s.b的丹麦哥本哈根，Novo Nordisk Industri A/S销售的支链淀粉酶样品“PROMOZYME 200L”；1单位/克淀粉d.s.b.的来自日本，Okayama,Hayashibara生物化学实验室公司销售的施氏假单胞菌的麦芽四糖形成酶；约2单位/克淀粉d.s.b的非还原性糖形成酶和约6单位/克淀粉d.s.b按实施例7-2的方法获得的海藻糖释放酶混合后，在同样温度酶反应72小时。将这样获得的反应混合物在97℃加热15分钟，冷却和过滤获得过滤物。以常用方法将过滤物利用活性炭脱色纯化和利用离子交换器脱盐，并且浓缩到固体含量约70w/w%的糖浆，产率约为92%的物质d.s.b.

含有35.2%的海藻糖，3.4%α-葡糖基海藻糖，1.8%葡萄糖，37.2%麦芽糖，9.1%麦芽三糖，和13.3%高于麦芽四糖的寡糖的产物具有中等和高质量的甜度，相对低的还原能力和粘度和适当的水分保留能力；它在常见的如食物，化妆品和样品的组合物中可以任意用作甜味剂，味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

实施例8-8

生产含有无水结晶海藻糖的结晶粉末的方法

将1份重量的日本，Okayama，Hayashibara生物化学实验室公司销售的淀粉酶“EX-I”溶解于15份重量的水，同时加热，将溶液加热到53℃，调节到pH5.7.

在得到的溶液中加入2单位/克淀粉d.s.b的实施例4-3获得的非还原性糖形成酶，和6单位/克淀粉d.s.b的实施例7-4的方法获得的海藻糖释放酶，接着温育48小时。将反应混合物在97℃加热30分钟以便失活剩余的酶，然后调节到pH5.0，与10单位/克淀粉d.s.b的Kyoto，Nagase生物化学有限公司销售的葡糖淀粉酶样品“GLUCOZYME”混合，酶反应40小时。将这样获得的反应混合物在95℃加热10分钟以便失活剩余的酶，冷却，过滤，通过活性炭脱色纯化，利用离子交换器脱盐，并且浓缩到固体内含物约60w/w%的溶液或含有82.1w/w%海藻糖d.s.b的糖浆。

同样如实施例8-3，对糖浆进行柱层析，接着收集含有约98w/w%海藻糖d.s.b的组分。将该组分在加热条件下真空浓缩到固体含量约85w/w%的糖浆。将糖浆与作为晶种的水合结晶海藻糖以约2w/v%的量混合形成糖浆，在120℃搅拌5分钟，分配到塑料大桶中，在100℃真空干燥以便结晶糖。然后，从大桶中分离成块的内容物，用切割机切割获得固体产物，该固体产物含有具有约70%的结晶的无水结晶海藻糖，水分含量约0.3w/w%，产量约为物质直链淀粉d.s.b 的70%。以常用方法将固体产物粉碎成含有无水结晶海藻糖的结晶粉末。

由于无水结晶海藻糖可吸收来自含水物质的水分，并且改变成水合结晶海藻糖，因此，富含无水结晶海藻糖的产物可以任意用作无害安全干燥剂，用来对包括食物产品，化妆品和药品以及其物质和中间产物的组合物进行脱水和干燥。具有中等和高质量甜度的产物可以任意用作常见的食物，化妆品和药品组合物中的甜味剂，味道改良剂，质量改良剂，稳定剂，填充剂，佐剂或赋形剂。

如上所述，本发明是基于发现新的非还原性糖形成酶和新海藻糖释放酶进行的，这些酶具有中等温度范围的最适温度，并且优选地具有酸性pH范围的最适pH。根据本发明，这些酶可以需要的量获得，例如通过培养能够生产这些酶的微生物。编码两种酶中任意一种的本发明DNA在生产重组蛋白质形式的这些酶中是十分有用的。在利用导入了该DNA的转化体的情况中，根据本发明的酶可以需要的量生产。这些酶可以用于生产在中等温度范围和酸性pH范围具有海藻糖结构的非还原性糖，包括海藻糖。特定地，当利用本发明的酶结合其它具有中等温度范围的最适温度和/或具有酸性pH范围的最适pH的其它多糖相关性酶时，可以十分有效地生产需要的糖。本发明的这些酶是具有公开氨基酸序列的一些酶，它们可以安全地用于生产待用于食物产品和药品的非还原性糖。含有同样的和具有

更少还原性、由本发明生产的非还原性糖和还原性糖具有中等和高质量的甜度，并且最优选地无实质性的还原性或大幅度地减少了还原性。所以，这些糖可以任意地用于常见的食物、化妆品和药品组合物中，以免减少对变色和变质的担心。

具有这些非常有利的特性和特征的本发明是对本领域具有巨大贡献的有用发明。

前面已经叙述了目前考虑为本发明的优选实施方案，可以理解的是，其中可以作各种修改，使其落在本发明的真正精神和范围中的所有这类修饰都包括在附加的权利要求范围内。

序列表

(1) SEQ ID NO：1 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：756

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：1

```
Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe
 1               5                  10                  15
Asp Ala Ala Arg Ile Val Pro Tyr Leu His Arg Leu Gly Ala Asp Trp
            20                  25                  30
Leu Tyr Leu Ser Pro Leu Leu Glu Ser Glu Ser Gly Ser Ser His Gly
        35                  40                  45
Tyr Asp Val Val Asp His Ser Arg Val Asp Ala Ala Arg Gly Gly Pro
    50                  55                  60
Glu Gly Leu Ala Glu Leu Ser Arg Ala Ala His Glu Arg Gly Met Gly
65                  70                  75                  80
Val Val Val Asp Ile Val Pro Asn His Val Gly Val Ala Thr Pro Lys
                85                  90                  95
Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu
            100                 105                 110
Tyr Ala Asp Tyr Phe Asp Ile Asp Trp Glu Phe Gly Gly Gly Arg Leu
        115                 120                 125
Arg Leu Pro Val Leu Gly Asp Gly Pro Asp Glu Leu Asp Ala Leu Arg
    130                 135                 140
Val Asp Gly Asp Glu Leu Val Tyr Tyr Glu His Arg Phe Pro Ile Ala
145                 150                 155                 160
Glu Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Arg Glu Val His Asp Arg Gln His
                165                 170                 175
Tyr Glu Leu Met Ser Trp Arg Arg Ala Asp His Asp Leu Asn Tyr Arg
            180                 185                 190
Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala Ala Val Arg Val Glu Asp Pro
        195                 200                 205
Arg Val Phe Asp Asp Thr His Arg Glu Ile Gly Arg Trp Ile Ala Glu
    210                 215                 220
Gly Leu Val Asp Gly Leu Arg Val Asp His Pro Asp Gly Leu Arg Ala
225                 230                 235                 240
Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro
                245                 250                 255
Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln
            260                 265                 270
Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp
        275                 280                 285
Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu His Pro Leu Thr Gln Ile Val
    290                 295                 300
Asp Glu Ala Ala Gly Ser Pro Arg Arg Trp Ala Glu Leu Val Pro Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Arg Lys Arg Ala Val Ala Arg Gly Ile Leu Asn Ser Glu Ile Arg Arg
                325                 330                 335
Val Ala Arg Glu Leu Gly Glu Val Ala Gly Asp Val Glu Asp Ala Leu
            340                 345                 350
Val Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ser Val Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Phe
        355                 360                 365
Gly Arg Glu His Leu Asp Glu Ala Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala
    370                 375                 380
Pro Gln Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala Val Gly Ala Ala Leu Ala Asp
385                 390                 395                 400
Pro Gly Asn Pro Ala Ala Leu Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Ile
                405                 410                 415
Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Asn Ala Phe Tyr Arg Tyr Pro Arg Leu
            420                 425                 430
Thr Ser Leu Thr Glu Val Gly Gly Asp Pro Ser Leu Phe Ala Ile Asp
        435                 440                 445
Ala Ala Ala Phe His Ala Ala Gln Arg Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro
    450                 455                 460
Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp
465                 470                 475                 480
Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg
                485                 490                 495
Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val
            500                 505                 510
Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser
        515                 520                 525
Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly
    530                 535                 540
Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu
545                 550                 555                 560
Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu Glu Pro Leu Val His Glu Leu
                565                 570                 575
Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly
            580                 585                 590
Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val
        595                 600                 605
Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn
    610                 615                 620
Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu
625                 630                 635                 640
Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr
                645                 650                 655
Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu
            660                 665                 670
Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala Arg Gly Ala Gln Ala Glu His
        675                 680                 685
Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu
    690                 695                 700
Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly Trp Gly Asp Thr Val Val Asp
705                 710                 715                 720
Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg
                725                 730                 735
Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu
            740                 745                 750
Leu Val Glu Thr
        755
```

