



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114072519 B

(45) 授权公告日 2025.03.04

(21) 申请号 202080028731.0
 (22) 申请日 2020.04.14
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114072519 A
 (43) 申请公布日 2022.02.18
 (30) 优先权数据
 2019-077041 2019.04.15 JP
 2019-145697 2019.08.07 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.10.14
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2020/016434 2020.04.14
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/213604 JA 2020.10.22
 (83) 生物保藏信息
 NITE BP-02937 2020.03.16
 (73) 专利权人 公立大学法人大阪
 地址 日本大阪
 (72) 发明人 炭谷顺一 谷修治 川口刚司

(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283
 专利代理师 刘兵 肖冰滨

(51) Int.Cl.
 C12P 19/12 (2006.01)
 C12P 19/22 (2006.01)
 C12N 5/10 (2006.01)
 A23L 5/00 (2006.01)
 A23L 33/135 (2006.01)
 C12N 1/15 (2006.01)
 C12N 1/19 (2006.01)
 C12N 1/21 (2006.01)
 C12N 15/56 (2006.01)
 C12N 15/63 (2006.01)
 C12N 9/26 (2006.01)

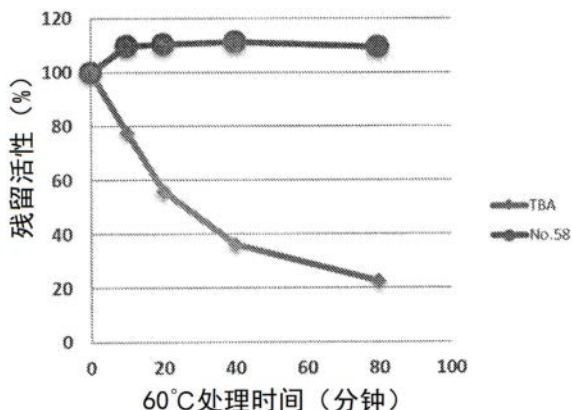
(56) 对比文件
 CN 107058263 A, 2017.08.18
 CN 107164345 A, 2017.09.15

审查员 汪豪杰

权利要求书1页 说明书17页
 序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称
 新型 β 淀粉酶及其应用和制备方法

(57) 摘要
 本发明的课题在于得到即使对于超过60°C的高温也具有耐热性的 β 淀粉酶。通过从土壤试样筛选得到 β 淀粉酶生产菌,得到来自具有耐热性的新 β 淀粉酶的新 *Bacillus halosaccharovorans* 株和新 *B. halosaccharovorans* 株的 β 淀粉酶。



1. 一种 β 淀粉酶,其由下述氨基酸序列构成:
 - (i) 序列编号2记载的氨基酸序列;或者
 - (ii) 序列编号18~21中任意一个记载的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的 β 淀粉酶,其中,所述 β 淀粉酶具有生淀粉分解活性。
3. 根据权利要求1所述的 β 淀粉酶,其中,所述 β 淀粉酶在60°C下具有生淀粉分解活性。
4. 一种DNA,其编码权利要求1所述的 β 淀粉酶。
5. 根据权利要求4所述的DNA,其中,所述DNA由(i)或(ii)所示,
 - (i) 序列编号13所示的碱基序列;
 - (ii) 序列编号30~33中的任意一个记载的碱基序列。
6. 一种DNA,其为进一步含有信号序列的权利要求4所述的DNA,由序列编号1或序列编号26~29中的任意一个记载的碱基序列构成。
7. 一种载体,其具有权利要求4-6中任意一项所述的DNA。
8. 一种微生物,其包含权利要求7所述的载体。
9. 一种细菌,其为保藏编号NITE BP-02937确定的细菌。
10. 一种 β 淀粉酶的制备方法,其包括培养权利要求8或9所述的微生物,并从培养物中提取 β 淀粉酶的工序。
11. 一种麦芽糖的制备方法,其特征在于,用权利要求1-3中任意一项所述的 β 淀粉酶处理淀粉。
12. 根据权利要求11所述的麦芽糖的制备方法,其中,在淀粉的温度为60°C以上且70°C以下添加权利要求1-3中任意一项所述的 β 淀粉酶。
13. 一种麦芽糖的制备方法,其特征在于,用权利要求8或9所述的微生物处理淀粉。
14. 一种麦芽糖的制备方法,其特征在于,用权利要求2或3所述的 β 淀粉酶处理生淀粉。
15. 一种食品的改性方法,其使用权利要求1-3中任意一项所述的 β 淀粉酶、或权利要求8或9所述的微生物。
16. 一种酶剂,其包含权利要求1-3中任意一项所述的 β 淀粉酶、或权利要求8或9所述的微生物。

新型 β 淀粉酶及其应用和制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新型 β 淀粉酶及其应用和制备方法。

背景技术

[0002] 淀粉是生物的重要营养来源,与纤维素同样是地球上大量存在的多糖中的一种。淀粉的结构包括葡萄糖以 α -1,4键聚合成直链而得到的直链淀粉,以及直链淀粉通过 α -1,6键分支而得到的支链淀粉。

[0003] 当将天然淀粉悬浮在水中并加热时,直链淀粉和支链淀粉的分子分散成淀粉溶液或淀粉糊。与这样的加热糊化的淀粉相区别,将具有天然的晶体/颗粒结构的淀粉称为生淀粉。生淀粉的晶体结构可通过加热使之水合来破坏。

[0004] 淀粉酶是水解该淀粉中的直链淀粉和支链淀粉的 α -1,4和 α -1,6键的酶的总称。

[0005] 淀粉酶根据作用方式大致可分为两类,即内切型淀粉酶和外切型淀粉酶。 α -淀粉酶被称为内切型淀粉酶,是一种随机水解淀粉的葡萄糖链的酶。 β 淀粉酶被称为外切型淀粉酶,是作用于淀粉或糖原等葡萄糖通过 α -1,4键聚合而成的多糖类,从非还原末端以麦芽糖(maltose)单位分解的酶。

[0006] β 淀粉酶由于可由淀粉生成麦芽糖的特性而被用于麦芽糖制备和食品加工。 β 淀粉酶已在甘薯、小麦、大麦、大豆等中被发现,已知是广泛分布在高等植物中的酶。另一方面,虽然长期以来认为来自微生物的 β 淀粉酶不存在,但从1970年代以来接连发现微生物具有的 β 淀粉酶(非专利文献1)。

[0007] 现有技术文件

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本发明专利公开公报特开2011-036237号

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:淀粉、相关糖类实验法(1989)

[0012] 非专利文献2:应用糖质科学第1卷第2号194-200(2011)

发明内容

[0013] 关于来自植物的 β 淀粉酶,由于可比较廉价地制备,因此在迄今为止的 β 淀粉酶的工业生产中主要利用植物原料。然而,随着近年来全球性的人口增加以及对作为可再生资源的生物燃料如生物乙醇的需求的增加,谷物需求和谷物价格在全球范围内都有上升的趋势。鉴于此,今后能否廉价且稳定地供给作为来自植物的 β 淀粉酶的原料的谷物,是不确定的状态。

[0014] 虽然接连发现了来自微生物的 β 淀粉酶,但实用化的很少。这是因为,迄今为止报告的来自微生物的 β 淀粉酶的耐热性、生产量低,另外生产菌的多数被分类为病原菌,不适合作为食品利用。天野酶公司为勉强进行作为产业用酶的来自弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)的 β 淀粉酶的销售的程度(专利文献1、非专利文献2)。

[0015] 该来自弯曲芽孢杆菌的 β 淀粉酶,虽然耐热性与来自其他微生物的 β 淀粉酶等相比比较高,但耐热性低于来自植物中耐热性最好的来自大豆的酶,不能说具有充分的耐热性。另外,已知耐热性优异的来自大豆的酶对生淀粉的分解活性也低。

[0016] 一般而言,工业上用淀粉酶分解淀粉时,将淀粉一次加热而进行,但从近来节能的观点出发,希望不加热糊化而直接高效率地使生淀粉进行酶反应。

[0017] 由此,要求开发来自不具有病原性的来自微生物的 β 淀粉酶。

[0018] 本发明的发明人惊奇地发现,发明人新分离的非病原性菌株 *Bacillus halosaccharovorans* No.58株比来自谷物和来自微生物的菌株产生耐热性更高的 β 淀粉酶。

[0019] 因此,本发明提供保藏编号NITE BP-02937确定的细菌。

[0020] 另外,本发明提供由保藏编号NITE BP-02937确定的细菌产生的 β 淀粉酶。

[0021] 另外,本发明提供由如下氨基酸序列构成的 β 淀粉酶,

[0022] (i) 序列编号2或序列编号12记载的氨基酸序列;

[0023] (ii) 在序列编号2或序列编号12记载的氨基酸序列中缺失、取代、插入和/或增添了一个至数个氨基酸残基的氨基酸序列;或者

[0024] (iii) 与序列编号2或序列编号12记载的氨基酸序列具有90%以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0025] 进而,本发明提供一种 β 淀粉酶,参照序列编号2记载的氨基酸序列,所述 β 淀粉酶包含选自位于与氨基酸编号4位相对应的位置的苏氨酸变为脯氨酸的取代、位于与氨基酸编号15位相对应的位置的苏氨酸变为赖氨酸或精氨酸的取代、或位于与氨基酸编号306位相对应的位置的谷氨酰胺变为天冬氨酸的取代中的一种以上。

[0026] 进而,本发明提供由如下氨基酸序列构成的 β 淀粉酶,

[0027] (i) 序列编号18~序列编号25中任意一个记载的氨基酸序列;

[0028] (ii) 在序列编号18~序列编号25中任意一个记载的氨基酸序列中缺失、取代、插入、和/或增添了一个至数个氨基酸残基的氨基酸序列;或者

[0029] (iii) 与序列编号18~序列编号25中任意一个记载的氨基酸序列具有90%以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0030] 进而,本发明提供编码上述 β 淀粉酶的DNA。

[0031] 进而,本发明提供编码具有 β 淀粉酶活性的蛋白质的DNA,其中,所述DNA为

[0032] (i) 序列编号1或序列编号13所示的碱基序列;

[0033] (ii) 与序列编号1或序列编号13所示的碱基序列90%以上同一的碱基序列;

[0034] (iii) 与(i)或(ii)所示的碱基序列所示的DNA在严格条件下杂交的DNA。

[0035] 进而,本发明还提供编码具有 β 淀粉酶活性的蛋白质的DNA,其中,所述DNA具有(i)和(ii)中任意一个的DNA,或者为(iii)的DNA,

[0036] (i) 序列编号26~序列编号33中任意一个所述的碱基序列;

[0037] (ii) 具有与序列编号26~序列编号33中任意一项记载的碱基序列具有90%以上的序列同一性的碱基序列;