(2) SEQ ID NO：2 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：6

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：2

```
Asp Ile Val Pro Asn His
  1               5
```

(3) SEQ ID NO：3 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：6

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：3

```
Gly Thr Thr Gly Tyr Asp
  1               5
```

(4) SEQ ID NO：4 的资料：

(i) 序列特征：

(A)长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：N 末端片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：4

```
Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe
  1               5                  10                  15
Asp Ala Ala Arg
            20
```

(5) SEQ ID NO：5 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：5：

```
Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala
  1               5                  10                  15
Ser Glu Leu Leu
            20
```

(6) SEQ ID NO：6 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：6：

```
Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu
  1               5                  10                  15
Tyr Ala Asp Tyr
            20
```

(7) SEQ ID NO：7 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：2268

(B) 类型：核酸

(C) 链数：双链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：7：

```
CCCGCCAGTA CCTACCGCCT TCAGATCTCG GCGGAGTTCA CCCTCTTCGA CGCGGCGCGC   60
ATCGTGCCCT ACCTGCACCG CCTCGGCGCC GACTGGCTGT ACCTCTCGCC GCTGCTCGAG  120
TCCGAGTCGG GCTCCTCGCA CGGCTACGAC GTGGTCGACC ACTCCCGCGT CGACGCCGCC  180
CGCGGCGGGC CGGAGGGGCT CGCCGAGCTC TCCCGTGCGG CGCACGAGCG CGGCATGGGC  240
GTCGTCGTCG ACATCGTGCC CAACCACGTC GGCGTCGCGA CGCCGAAGGC GAACCGCTGG  300
TGGTGGGACG TTCTGGCCCG TGGACAGCGG TCGGAGTACG CCGACTACTT CGACATCGAC  360
TGGGAGTTCG GCGGCGGCAG GCTGCGCCTG CCCGTGCTCG GCGACGGCCC CGACGAGCTC  420
GACGCGCTGA GAGTGGATGG CGACGAGCTC GTCTACTACG AGCACCGCTT CCCGATCGCC  480
GAGGGCACCG GCGGCGGCAC CCCGCGCGAG GTGCACGACC GGCAGCACTA CGAGCTGATG  540
TCGTGGCGGC GGGCCGACCA CGACCTCAAC TACCGCCGCT TCTTCGCCGT GAACACGCTC  600
GCCGCCGTAC GCGTCGAAGA CCCGCGCGTG TTCGACGACA CCCACCGCGA GATCGGCCGC  660
TGGATCGCCG AGGGCCTCGT CGACGGCCTG CGCGTCGACC ACCCCGACGG GCTGCGCGCC  720
CCCGGCGACT ACCTGCGCCG TCTCGCCGAG CTCGCCCAAG GCAGGCCGAT CTGGGTCGAG  780
AAGATCATCG AGGGCGACGA GCGGATGCCC CCGCAGTGGC CCATCGCCGG CACCACCGGC  840
TACGACGCGC TGGCCGGGAT CGACCGGGTG CTCGTCGACC CCGCGGGCGA GCATCCGCTC  900
ACCCAGATCG TCGACGAGGC GGCAGGCAGC CCCCGGCGCT GGGCCGAGCT GGTTCCCGAG  960
CGCAAGCGGG CCGTCGCCCG CGGCATCCTG AACTCCGAGA TCCGCCGCGT CGCCCGCGAA 1020
CTCGGAGAGG TCGCCGGCGA CGTCGAAGAC GCGCTCGTCG AGATCGCCGC CGCCCTGTCC 1080
GTCTACCGCA GCTACCTGCC GTTCGGGCGC GAGCACCTCG ACGAAGCCGT GGCCGCCGCG 1140
CAGGCCGCAG CCCCCCAGCT CGAGGCCGAC CTCGCCGCCG TCGGCGCAGC GCTCGCCGAC 1200
CCGGGCAACC CCGCCGCGCT CCGCTTCCAG CAGACCAGCG GCATGATCAT GGCCAAGGGC 1260
GTCGAGGACA ACGCGTTCTA CCGCTACCCC CGGCTCACCT CGCTGACCGA GGTCGGGGGA 1320
```

```
GACCCGAGCC TGTTCGCGAT CGACGCGGCC GCCTTCCACG CGGCGCAGCG CGACCGCGCC 1380
GCCCGGCTGC CCGAGTCGAT GACGACGCTG ACCACCCACG ACACCAAGCG CAGCGAAGAC 1440
ACCCGGGCGC GGATCACCGC GCTCGCCGAG GCCCCCGAAC GCTGGCGGCG CTTCCTGACC 1500
GAGGTCGGCG GGCTCATCGG AACGGGCGAC CGGGTGCTGG AGAACCTGAT CTGGCAGGCG 1560
ATCGTCGGCG CGTGGCCGGC GAGCCGGGAG CGGCTCGAGG CCTACGCGCT GAAGGCCGCG 1620
CGCGAAGCCG GCGAGTCGAC CGACTGGATC GACGGCGACC CCGCGTTCGA AGAGCGGCTG 1680
ACCCGCCTGG TCACGGTCGC CGTCGAGGAG CCGCTCGTGC ACGAGCTGCT CGAGCGGCTC 1740
GTCGACGAGC TGACGGCGGC CGGGTACTCC AACGGCCTCG CGGCGAAGCT GCTGCAGCTG 1800
CTCGCCCCCG GAACCCCCGA CGTGTACCAG GGCACGGAAC GCTGGGACCG GTCGCTGGTG 1860
GACCCGGACA ACCGTCGCCC CGTGGATTTC GCCGCGGCAT CCGAGCTGCT CGACCGCCTC 1920
GACGGCGGCT GGCGGCCGCC CGTCGACGAG ACCGGCGCGG TCAAGACGCT CGTCGTCTCC 1980
CGCGCGCTGC GGCTGCGCCG CGACCGGCCC GAGCTGTTCA CCGCGTACCA CCCGGTCACG 2040
GCGCGCGGCG CGCAGGCCGA GCACCTGATC GGCTTCGACC GCGGCGGCGC GATCGCCCTG 2100
GCCACCCGCC TGCCGCTCGG CCTCGCCGCC GCAGGCGGCT GGGGCGACAC GGTCGTCGAC 2160
GTCGGCGAGC GGAGCCTGCG CGACGAGCTG ACCGGCCGCG AGGCCCGCGG AGCGGCGCGC 2220
GTGGCCGAGT TGTTCGCCGA CTACCCCGTC GCCCTGCTGG TGGAGACA              2268
```

(8) SEQ ID NO：8 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：28

(B) 类型：核酸

(C) 链数：双链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：8：

```
TTTTTTAATA AAATCAGGAG GAAAAAAT                                    28
```

(9) SEQ ID NO：9 的资料：

(i)序列特征：

(A) 长度：575

(B) 类型：氨基酸

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：9：

```
Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr
 1               5                  10                  15
Leu Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu
            20                  25                  30
Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu
        35                  40                  45
Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro
    50                  55                  60
Arg Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe
65                  70                  75                  80
Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp
                85                  90                  95
Leu Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro
            100                 105                 110
```