[0038] (iii) 与(i)或(ii)所示的碱基序列所示的DNA在严格条件下杂交的DNA。

[0039] 进而,本发明提供一种由序列编号1、序列编号13和序列编号26-33所示的碱基序

列的简并序列构成的DNA。

[0040] 进而,本发明提供具有上述DNA的载体。

[0041] 进而,本发明提供一种微生物,其包含具有上述DNA的载体。

[0042] 进而,本发明提供一种 β 淀粉酶的制备方法,其包括从上述细菌或上述微生物的培养物中提取 β 淀粉酶的工序。

[0043] 进而,本发明提供一种麦芽糖的制备方法,其特征在于,用上述 β 淀粉酶处理淀粉。

[0044] 进而,本发明提供一种生产麦芽糖的方法,其特征在于,用上述细菌或上述微生物处理淀粉。

[0045] 进而,本发明提供一种麦芽糖的制备方法,其特征在于,用上述 β 淀粉酶处理生淀粉。

[0046] 进而,本发明提供使用上述细菌、上述 β 淀粉酶、或上述微生物的食物的改性方法。

[0047] 另外,本发明提供使用上述细菌、上述 β 淀粉酶、或上述微生物的酶剂。

[0048] 根据本发明,提供一种不具有病原性的新型 β 淀粉酶。

附图说明

[0049] 图1是通过候选菌株培养上清对淀粉的分解产物的TLC分析的结果。

[0050] 图2是表示No.58株培养上清中淀粉酶在60°C下的温度稳定性的图。

[0051] 图3是表示各种淀粉酶中的还原糖生成量与相对KI/I₂值的关系的图。

[0052] 图4是将纯化的 β 淀粉酶供给SDS-PAGE的结果。

[0053] 图5是本发明的 β 淀粉酶基因的碱基序列和推定的氨基酸序列。

[0054] 图6是表示来自No.58株的 β 淀粉酶的最适pH的图。

[0055] 图7是表示来自No.58株的 β 淀粉酶的pH稳定性的图。

[0056] 图8是表示来自No.58株的 β 淀粉酶的最适温度的图。

[0057] 图9是比较包括来自No.58株的 β 淀粉酶的5种 β 淀粉酶在60°C热处理时的酶残留活性的结果。

[0058] 图10是比较包括来自No.58株的 β 淀粉酶的5种 β 淀粉酶在65°C热处理时的酶残留活性的结果。

[0059] 图11是表示分别用包括来自No.58株的 β 淀粉酶的3种 β 淀粉酶对来自小麦的生淀粉进行酶处理时的生淀粉分解率的图。

[0060] 图12是表示分别用包括来自No.58株的 β 淀粉酶的3种 β 淀粉酶对来自玉米的生淀粉进行酶处理时的生淀粉分解率的图。

[0061] 图13是将纯化的 β 淀粉酶突变酶供给SDS-PAGE的结果。

[0062] 图14是表示 β 淀粉酶突变酶中在65°C下的淀粉酶的温度稳定性的图。

具体实施方式

[0063] β 淀粉酶的性质

[0064] 根据本发明的酶是 β 淀粉酶,其是将淀粉中的葡萄糖多糖中的 α -1,4糖苷键从非还原末端以麦芽糖单位分解的酶。

[0065] No.58株产生的 β 淀粉酶具有以下性质。

[0066] (1) 本发明的 β 淀粉酶的底物不限于淀粉。本发明的 β 淀粉酶例如可以与直链淀粉、支链淀粉、糖原、糊精反应。

[0067] (2) 酶的分子量约为60,000Da。

[0068] (3) 本酶的最适温度约为50°C。本酶在约37°C ~ 60°C和pH7.0的条件下与底物反应10分钟条件下,示出在50°C下活性的70%以上的活性。另外,即使在60°C下处理75分钟,本酶也不丧失活性。即使在65°C下处理30分钟后,也具有在50°C下活性的40%的活性。

[0069] (4) 本酶的最适pH约为7.0。本酶在pH6.0-9.0和37°C下与底物反应10分钟条件下,与pH7.0的活性相比,显示80%以上的残留活性。另外,将本酶在pH5.0-9.0、4°C放置16小时后,使pH回到7.0并在37°C与底物反应10分钟,与在pH7.0、4°C放置16小时的样品的活性相比,也显示80%以上的残留活性。

[0070] (5) 具有对生淀粉的活性,在60°C、pH7.0的条件下在24小时的反应中能够分解65%的来自小麦的生淀粉。另外,对于来自玉米的生淀粉在70°C、pH7.0下反应8小时也能够分解27%。

[0071] (6) 分解淀粉仅产生麦芽糖。

[0072] 本发明的 β 淀粉酶可以由序列编号2或序列编号12所示的氨基酸序列,或者在序列编号2或序列编号12所示的氨基酸序列中缺失、取代、插入和/或增添了一个至数个氨基酸残基的氨基酸序列,或者与序列编号2或序列编号12记载的氨基酸序列具有90%以上的序列同一性的氨基酸序列构成的 β 淀粉酶。氨基酸序列的同一性优选具有95%、更优选99%以上的同一性。另外,本发明的 β 淀粉酶只要具有 β 淀粉酶活性,则可以是增添在其他蛋白质上的融合蛋白的形式,也可以是固定在珠粒等树脂上的形式。作为融合蛋白,例如可以举出脱支酶、异淀粉酶、支链淀粉酶、葡糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、磷酸酶、木聚糖酶等结合的蛋白,以及与用于纯化的组氨酸(His)标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签和谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合的蛋白的形式。取代优选保守取代。保守取代是指被取代的氨基酸所具有的性质不发生变化。具体而言,是指Phe、Trp、Tyr间的取代、Leu、Ile、Val间的取代、Lys、Arg、His间的取代、Asp、Glu间的取代、Ser、Thr间的取代。特别是关于氨基酸序列的N末端和/或C末端的缺失,只要具有与具有序列编号2所示的氨基酸序列的 β 淀粉酶同等的酶活性,则对氨基酸序列的N末端和/或C末端缺失的氨基酸的数量没有限制,这样的缺失体可以不需要试错而容易地获得。这里所说的“一个至数个”,例如可以取1-9个,优选1-8个,更优选1-6个,更优选1-5个,更优选1-4个,更优选1-3个,或者更优选1-2个之间的数。

[0073] 另外,如果取代部位是选自序列编号2记载的氨基酸序列的氨基酸编号4位的苏氨酸变为脯氨酸的取代(序列编号18)、氨基酸编号15位的苏氨酸变为赖氨酸的取代(序列编号19)、氨基酸编号15位的苏氨酸变为精氨酸的取代(序列编号20)、或氨基酸编号306位的谷氨酰胺变为天冬氨酸的取代(序列编号21)中的一个以上,或者选自序列编号12记载的氨基酸序列的氨基酸编号33位的苏氨酸变为脯氨酸的取代(序列编号22)、氨基酸编号44位的苏氨酸变为赖氨酸的取代(序列编号23)、氨基酸编号44位的苏氨酸变为精氨酸的取代(序列编号24)、或氨基酸编号335位的谷氨酰胺变为天冬氨酸的取代(序列编号25)中的一个以上,则可以得到耐热性更优异的 β 淀粉酶。

[0074] 另外,本发明的 β 淀粉酶也可以为由序列编号18~序列编号25中任意一个记载的

氨基酸序列,或者在序列编号18~序列编号25中任意一个记载的氨基酸序列中缺失、取代、插入和/或增添了一个至数个氨基酸残基的氨基酸序列,或者与序列编号18~序列编号25中任意一个记载的氨基酸序列具有90%以上的序列同一性的氨基酸序列构成的 β 淀粉酶。这些序列优选具有上述取代。氨基酸序列的同一性优选具有95%、更优选99%以上的同一性。

[0075] 本发明中的同一是指将作为比较对象的2个序列以最大一致的方式对齐时,在2个序列间对应的位置上,作为一致的碱基或氨基酸的比例(百分率)而算出。同一性是指在某2个序列中可以用以下的函数表示。

[0076] 同一性(%) = (两个序列间的对应位置上一致的碱基或氨基酸的数量) / (作为基准的序列中碱基或氨基酸的总数 \times 100)

[0077] 氨基酸序列的分析或两个或更多个氨基酸序列的同一性的比较可使用本领域技术人员通常使用的分析程序来进行。例如,氨基酸序列的分析可以使用GENETYX-WIN Ver.7,氨基酸序列的同一性的检索可以使用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLAST检索。关于碱基序列,也与氨基酸序列同样,可以通过本领域技术人员通常使用的分析程序进行分析、检索。

[0078] 本发明的淀粉酶涉及的酶活性测定,只要是可定量测定酶分解底物、分解后得到的糖类的方法即可,没有特别限定。例如,可以使用Somogyi-Nelson法这样的还原糖定量法进行测定。

[0079] 本发明的淀粉酶的酶反应产物,与上述这样的定量检测法不同,在仅以检测所含糖为目的时,也可以使用定性检测法进行检测。这只要能够确定分析对象物中含有的糖类等就没有特别限定,例如可以考虑利用薄层色谱(TLC)的检测法。

[0080] 本发明的 β 淀粉酶即使将 β 淀粉酶在60°C下进行10分钟的热处理,与未进行加热处理的 β 淀粉酶相比,也可以具有最低80%的活性。进而,本酶即使在60°C下进行20、40、80分钟的热处理,与未进行加热处理的 β 淀粉酶相比,也可以具有最低80%的活性。

[0081] 本发明的 β 淀粉酶也可以具有生淀粉分解活性。本发明中的生淀粉是指未进行加热处理的状态的淀粉。与加热糊化的淀粉不同,生淀粉具有结晶/颗粒结构。生淀粉的结晶结构可通过加热使之水合来破坏。加热温度根据生淀粉的种类而不同,例如,来自小麦或玉米的淀粉的糊化温度高,糊化温度需要在80°C以上的加热。

[0082] 作为酶的底物的淀粉不依赖于特定的生物,例如可以使用大豆、小豆、大麦、小麦、玉米、稻、马铃薯、甘薯、葛、蕨、绿豆、蚕豆、莲藕、木薯、西米棕榈、猪牙花等。

[0083] 本发明得到的细菌的一个具体例子为2019年4月12日以保藏编号NITE BP-02937保藏于独立行政法人产品评价技术基础机构专利微生物保藏中心(日本千叶县木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)的细菌*Bacillus halosacchaloovorans* No.58(本说明书中也简称为“*No.58株*”)。*No.58株*的特征在于,其为好氧细菌,呈杆状细胞形态,形成奶油色菌落和孢子。

[0084] 本菌株是不具有病原性的菌株,因此可以适合用于食品等。

[0085] 本发明涉及的具有序列编号2记载的氨基酸的 β 淀粉酶是从*No.58株*得到的酶。*No.58株*具有序列编号1所示的DNA序列,具有作为具有序列编号2的氨基酸序列的蛋白质的 β 淀粉酶。

[0086] 本发明的 β 淀粉酶,例如如No.58株这样,可以通过培养具有序列编号1所示的DNA的细菌、或具有含有该序列的载体、或整合有该序列的重组体而得到。No.58株和重组体的培养,本领域技术人员一般可以采用淀粉酶生产的方法进行。另外,作为宿主的微生物也可以使用本领域技术人员通常使用的微生物来进行。对宿主微生物没有特别限定,例如可以使用非病原性的大肠杆菌、酵母、放线菌、藻类、乳酸菌、枯草杆菌等。

[0087] 培养条件可以根据宿主、表达系统适当调节至最佳。作为培养基,没有特别限制,只要培养对象能够增殖即可。培养基可以是固体或液体,但优选液体。

[0088] 作为更具体的例子,将 β 淀粉酶基因插入大肠杆菌表达用载体中,转化大肠杆菌。将得到的转化体根据需要接种到含有抗生素的2ml的 $2 \times$ TY培养基中,在 30°C 振荡培养24小时得到菌体,集菌后,进行超声波破碎,由此可以在破碎液中得到 β 淀粉酶。