Glu Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg
115 120 125
Leu Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly
130 135 140
Thr His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu
145 150 155 160
Pro Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His
165 170 175
Ala Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly
180 185 190
Pro Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly
195 200 205
Ala Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser
210 215 220
Asp Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg
225 230 235 240
Asp Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg
245 250 255
Asp Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp
260 265 270
Glu Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser
275 280 285
Asp Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr
290 295 300
Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala
305 310 315 320
Asn Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu
325 330 335
Gly Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr
340 345 350
Trp Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp
355 360 365
Ile Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val
370 375 380
Gly Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly
385 390 395 400
Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro
405 410 415
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe
420 425 430
Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly
435 440 445
Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro
450 455 460
Asp Pro Gln Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser
465 470 475 480
Glu Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp
485 490 495
Leu Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu
500 505 510
Val Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro
515 520 525
Leu Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu
530 535 540
His Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala
545 550 555 560
Gly Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu
565 570 575

(10)SEQ ID NO：10 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：6

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：10

```
Trp Gly Tyr Asp Gly Val
 1               5
```

(11)SEQ ID NO：11 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：6

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：11

```
Asp Val Val Tyr Asn His
 1               5
```

(12)SEQ ID NO：12 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：7

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：12

```
Arg Leu Asp Ala Val His Ala
 1               5
```

(13)SEQ ID NO：13 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：7

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：13

```
Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn
 1               5
```

(14)SEQ ID NO：14 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：N 末端片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：14

```
Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr
 1               5                  10                  15
Leu Val Val Gly
            20
```

(15)SEQ ID NO：15 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：15

```
Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp
 1               5                  10                  15
Val His His Ala
            20
```

(16)SEQ ID NO：16 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：氨基酸

(D)几何结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(v) 片段类型：内部片段

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：16

```
Asp Glu Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro
  1               5                  10                  15
Asp Leu Val Asp
            20
```

(17)SEQ ID NO：17 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：1725

(B) 类型：核酸

(C) 链数：双链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：17：

```
ATGAACCGAC GATTCCCGGT CTGGGCGCCC CAGGCCGCGC AGGTGACGCT CGTCGTGGGC   60
CAAGGCCGCG CCGAACTCCC GCTGACCCGC GACGAGAACG GATGGTGGGC TCTTCAGCAG  120
CCGTGGGACG GCGGCCCCGA CCTCGTCGAC TACGGCTACC TCGTCGACGG CAAGGGCCCC  180
TTCGCCGACC CGCGGTCGCT GCGGCAGCCG CGCGGCGTGC ACGAGCTCGG CCGCGAATTC  240
GACCCCGCCC GCTACGCGTG GGGCGACGAC GGATGGCGCG GCCGAGACCT CACCGGAGCC  300
GTGATCTACG AACTGCACGT CGGCACCTTC ACCCCTGAGG GAACGCTGGA CAGCGCCATC  360
CGTCGCCTCG ACCACCTGGT GCGCCTCGGC GTCGACGCGG TCGAGCTGCT GCCCGTCAAC  420
GCGTTCAACG GCACCCACGG CTGGGGCTAC GACGGGGTGC TCTGGTACGC GGTGCACGAG  480
CCCTACGGCG GCCCGGAGGC GTACCAGCGC TTCGTCGACG CCTGCCACGC CCGCGGCCTC  540
GCCGTCGTGC AGGACGTCGT CTACAACCAC CTGGGCCCGA GCGGCAACCA CCTGCCCGAC  600
TTCGGCCCCT ACCTCGGGTC GGGCGCCGCC AACACCTGGG GCGACGCGCT GAACCTCGAC  660
GGGCCGCTCT CCGACGAGGT GCGGCGGTAC ATCATCGACA ACGCGGTGTA CTGGCTGCGC  720
GACATGCACG CCGACGGGCT GCGGCTCGAC GCCGTGCACG CGCTGCGCGA CGCCCGCGCG  780
CTGCACCTGC TCGAAGAGCT CGCCGCCCGC GTCGACGAGC TGGCGGGCGA GCTCGGCCGG  840
CCGCTGACGC TCATCGCCGA GAGCGACCTG AACGACCCGA AGCTGATCCG CTCCCGCGCG  900
GCGCACGGCT ACGGCCTCGA CGCCCAGTGG GACGACGACG TGCACCACGC GGTGCACGCC  960
AACGTGACCG GCGAGACCGT CGGCTACTAC GCCGACTTCG GCGGGCTCGG CGCCCTCGTC 1020
AAGGTGTTCC AGCGCGGCTG GTTCCACGAC GGCACCTGGT CGAGCTTCCG CGAGCGGCAC 1080
CACGGCCGGC CGCTCGACCC CGACATCCCG TTCCGCCGGC TCGTCGCCTT CGCGCAGGAT 1140
CACGACCAGG TCGGCAACCG AGCGGTCGGC GACCGCATGT CGGCGCAGGT CGGCGAGGGT 1200
TCGCTCGCCG CCGCGGCGGC GCTCGTGCTG CTCGGCCCGT TCACCCCGAT GCTGTTCATG 1260
GGCGAGGAGT GGGGCGCGCG CACCCCGTGG CAGTTCTTCA CCTCCCACCC CGAGCCCGAG 1320
CTGGGGGAGG CGACGGCGCG CGGGCGCATC GCCGAGTTCG CCCGCATGGG CTGGGACCCG 1380
GCAGTCGTGC CCGACCCGCA GGACCCGGCC ACCTTCGCCC GCTCGCACCT GGACTGGTCC 1440
GAGCCCGAGC GGGAACCGCA CGCGGGCCTG CTCGCCTTCT ACACCGACCT GATCGCGCTG 1500
CGGCGCGAGC TGCCGGTCGA TGCGCCGGCG CGCGAGGTGG ATGCCGACGA GGCGCGCGGC 1560
GTCTTCGCGT TCAGCCGCGG CCCGCTGCGG GTCACGGTCG CGCTGCGCCC CGGACCGGTC 1620
GGGGTGCCCG AGCACGGGGG CCTCGTGCTC GCCTACGGCG AGGTGCGCGC CGGCGCCGCC 1680
GGACTGCACC TCGACGGGCC GGGAGCCGCG ATCGTGCGCC TCGAG                  1725
```

(18)SEQ ID NO：18 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：23

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：18：

GCSAACCGST GGTGGTGGGA CGT 23

(19)SEQ ID NO：19 的资料：

(i)序列特征：

(A) 长度：3252

(B) 类型：核酸

(C) 链数：双链

(D) 几何结构：线性

(ii) 分子类型：基因组 DNA

(vi) 最初起源：

(A) 生物体：节杆菌

(B) 个别分离物：S34(FERM BP-6450)