[0089] 作为固体培养基,例如可以考虑香蕉、苹果、橙子等果实残渣、大豆等豆类、或植物油的榨渣等来自植物资源的生物质等。

[0090] 在本发明中,培养物是指将微生物加入培养底物中进行培养的含有底物或其反应物、培养的菌体的混合物。培养物包括但不限于培养的微生物(接种的微生物和由该微生物增殖的微生物)、培养基、培养基补充/添加剂和由培养的微生物分泌的物质。培养物的全部或一部分可以是液态或固态。培养物为液态的也称为培养液。培养物优选包含培养的微生物和来自培养的微生物的分泌物中的至少一种。培养物优选为培养液。

[0091] 本发明的DNA为编码上述 β 淀粉酶的DNA。

[0092] 另外,本发明的DNA为编码具有 β 淀粉酶活性的蛋白质的DNA,其中,所述DNA可以为具有(i)和(ii)中任意一个的DNA,

[0093] (i) 序列编号1或序列编号13所示的碱基序列;

[0094] (ii) 与序列编号1或序列编号13所示的碱基序列90%以上同一的碱基序列,;

[0095] 或者为与(i)或(ii)所示的碱基序列所示的DNA在严格条件下杂交的DNA。

[0096] 关于碱基序列,“同一”如上述说明。严格条件是本领域技术人员通常已知的,例如,可以举出在市售的杂交溶液ExpressHyb Hybridization Solution(Takara Bio)中在 68°C 下杂交的条件,或使用固定有DNA的过滤器在 $0.7\text{M} \sim 1.0\text{M}$ 的NaCl存在下在约 65°C 下进行杂交后,使用0.1-2倍浓度的SSC溶液($1 \times$ SSC溶液:150mM NaCl、15mM柠檬酸钠、pH7.0)在约 65°C 下进行清洗的条件。碱基序列与序列编号1或序列编号13所示的碱基序列优选具有95%以上、更优选99%以上同一的碱基序列。

[0097] DNA序列的取代部位,例如只要选自序列编号1的第97位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶的取代(序列编号26),序列编号1的第131位的胞嘧啶碱基变为腺嘌呤碱基的取代(序列编号27),序列编号1的第130位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基、第131位的胞嘧啶碱基变为鸟嘌呤碱基、第132位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基的取代(序列编号28),序列编号1的第1003位的胞嘧啶碱基变为鸟嘌呤碱基、第1005位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基的取代(序列编号29),或者序列编号13的第10位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶的取代(序列编号30),序列编号13的第44位的胞嘧啶碱基变为腺嘌呤碱基的取代(序列编号31),序列编号13的第43位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基、第44位的胞嘧啶碱基变为鸟嘌呤碱基、第45位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基的取代(序列编号32),序列编号13的第916位的胞嘧啶碱基变为鸟嘌呤碱基、第918位的腺嘌呤碱基变为胞嘧啶碱基的取代(序列编号33)中的一个以上,就可以得

到耐热性更优异的 β 淀粉酶。

[0098] 另外,本发明的DNA是编码具有 β 淀粉酶活性的蛋白质的DNA,所述DNA可以为具有(i)和(ii)中任意一个的DNA,或者为(iii)的DNA,

[0099] (i) 序列编号26~序列编号33中任意一个记载的碱基序列;

[0100] (ii) 与序列编号26~序列编号33中任意一个所述的碱基序列具有90%以上、优选95%以上、更优选99%以上的序列同一性的碱基序列;

[0101] (iii) 与由(i)或(ii)所示的碱基序列构成的DNA在严格条件下杂交的DNA。

[0102] 另外,本发明的DNA也可以是由序列编号1、序列编号13和序列编号26~33记载的碱基序列的简并序列构成的DNA。在此,简并是指编码一个氨基酸的密码子有多种。因此,例如当简并序列中的一个氨基酸例如为精氨酸时,简并序列的碱基序列可以为与编码精氨酸的6种密码子(CGU、CGC、CGA、CGG、AGA、AGG)中任意一个对应的序列。

[0103] 本发明的DNA可以通过使用本领域技术人员通常进行的基因工程的方法来处理。序列编号1所示的DNA序列可以通过使用对应的引物的PCR处理来获得,也可以基于序列信息进行全合成来获得。

[0104] 本发明的DNA也可以以具有本发明DNA的载体的形式提供。载体只要是满足本领域技术人员通常使用的整合有本基因的用途的载体,就没有限定,例如可以使用pBluescript II SK(+)载体、pBluescript II SK(-)载体。

[0105] 本发明提供一种微生物,其包含具有本发明的DNA的载体。作为宿主的微生物,只要是本领域技术人员通常用作载体的宿主的微生物,就没有特别限定,例如可以使用非病原性的大肠杆菌、酵母、放线菌、藻类、乳酸菌、枯草杆菌等。

[0106] 本发明还提供了 β 淀粉酶的制备方法。

[0107] 本发明的 β 淀粉酶也可以通过从含有 β 淀粉酶的微生物的培养液中分离而得到。分离方法可以通过本领域技术人员通常使用的方法进行。制备方法中包括培养菌体的步骤、以及从培养物或培养菌体中提取 β 淀粉酶的步骤。

[0108] 培养菌体的步骤为培养No.58株或包含本发明的DNA的重组微生物。作为重组体的宿主只要能够培养、能够表达蛋白质,就没有特别限定,例如可以使用非病原性的大肠杆菌、酵母、放线菌、藻类、乳酸菌、枯草杆菌等。