(ix) 特征：

(A) 名称/关键词：5'UTR

(B) 定位：1....742

(C) 鉴定方法：E

(A) 名称/关键词：mat 肽

(B) 定位：743....3013

(C) 鉴定方法：E

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：19：

ATGCCGACGA CGAACTTGAG CGCGTTCTCG GGCACCCGCG AGAGCGGTCC GCGCACGGCG 60
GCGCCCAGTG CCACGACGAG CACGATCGCG GCGAGCGCCG CGACGACGGC GACCGGCAGG 120
CGCCCCTGAT TGCTGGCGAA GGTGAGCACG ATGAAGACCA CCTCGAGGCC CTCGAGCAAC 180
ACACCTTTGA ACGACACGGT GAACGCGTAC CAATCGGAGA CCCCGAACCG GCTCTCGCGC 240
CGGGCGCTCT CGGCCGCCTC GACCTGACGC CGGAAGGCAG CCTCCTCGTC ACGGAGAGCC 300
CTGCGCCCTG CCGCGCGCAG CACCGCCTTG CGCAGCCAGC CGAGCCCGAA GACGAGCAGC 360
AACCCGCCGA CGACGAGGCG CAGCACGGCC AGCGGCAGCA GCAGGATCGC GGGACCGACG 420
AGCGCGACGG CCGCGGCCAG CACCACCACG GCGACGGCGG CACCTGTCAG CGCCGACCGC 480
CAGCTGCGGG TGGCGCCGAC CGCGACGACG ATCGTGGTCG CCTCCACCGC CTCGACCACG 540
CAGGCGAGGA ACACGGCGGC GAACAGGGCG ACGGCGGTCA TCGGCCCAGC AGACGGTTGA 600

```
CCATCACGGC ACGCTAGCGC CATTGCTCAC AGGAAGGGCC AAGACGCCCG CAACGCGGCA  660
CCCGTGGACG GCGCGTACCG GCGTGTGACC GATCGTGTCA ACCGGTGGCG CCCGCCCCGA  720
GCACCTGCGT AGATTCGGCC TC GTG CCC GCC AGT ACC TAC CGC CTT CAG ATC   772
                        Met Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile
                          1               5                  10
TCG GCG GAG TTC ACC CTC TTC GAC GCG GCG CGC ATC GTG CCC TAC CTG    820
Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe Asp Ala Ala Arg Ile Val Pro Tyr Leu
                    15                  20                  25
CAC CGC CTC GGC GCC GAC TGG CTG TAC CTC TCG CCG CTG CTC GAG TCC    868
His Arg Leu Gly Ala Asp Trp Leu Tyr Leu Ser Pro Leu Leu Glu Ser
                30                  35                  40
GAG TCG GGC TCC TCG CAC GGC TAC GAC GTG GTC GAC CAC TCC CGC GTC    916
Glu Ser Gly Ser Ser His Gly Tyr Asp Val Val Asp His Ser Arg Val
            45                  50                  55
GAC GCC GCC CGC GGC GGG CCG GAG GGG CTC GCC GAG CTC TCC CGT GCG    964
Asp Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gly Leu Ala Glu Leu Ser Arg Ala
        60                  65                  70
GCG CAC GAG CGC GGC ATG GGC GTC GTC GTC GAC ATC GTG CCC AAC CAC   1012
Ala His Glu Arg Gly Met Gly Val Val Val Asp Ile Val Pro Asn His
 75                  80                  85                  90
GTC GGC GTC GCG ACG CCG AAG GCG AAC CGC TGG TGG TGG GAC GTT CTG   1060
Val Gly Val Ala Thr Pro Lys Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu
                95                 100                 105
GCC CGT GGA CAG CGG TCG GAG TAC GCC GAC TAC TTC GAC ATC GAC TGG   1108
Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu Tyr Ala Asp Tyr Phe Asp Ile Asp Trp
            110                 115                 120

GAG TTC GGC GGC GGC AGG CTG CGC CTG CCC GTG CTC GGC GAC GGC CCC   1156
Glu Phe Gly Gly Gly Arg Leu Arg Leu Pro Val Leu Gly Asp Gly Pro
        125                 130                 135
GAC GAG CTC GAC GCG CTG AGA GTG GAT GGC GAC GAG CTC GTC TAC TAC   1204
Asp Glu Leu Asp Ala Leu Arg Val Asp Gly Asp Glu Leu Val Tyr Tyr
    140                 145                 150
GAG CAC CGC TTC CCG ATC GCC GAG GGC ACC GGC GGC GGC ACC CCG CGC   1252
Glu His Arg Phe Pro Ile Ala Glu Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Arg
155                 160                 165                 170
GAG GTG CAC GAC CGG CAG CAC TAC GAG CTG ATG TCG TGG CGG CGG GCC   1300
Glu Val His Asp Arg Gln His Tyr Glu Leu Met Ser Trp Arg Arg Ala
                175                 180                 185
GAC CAC GAC CTC AAC TAC CGC CGC TTC TTC GCC GTG AAC ACG CTC GCC   1348
Asp His Asp Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala
            190                 195                 200
GCC GTA CGC GTC GAA GAC CCG CGC GTG TTC GAC GAC ACC CAC CGC GAG   1396
Ala Val Arg Val Glu Asp Pro Arg Val Phe Asp Asp Thr His Arg Glu
        205                 210                 215
ATC GGC CGC TGG ATC GCC GAG GGC CTC GTC GAC GGC CTG CGC GTC GAC   1444
Ile Gly Arg Trp Ile Ala Glu Gly Leu Val Asp Gly Leu Arg Val Asp
    220                 225                 230
```

```
CAC CCC GAC GGG CTG CGC GCC CCC GGC GAC TAC CTG CGC CGT CTC GCC   1492
His Pro Asp Gly Leu Arg Ala Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala
235                 240                 245                 250
GAG CTC GCC CAA GGC AGG CCG ATC TGG GTC GAG AAG ATC ATC GAG GGC   1540
Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly
                255                 260                 265
GAC GAG CGG ATG CCC CCG CAG TGG CCC ATC GCC GGC ACC ACC GGC TAC   1588
Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr
            270                 275                 280
GAC GCG CTG GCC GGG ATC GAC CGG GTG CTC GTC GAC CCC GCG GGC GAG   1636
Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu
        285                 290                 295
CAT CCG CTC ACC CAG ATC GTC GAC GAG GCG GCA GGC AGC CCC CGG CGC   1684
His Pro Leu Thr Gln Ile Val Asp Glu Ala Ala Gly Ser Pro Arg Arg
    300                 305                 310
TGG GCC GAG CTG GTT CCC GAG CGC AAG CGG GCC GTC GCC CGC GGC ATC   1732
Trp Ala Glu Leu Val Pro Glu Arg Lys Arg Ala Val Ala Arg Gly Ile
315                 320                 325                 330
CTG AAC TCC GAG ATC CGC CGC GTC GCC CGC GAA CTC GGA GAG GTC GCC   1780
Leu Asn Ser Glu Ile Arg Arg Val Ala Arg Glu Leu Gly Glu Val Ala
                335                 340                 345
GGC GAC GTC GAA GAC GCG CTC GTC GAG ATC GCC GCC GCC CTG TCC GTC   1828
Gly Asp Val Glu Asp Ala Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ser Val
            350                 355                 360
TAC CGC AGC TAC CTG CCG TTC GGG CGC GAG CAC CTC GAC GAA GCC GTG   1876
Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Phe Gly Arg Glu His Leu Asp Glu Ala Val
        365                 370                 375
GCC GCC GCG CAG GCC GCA GCC CCC CAG CTC GAG GCC GAC CTC GCC GCC   1924
Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Pro Gln Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala
    380                 385                 390
GTC GGC GCA GCG CTC GCC GAC CCG GGC AAC CCC GCC GCG CTC CGC TTC   1972
Val Gly Ala Ala Leu Ala Asp Pro Gly Asn Pro Ala Ala Leu Arg Phe
395                 400                 405                 410
CAG CAG ACC AGC GGC ATG ATC ATG GCC AAG GGC GTC GAG GAC AAC GCG   2020
Gln Gln Thr Ser Gly Met Ile Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Asn Ala
                415                 420                 425
TTC TAC CGC TAC CCC CGG CTC ACC TCG CTG ACC GAG GTC GGG GGA GAC   2068
Phe Tyr Arg Tyr Pro Arg Leu Thr Ser Leu Thr Glu Val Gly Gly Asp
            430                 435                 440
CCG AGC CTG TTC GCG ATC GAC GCG GCC GCC TTC CAC GCG GCG CAG CGC   2116
Pro Ser Leu Phe Ala Ile Asp Ala Ala Ala Phe His Ala Ala Gln Arg
        445                 450                 455
GAC CGC GCC GCC CGG CTG CCC GAG TCG ATG ACG ACG CTG ACC ACC CAC   2164
Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His
    460                 465                 470
GAC ACC AAG CGC AGC GAA GAC ACC CGG GCG CGG ATC ACC GCG CTC GCC   2212
Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala
475                 480                 485                 490
GAG GCC CCC GAA CGC TGG CGG CGC TTC CTG ACC GAG GTC GGC GGG CTC   2260
Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu
                495                 500                 505
ATC GGA ACG GGC GAC CGG GTG CTG GAG AAC CTG ATC TGG CAG GCG ATC   2308
Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile
            510                 515                 520
```

```
GTC GGC GCG TGG CCG GCG AGC CGG GAG CGG CTC GAG GCC TAC GCG CTG   2356
Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu
        525                 530                 535
AAG GCC GCG CGC GAA GCC GGC GAG TCG ACC GAC TGG ATC GAC GGC GAC   2404
Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp
    540                 545                 550
CCC GCG TTC GAA GAG CGG CTG ACC CGC CTG GTC ACG GTC GCC GTC GAG   2452
Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu
555                 560                 565                 570
GAG CCG CTC GTG CAC GAG CTG CTC GAG CGG CTC GTC GAC GAG CTG ACG   2500
Glu Pro Leu Val His Glu Leu Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr
                575                 580                 585
GCG GCC GGG TAC TCC AAC GGC CTC GCG GCG AAG CTG CTG CAG CTG CTC   2548
Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu
            590                 595                 600
GCC CCC GGA ACC CCC GAC GTG TAC CAG GGC ACG GAA CGC TGG GAC CGG   2596
Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg
        605                 610                 615
TCG CTG GTG GAC CCG GAC AAC CGT CGC CCC GTG GAT TTC GCC GCG GCA   2644
Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala
    620                 625                 630
TCC GAG CTG CTC GAC CGC CTC GAC GGC GGC TGG CGG CCG CCC GTC GAC   2692
Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp
635                 640                 645                 650
GAG ACC GGC GCG GTC AAG ACG CTC GTC GTC TCC CGC GCG CTG CGG CTG   2740
Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu
                655                 660                 665
CGC CGC GAC CGG CCC GAG CTG TTC ACC GCG TAC CAC CCG GTC ACG GCG   2788
Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala
            670                 675                 680
CGC GGC GCG CAG GCC GAG CAC CTG ATC GGC TTC GAC CGC GGC GGC GCG   2836
Arg Gly Ala Gln Ala Glu His Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala
        685                 690                 695
ATC GCC CTG GCC ACC CGC CTG CCG CTC GGC CTC GCC GCC GCA GGC GGC   2884
Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly
    700                 705                 710
TGG GGC GAC ACG GTC GTC GAC GTC GGC GAG CGG AGC CTG CGC GAC GAG   2932

Trp Gly Asp Thr Val Val Asp Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu
715                 720                 725                 730
CTG ACC GGC CGC GAG GCC CGC GGA GCG GCG CGC GTG GCC GAG TTG TTC   2980
Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe
                735                 740                 745
GCC GAC TAC CCC GTC GCC CTG CTG GTG GAG ACA TGAACCGACG ATTCCCGGTC 3033
Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu Leu Val Glu Thr
            750                 755
TGGGCGCCCC AGGCCGCGCA GGTGACGCTC GTCGTGGGCC AAGGCCGCGC CGAACTCCCG 3093
CTGACCCGCG ACGAGAACGG ATGGTGGGCT CTTCAGCAGC CGTGGGACGG CGGCCCCGAC 3153
CTCGTCGACT ACGGCTACCT CGTCGACGGC AAGGGCCCCT TCGCCGACCC GCGGTCGCTG 3213
CGGCAGCCGC GCGGCGTGCA CGAGCTCGGC CGCGAATTC                        3252
```

(20)SEQID NO：20 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：26

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：20：

ATGCCCGCCA GTACCTACCG CCTTCA 26

(21)SEQ ID NO：21 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：25

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：21：

TCATGTCTCC ACCAGCAGGG CGACG 25

(22)SEQ ID NO：22 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：50

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：22：

AATTCTTTTT TAATAAAATC AGGAGGAATC TAGATGTTTA CTAGTCTGCA 50

(23)SEQ ID NO：23 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：42

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：23：

GACTAGTAAA CATCTAGATT CCTCCTGATT TTATTAAAAA AG 42

(24)SEQ ID NO：24 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：33

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：24：

AAATCTAGAT GCCCGCCAGT ACCTACCGCC TTC 33

(25)SEQ ID NO：25 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：33

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：25：

AAAACTAGTT TATCATGTCT CCACCAGCAG GGC 33

(26)SEQ ID NO：26 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：26：

ATCGGTGATG TCGGCGATAT AG 22

(27)SEQ ID NO：27 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：29

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：27：

GTACTGGCGG GCATATTTTT TCCTCCTGA 29

(28)SEQ ID NO：28 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：31

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：28：

AATCAGGAGG AAAAAATATG CCCGCCAGTA C 31

(29)SEQ ID NO：29 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：29：

TCGACGATCT GGGTGAGCGG AT 22

(30)SEQ ID NO：30 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：30：

TCGACGAGCA CCCGGTCGAT CC 22

(31)SEQ ID NO：31 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：26

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQID NO：31：

```
CARTGGGAYG AYGAYGTNCA YCAYGC                                        26
```

(32)SEQ ID NO：32 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：2218

(B) 类型：核酸

(C) 链数：双链

(D) 几何结构

(ii) 分子类型：基因组 DNA

(vi) 最初来源：

(A) 生物体：节杆菌

(B) 个别分离物：S34(FERM BP-6450)