[0109] 培养条件可以根据宿主、表达系统适当调节至最佳。作为培养基,只要培养对象能够增殖即可,没有特别限定。培养基可以为固体或液体,但优选为液体。

[0110] 培养方法只要是培养对象能够增殖的方法即可,没有特别限定。例如,可以使用静置培养、振荡培养、厌氧培养等。

[0111] 例如,使用No.58株时,可以举出以下条件。所使用培养基包括用于淀粉酶生产菌的液体培养基、2×TY培养基(记载于实施例表中表1和表2中)、LB培养基、Nutrient Agar培养基(Difco)等。

[0112] 培养基的pH优选为6.0-9.0,更优选为pH7.0。

[0113] 培养温度优选为20-50°C,更优选为45°C。

[0114] 在有氧条件下,可以通过静置培养、振荡培养或旋转培养进行培养。

[0115] 从培养物或培养菌体回收 β 淀粉酶的步骤中,可以利用纯化步骤从含有 β 淀粉酶的培养物或培养菌体中纯化从而得到 β 淀粉酶。酶的纯化方法只要能够从培养物或培养菌体

中得到 β 淀粉酶即可,没有特别限定,例如,将培养上清供给离心分离或过滤器过滤,除去菌体或固体物等后,可以通过组合利用超滤过滤器的滤取或浓缩、盐析或使用柱子的色谱、利用活性炭的吸附等纯化该酶。作为所使用的柱子,只要是不使酶失活而能够与其他蛋白质或杂质分离的柱子,就没有特别限定,可以举出阴离子交换色谱用柱、阳离子交换色谱用柱、疏水性相互作用色谱用柱、凝胶过滤色谱用柱、亲和色谱柱等。例如,使用作为疏水性相互作用色谱用柱的TOYOPEARL Butyl-650M柱、作为阴离子交换色谱用柱的TOYOPEARL DEAE-650M柱。

[0116] 粗纯化或纯化的蛋白质的检测,只要能够分离、检测试样中含有的蛋白质,就可以通过没有特别限定的方法进行。例如,可以使用SDS-PAGE那样的使用电泳的方法。

[0117] 用于后述的酶活性测定或酶纯化等的缓冲液,可以根据实验的用途适当地改变。缓冲液的性质优选不影响酶的活性和稳定性。作为缓冲液,例如可以使用Tris-HCl。

[0118] 本发明的 β 淀粉酶的制备方法中,使用培养菌体时,还包括从培养菌体中提取 β 淀粉酶的工序。

[0119] 从培养菌体提取 β 淀粉酶的方法没有特别限定,可以是本领域技术人员公知的任意方法。 β 淀粉酶可通过例如使细菌体增溶(超声波破碎)来破坏细胞表面的结构(例如细胞膜)的一部分或整体而得到。用于提取的菌体可以是活菌也可以是死菌。

[0120] 本发明的 β 淀粉酶由于从淀粉仅生成麦芽糖,因此根据本发明的 β 淀粉酶的制备方法,麦芽糖的制备变得容易。

[0121] 本发明还提供麦芽糖的制备方法,其特征在于,用本发明的 β 淀粉酶处理淀粉。

[0122] 淀粉的酶处理一般对将生淀粉加热并糊化的淀粉进行,因此糖化工序在酶处理前进行。加热温度根据生淀粉的种类而不同,但来自小麦或玉米的淀粉的糊化温度高。此时,如果使用耐热性低的 β 淀粉酶,则由于加热的淀粉的热而使酶失活,因此需要将加热糊化的淀粉冷却至适于酶反应的温度。由此,在淀粉的糖化处理时,产生加热淀粉的冷却成本,也产生冷却时间。另外,当冷却底物并反应时,杂菌繁殖的风险也增大。

[0123] 由于本发明的 β 淀粉酶具有高耐热性,因此可以降低淀粉的冷却成本和/或缩短冷却时间,从而可以适用于淀粉的糖化处理。通过该 β 淀粉酶的高耐热性,可以加入到加热处理后的淀粉中,进而也可以加入到加热处理中的淀粉中。添加 β 淀粉酶后的温度和pH,如上述酶性质中记载的那样,只要是酶能够分解淀粉的条件,就没有特别限定,本发明的 β 淀粉酶可以在作为底物的淀粉的温度为70°C以下的温度下添加,也可以在60°C以上且70°C以下添加。作为酶的底物的淀粉不依赖于特定的生物,例如可以使用大豆、小豆、大麦、小麦、玉米、稻、马铃薯、甘薯、葛、蕨、绿豆、蚕豆、莲藕、木薯、西米棕榈、猪牙花等。酶反应可以通过再加热或pH调整等药剂处理使酶失活而终止反应。

[0124] 通过本发明的 β 淀粉酶,可以由淀粉制备麦芽糖。本发明的 β 淀粉酶由于从淀粉仅生成麦芽糖,因此根据本发明,麦芽糖的制备变得容易。

[0125] 本发明还提供了麦芽糖的制备方法,其特征在于,用本发明的微生物处理淀粉。

[0126] 培养No.58株时, β 淀粉酶作为菌体外酶从菌体放出到培养液中。因此,将No.58株与淀粉共培养时, β 淀粉酶向菌体外放出,放出的 β 淀粉酶可以与淀粉反应,生成麦芽糖。这样,只要能将本发明的 β 淀粉酶作为菌体外酶放出即可,培养的菌体不限于No.58株,也可以是具有No.58株 β 淀粉酶的重组微生物。此时的培养条件只要是能够培养的微生物的条件即

可,没有特别限制,也可以含有生长所必需的淀粉以外的物质。

[0127] 即使是不向菌体外放出 β 淀粉酶的微生物,只要将淀粉摄入菌体内,通过菌体内的 β 淀粉酶将淀粉转换为麦芽糖,麦芽糖向菌体外放出即可,则使用的重组微生物不限于能够将 β 淀粉酶作为菌体外酶而放出的微生物,但优选向菌体外放出 β 淀粉酶的微生物。