(ix) 特征：

(A)名称/关键词：mat 肽

(B) 定位：477...2201

(C) 鉴定方法：E

(A)名称/关键词：3S'UTR

(B) 定位：2202...2218

(C) 鉴定方法：E

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：32：

```
CTGCAGCTGC TCGCCCCCGG AACCCCCGAC GTGTACCAGG GCACGGAACG CTGGGACCGG   60
TCGCTGGTGG ACCCGGACAA CCGTCGCCCC GTGGATTTCG CCGCGGCATC CGAGCTGCTC  120
GACCGCCTCG ACGGCGGCTG GCGGCCGCCC GTCGACGAGA CCGGCGCGGT CAAGACGCTC  180
GTCGTCTCCC GCGCGCTGCG GCTGCGCCGC GACCGGCCCG AGCTGTTCAC CGCGTACCAC  240
CCGGTCACGG CGCGCGGCGC GCAGGCCGAG CACCTGATCG GCTTCGACCG CGGCGGCGCG  300
ATCGCCCTGG CCACCCGCCT GCCGCTCGGC CTCGCCGCCG CAGGCGGCTG GGGCGACACG  360
GTCGTCGACG TCGGCGAGCG GAGCCTGCGC GACGAGCTGA CCGGCCGCGA GGCCCGCGGA  420
GCGGCGCGCG TGGCCGAGTT GTTCGCCGAC TACCCCGTCG CCCTGCTGGT GGAGAC ATG  479
                                                              Met
                                                               1
AAC CGA CGA TTC CCG GTC TGG GCG CCC CAG GCC GCG CAG GTG ACG CTC     527
Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr Leu
          5                  10                  15
GTC GTG GGC CAA GGC CGC GCC GAA CTC CCG CTG ACC CGC GAC GAG AAC    575
Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu Asn
     20                  25                  30
```

```
GGA TGG TGG GCT CTT CAG CAG CCG TGG GAC GGC GGC CCC GAC CTC GTC     623
Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu Val
     35                  40                  45
GAC TAC GGC TAC CTC GTC GAC GGC AAG GGC CCC TTC GCC GAC CCG CGG     671
Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro Arg
 50                  55                  60                  65
TCG CTG CGG CAG CCG CGC GGC GTG CAC GAG CTC GGC CGC GAA TTC GAC     719
Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe Asp
                 70                  75                  80
CCC GCC CGC TAC GCG TGG GGC GAC GAC GGA TGG CGC GGC CGA GAC CTC     767
Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp Leu
             85                  90                  95
ACC GGA GCC GTG ATC TAC GAA CTG CAC GTC GGC ACC TTC ACC CCT GAG     815
Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro Glu
        100                 105                 110
GGA ACG CTG GAC AGC GCC ATC CGT CGC CTC GAC CAC CTG GTG CGC CTC     863
Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg Leu
    115                 120                 125
GGC GTC GAC GCG GTC GAG CTG CTG CCC GTC AAC GCG TTC AAC GGC ACC     911
Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr
130                 135                 140                 145
CAC GGC TGG GGC TAC GAC GGG GTG CTC TGG TAC GCG GTG CAC GAG CCC     959
His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu Pro
                150                 155                 160
TAC GGC GGC CCG GAG GCG TAC CAG CGC TTC GTC GAC GCC TGC CAC GCC    1007
Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His Ala
            165                 170                 175
CGC GGC CTC GCC GTC GTG CAG GAC GTC GTC TAC AAC CAC CTG GGC CCG    1055
Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro
        180                 185                 190
AGC GGC AAC CAC CTG CCC GAC TTC GGC CCC TAC CTC GGG TCG GGC GCC    1103
Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly Ala
    195                 200                 205
GCC AAC ACC TGG GGC GAC GCG CTG AAC CTC GAC GGG CCG CTC TCC GAC    1151
Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser Asp
210                 215                 220                 225
GAG GTG CGG CGG TAC ATC ATC GAC AAC GCG GTG TAC TGG CTG CGC GAC    1199
Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg Asp
                230                 235                 240
ATG CAC GCC GAC GGG CTG CGG CTC GAC GCC GTG CAC GCG CTG CGC GAC    1247
Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg Asp
            245                 250                 255
GCC CGC GCG CTG CAC CTG CTC GAA GAG CTC GCC GCC CGC GTC GAC GAG    1295
Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp Glu
        260                 265                 270
CTG GCG GGC GAG CTC GGC CGG CCG CTG ACG CTC ATC GCC GAG AGC GAC    1343
Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp
    275                 280                 285
CTG AAC GAC CCG AAG CTG ATC CGC TCC CGC GCG GCG CAC GGC TAC GGC    1391
Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly
290                 295                 300                 305
CTC GAC GCC CAG TGG GAC GAC GAC GTG CAC CAC GCG GTG CAC GCC AAC    1439
Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala Asn
                310                 315                 320
GTG ACC GGC GAG ACC GTC GGC TAC TAC GCC GAC TTC GGC GGG CTC GGC    1487
Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu Gly
```

```
                325                 330                 335
GCC CTC GTC AAG GTG TTC CAG CGC GGC TGG TTC CAC GAC GGC ACC TGG   1535
Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr Trp
        340                 345                 350
TCG AGC TTC CGC GAG CGG CAC CAC GGC CGG CCG CTC GAC CCC GAC ATC   1583
Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp Ile
    355                 360                 365
CCG TTC CGC CGG CTC GTC GCC TTC GCG CAG GAT CAC GAC CAG GTC GGC   1631
Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val Gly
370                 375                 380                 385
AAC CGA GCG GTC GGC GAC CGC ATG TCG GCG CAG GTC GGC GAG GGT TCG   1679
Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly Ser
                390                 395                 400
CTC GCC GCC GCG GCG GCG CTC GTG CTG CTC GGC CCG TTC ACC CCG ATG   1727
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro Met
            405                 410                 415
CTG TTC ATG GGC GAG GAG TGG GGC GCG CGC ACC CCG TGG CAG TTC TTC   1775
Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe Phe
        420                 425                 430
ACC TCC CAC CCC GAG CCC GAG CTG GGG GAG GCG ACG GCG CGC GGG CGC   1823
Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly Arg
    435                 440                 445
ATC GCC GAG TTC GCC CGC ATG GGC TGG GAC CCG GCA GTC GTG CCC GAC   1871
Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp
450                 455                 460                 465
CCG CAG GAC CCG GCC ACC TTC GCC CGC TCG CAC CTG GAC TGG TCC GAG   1919
Pro Asp Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser Glu
                470                 475                 480
CCC GAG CGG GAA CCG CAC GCG GGC CTG CTC GCC TTC TAC ACC GAC CTG   1967
Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp Leu
            485                 490                 495
ATC GCG CTG CGG CGC GAG CTG CCG GTC GAT GCG CCG GCG CGC GAG GTG   2015
Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu Val
        500                 505                 510
GAT GCC GAC GAG GCG CGC GGC GTC TTC GCG TTC AGC CGC GGC CCG CTG   2063
Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro Leu
    515                 520                 525
CGG GTC ACG GTC GCG CTG CGC CCC GGA CCG GTC GGG GTG CCC GAG CAC   2111
Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu His
530                 535                 540                 545
GGG GGC CTC GTG CTC GCC TAC GGC GAG GTG CGC GCC GGC GCC GCC GGA   2159
Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala Gly
                550                 555                 560
CTG CAC CTC GAC GGG CCG GGA GCC GCG ATC GTG CGC CTC GAG           2201
Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu
            565                 570                 575
TGACGCGGCT GGGTACC                                               2218
```