[0128] 通过具有本发明的 β 淀粉酶的微生物,可以由淀粉制备麦芽糖。具有本发明的 β 淀粉酶的微生物,由于从淀粉仅生成麦芽糖,因此麦芽糖的制备变得容易。

[0129] 本发明还提供麦芽糖的制备方法,其特征在于,用本发明的 β 淀粉酶处理生淀粉。

[0130] 以往的 β 淀粉酶对生淀粉的活性低,不适合直接将生淀粉作为底物使用。本发明的 β 淀粉酶由于保持对生淀粉的高酶活性,因此可适用于生淀粉的酶处理。生淀粉的状态只要是酶能够反应的状态即可,没有特别限定,优选悬浮在水溶液中的状态。添加 β 淀粉酶后的温度和pH,如上述酶性质中记载的那样,只要是酶能够分解淀粉的条件,就没有特别限定。作为酶的底物的淀粉不依赖于特定的生物,例如可以使用大豆、小豆、大麦、小麦、玉米、稻、马铃薯、甘薯、葛、蕨、绿豆、蚕豆、莲藕、木薯、西米棕榈、猪牙花等。酶反应可以通过加热或pH调整等药剂处理使酶失活而终止反应。

[0131] 通过本发明的 β 淀粉酶,可以从生淀粉制备麦芽糖。

[0132] 本发明还提供使用本发明的 β 淀粉酶或本发明的微生物的食物的改性方法。

[0133] 食物的改性是指使食物的特性变化。本发明中,是指将淀粉等含有具有 α -1,4糖苷键的多糖类的食物的性质制成优选的形式。例如,通过在烘烤前的面包坯料等中配合本发明的酶,可以改善面包坯料的触感、增大面包容积、防止面包制品老化(维持柔软度)、防止冷冻或冷藏保管的面包坯料的烘烤色变红、维持年糕的柔软度等。可以使用的食物没有特别限定,优选为含有淀粉等具有上述 α -1,4糖苷键的多糖类的食物。例如面包、年糕、甜甜圈、派、比萨饼、馒头等的坯料。作为原料,也不限于来自小麦的原料,可以使用大豆、小豆、大麦、玉米、稻(米)、马铃薯、甘薯、葛、蕨、绿豆、蚕豆、莲藕、木薯、西米棕榈、猪牙花等。

[0134] 根据本发明的 β 淀粉酶由于具有耐热性和对生淀粉的活性,因此可优选用于食物的改性操作。另外, No. 58株由于仅具有 β 淀粉酶作为菌体外酶,因此不会发生面包坯料使用 α 淀粉酶或葡糖淀粉酶时发生的过量淀粉分解或美拉德反应。因此, No. 58株作为其中使用的纯化 β 淀粉酶的供给源极为有用。另外,生成物仅为麦芽糖的情况下,具有能够使做出来的食物具有醇厚的味道的优点。通过该酶具有的耐热性,还具有易于控制底物反应的优点。由于来自植物的 β 淀粉酶大多最适pH在酸性侧,因此为了酶处理而大多需要pH调节剂,与之不同地,本酶的最适pH在中性的7附近,因此也可以不需要pH调节剂。由于酶对生淀粉的活性可作用于未糊化的淀粉质,也可用于大范围的淀粉制品和含有淀粉的底物。

[0135] 另外,尽管本酶具有优异的耐热性,但在80°C以上的高温下并不具有酶活性,在80°C以上的高温下则酶活性丧失。通过该性质,本酶在面包坯料等中混入本酶并进行焙烧时,在焙烧的过程中可以使酶活性丧失。这可以容易地进行如下制备:仅在从焙烧开始到中途等的、希望使酶反应的时间内使酶与底物反应,最终使酶活性丧失。

[0136] 本发明还提供了含有本发明的 β 淀粉酶或本发明的微生物的酶制剂的形式。酶制剂中的本酶可以是纯化酶,也可以是培养上清那样的粗酶的阶段。酶剂可以仅由 β 淀粉酶单体构成,也可以在不大幅损害其酶性质的范围内适当配合添加物。作为酶制剂的形式,可以举出片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊、液剂等。酶制剂可封装在喷雾器(如喷雾器)中,并且除

了淀粉酶之外还可包含其他酶。

[0137] 作为与本酶同时含有的酶,例如可以举出脱支酶、异淀粉酶、支链淀粉酶、葡糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、磷酸酶、木聚糖酶等,并且可以组合这些酶中的一种以上而使用。

[0138] 作为添加物,例如可以举出:粘合剂(阿拉伯树胶、明胶、山梨醇、黄耆胶、聚乙烯吡咯烷酮等)、填充剂(乳糖、砂糖、磷酸钙、山梨醇、甘氨酸等)、崩解剂(结晶纤维素等)、非水性赋形剂(杏仁油、分馏椰子油或者如甘油、丙二醇、聚乙二醇、乙醇这样的油性酯等)、防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、山梨酸、生育酚等)、pH调节剂(碳酸氢钠、碳酸钾、柠檬酸盐、乙酸盐等)、增稠剂(甲基纤维素等)、抗氧化剂(维生素C、维生素E等)、香料(合成香料、天然香料、酯类等)、乳化剂(卵磷脂、山梨糖酐单油酸酯、蔗糖脂肪酸酯等)、膨胀剂(碳酸铵等)、悬浮剂(糖浆、明胶、氢化食用脂等)等。