(33)SEQ ID NO：33 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：25

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：33：

ATGAACCGAC GATTCCCGGT CTGGG 25

(34)SEQ ID NO：34 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：25

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：34：

TCACTCGAGG CGCACGATCG CGGCT 25

(35)SEQ ID NO：35 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：36

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：35：

AAATCTAGAT GAACCGACGA TTCCCGGTCT GGGCGC 36

(36)SEQ ID NO：36 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：36

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：36：

AAAACTAGTT TATCACTCGA GGCGCACGAT CGCGGC 36

(37)SEQ ID NO：37 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：28

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：37：

ATCGTCGGTT CATATTTTTT CCTCCTGA 28

(38)SEQ ID NO：38 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：28

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：38：

AATCAGGAGG AAAAAATATG AACCGACG 28

(39)SEQ ID NO：39 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 几何结构：线性

(xi)序列描述：SEQ ID NO：39：

AGGTGGTTGT AGACGACGTC CT 22

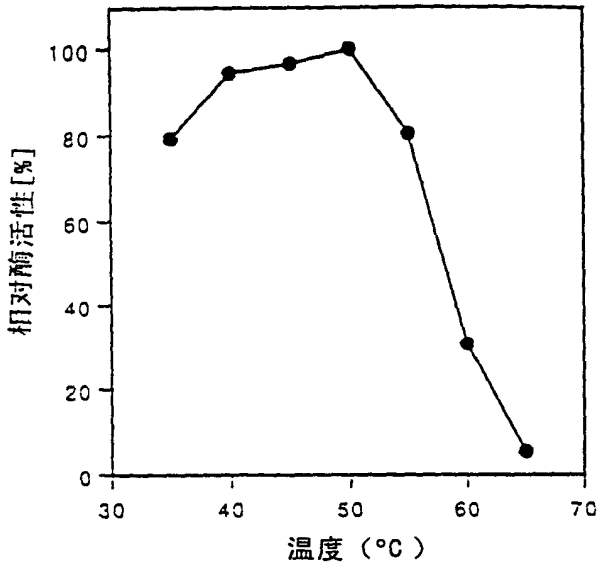

100
80
60
40
20
0
相对酶活性[%]
30
40
50
60
70
温度（°C）

图 1

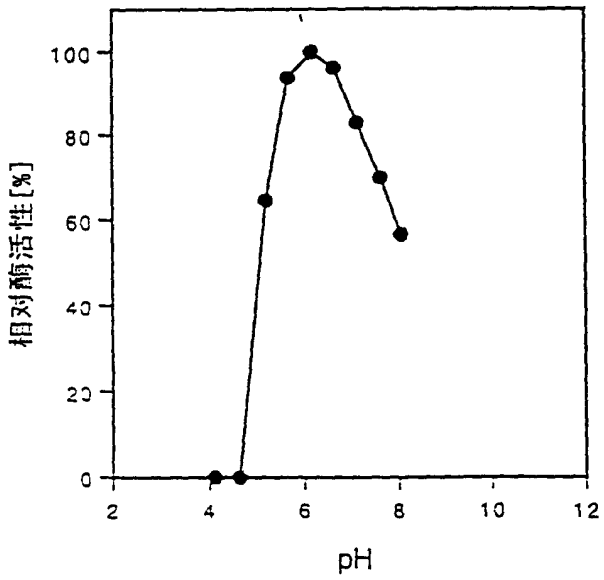

100
80
60
40
20
0
相对酶活性[%]
2
4
6
8
10
12
pH

图 2

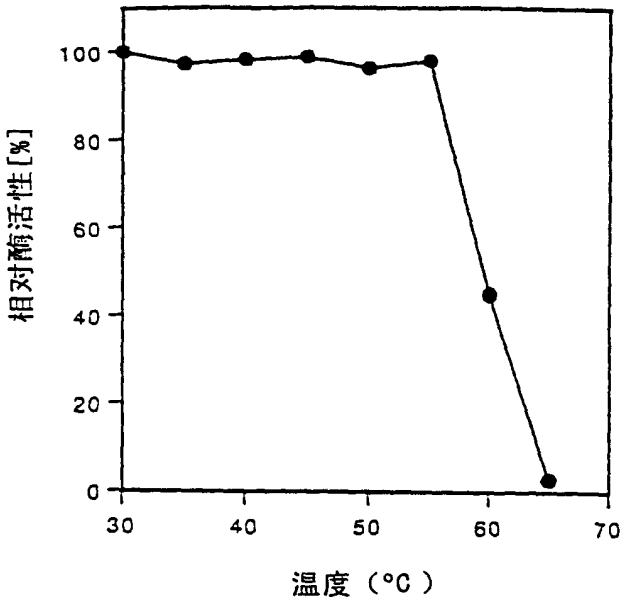

相对酶活性[%]
100
80
60
40
20
0
30
40
50
60
70
温度（°C）

图 3

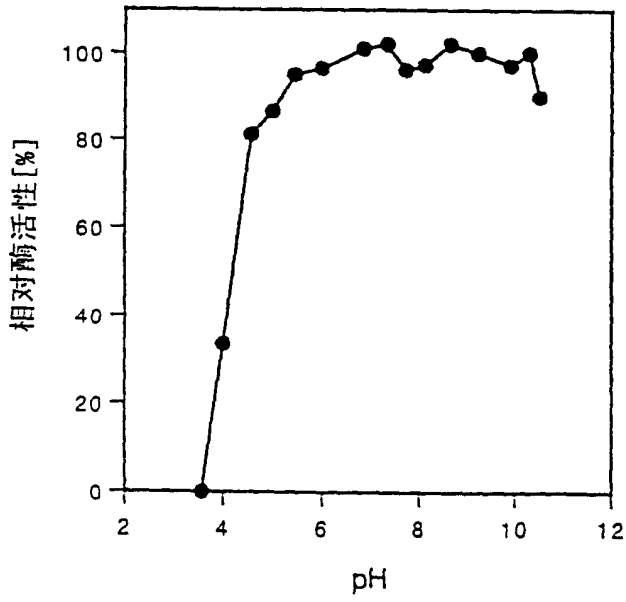

相对酶活性[%]
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
pH

图 4

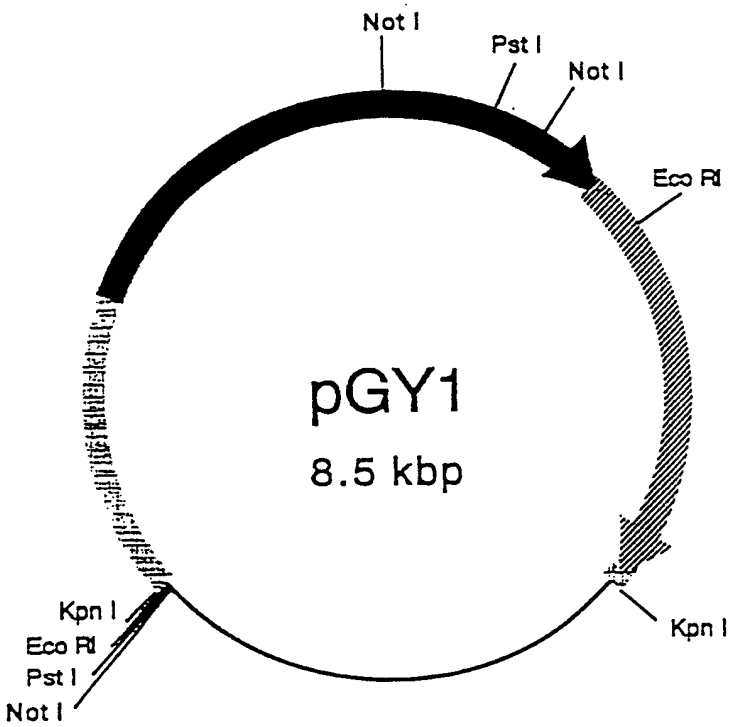


图 5

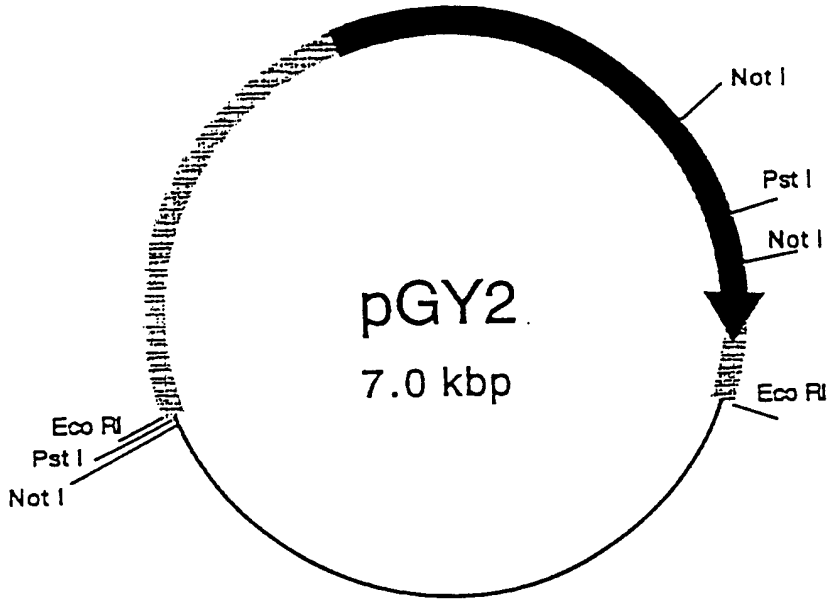


图 6

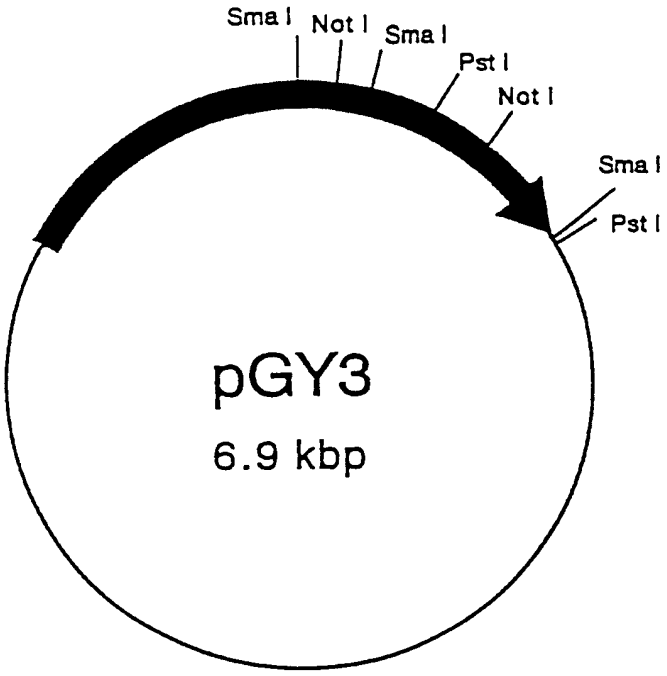


图 7

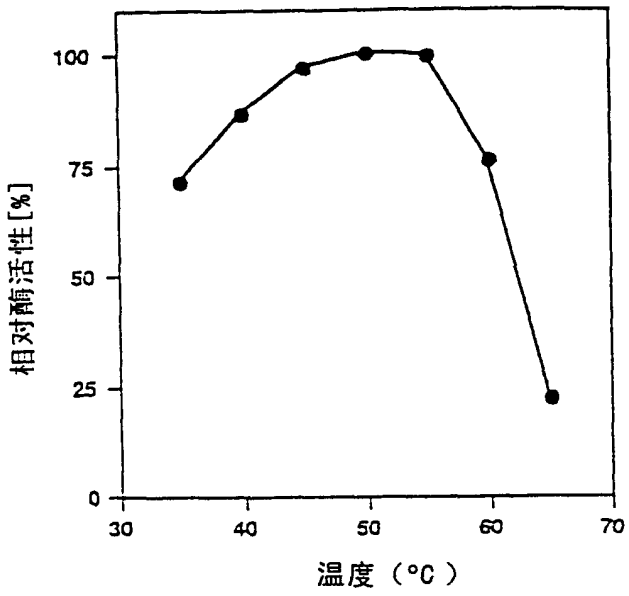

100
75
50
25
0
30
40
50
60
70
相对酶活性[%]
温度（°C）

图 8

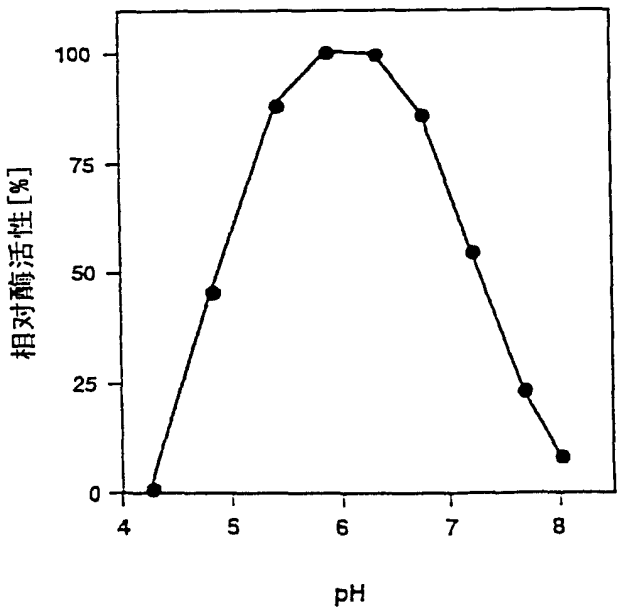

100
75
50
25
0
4
5
6
7
8
相对酶活性[%]
pH

图 9

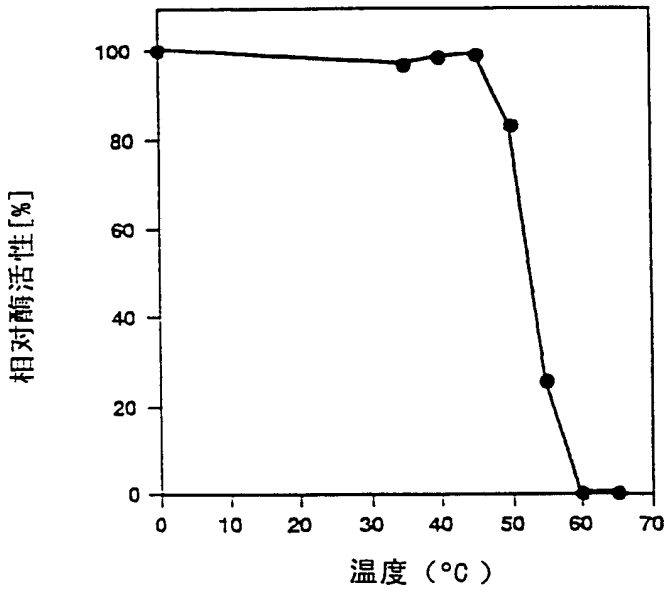

100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
相对酶活性[%]
温度（°C）

图 10

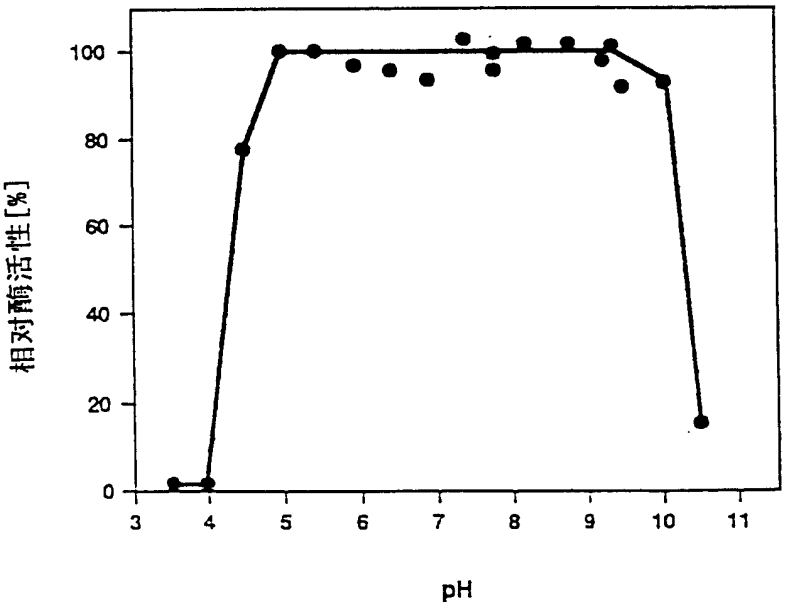

100
80
60
40
20
0
3
4
5
6
7
8
9
10
11
相对酶活性[%]
pH

图 11

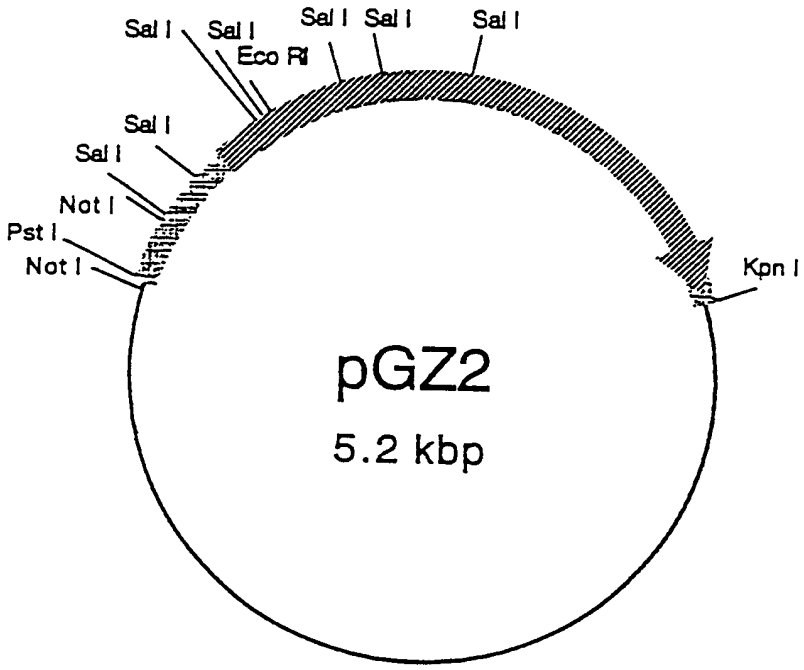

Sal I
Sal I
Eco RI
Sal I
Sal I
Sal I
Sal I
Sal I
Not I
Pst I
Not I
Kpn I
pGZ2
5.2 kbp

图 12

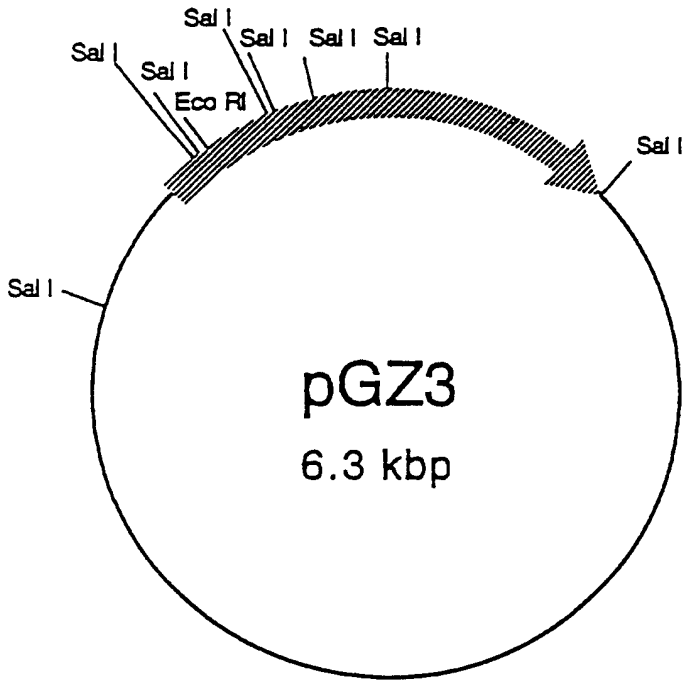


图 13