[0139] 本酶剂可以广泛用于将淀粉等具有 α -1,4糖苷键的多糖类以麦芽糖单位分解而生产麦芽糖的用途、食品的改性的用途等。例如可以举出在面包、年糕、甜甜圈、派、比萨饼、馒头等坯料中添加酶剂。另外,可以将其添加到具有淀粉的小麦、大豆、小豆、大麦、玉米、稻(米)、马铃薯、甘薯、葛、蕨、绿豆、蚕豆、莲藕、木薯、西米棕榈、猪牙花等谷物本身或其破碎物中。在添加酶剂之前,可以进行破碎或加热、药剂处理等前处理。添加酶剂后的处理条件可以由本领域技术人员适当确定。

[0140] 以下,通过实施例详细地说明本发明,但本发明并不限于这些实施例。

[0141] 实验1:具有耐热性 β 淀粉酶的细菌的筛选和鉴定

[0142] 从土壤试样中进行生产 β 淀粉酶的耐热性菌的分离和纯化。筛选源的土壤从大阪府内的土壤得到。从该土壤中分离淀粉同化性菌株。分离的株在淀粉酶生产菌用培养基(表1)中培养。

[0143] [表1]

淀粉酶生产菌用培养基组成		
	玉米淀粉	1.0 %
[0144]	蛋白胨	0.2 %
	酵母提取物	0.2 %
	氯化钙	0.2 %

[0145] 基本pH为7.0,根据实验改变培养基组成和pH。用于筛选时,调整为pH7.0后,在上述组成中加入1.0%结冷胶,在板上固化后使用。

[0146] 将分离的淀粉同化性菌株取1白金环,接种到装有6ml淀粉酶生产菌用液体培养基的试管中,在60°C下振荡培养3天。培养结束后,通过将培养液离心分离(3200rpm,10分钟,4°C)来回收培养上清,并将其作为粗酶样品。向100 μ l此粗酶样品中加入100 μ l底物溶液(1.5%可溶性淀粉(Merck社制),100mM pH7.0 Tris-HCl,5mM CaCl₂),并在37°C下反应过夜。将5 μ l反应后的反应溶液进行薄层色谱。

[0147] 薄层色谱(TLC)

[0148] 用于薄层色谱的硅胶板使用Silica gel 60F254(Merck社制)。

[0149] 展开溶剂使用1-丁醇/乙醇/氯仿/25%(w/w)氨溶液:(4/5/2/8,v/v/v/v)。

[0150] 麦芽糖的检测是通过对展开后的硅胶板喷吹检出液(含有1%香草醛的浓硫酸)3次,在120°C下加热数分钟使其发色来进行检测的。

[0151] TLC的结果如图1所示。筛选结果获得了几种麦芽糖生产株。通过这些菌株的详查证实,1株从可溶性淀粉仅生产麦芽糖(图1:框内的No.58.c为对照)。由此获得麦芽糖生成能力高的No.58株。

[0152] 淀粉酶活性测定(还原糖定量法)

[0153] 将100 μ l酶样品(培养上清或后述的粗纯化或纯化的酶)放入试管中,在37°C下预孵育10分钟。加入100 μ l底物溶液(1.5%可溶性淀粉,100mM Tris-HCl,5mM CaCl₂,pH7.0,37°C),并在37°C下反应10分钟。酶反应的停止是通过添加400 μ l的DNS溶液(0.5%二硝基水杨酸、0.4N NaOH,30%酒石酸钾钠四水合物)来进行的。接着,将混合溶液在100°C煮沸5分钟后,用冷水冷却5分钟,添加蒸馏水1.8ml并搅拌。对于搅拌溶液,用分光光度计测定480nm的吸收。将用蒸馏水代替酶样品反应的产物作为空白,从对酶样品的测定值中减去对空白的测定值。酶活性的1单位(U)定义为1分钟生成1 μ mol麦芽糖的酶量。以下实验中的酶反应如无特别说明,则用该方法进行。

[0154] 蛋白质的浓度通过用分光光度计测定280nm的吸收来进行。

[0155] β 淀粉酶的确证

[0156] 对获得的No.58株具有的淀粉酶进行温度稳定性的评价。培养获得的No.58株,回收培养上清作为培养上清样品。将适当稀释的培养上清样品加入微型管中,在60°C保温后,在10、20、40、80分钟后取样,在冰上冷却。冷却后样品的残留酶活性通过定量还原糖的生成量来测定,评价获得的淀粉酶在60°C的温度稳定性。此外,作为对照,使用来自*Brevibacillus* sp.TMK-672株(TBA株)的 β 淀粉酶同样处理得到的样品。其结果如图2所示。数据以处理时间0分钟的值100%的相对值表示。图2的No.58表示本发明的菌株,TBA表示比较对象。进而,得到的淀粉酶是否为 β 淀粉酶的确证,是通过求出还原糖生成量和相对KI/I₂值的关系来进行的。

[0157] 相对KI/I₂值如下求出。

[0158] 将200 μ l的酶溶液置于试管中,在37°C下预孵育10分钟,添加400 μ l同样预孵育的底物溶液后,在37°C下反应10分钟,通过添加1ml的反应停止液(0.5N乙酸和0.5N HCl以5:1混合而成的混合液)来停止反应。将反应停止后的反应液200 μ l放入另一试管,添加5ml的碘溶液(0.005% I₂,0.05% KI),20分钟后用分光光度计测定660nm的吸收。将还原糖量为0时的相对KI/I₂值作为100%。适当改变测定的样品的浓度,将该值相对于通过前述还原糖定量法得到的值作图。作为 α 淀粉酶的阳性对照,使用来自人唾液的 α 淀粉酶,作为 β 淀粉酶的阳性对照,使用来自TMK-672株的 β 淀粉酶进行比较,判定来自得到的株的淀粉酶是否为 β 淀粉酶。其结果如图3所示。图3的HSA表示来自人唾液的 α 淀粉酶。

[0159] 从图2的结果可以看出,来自No.58株的酶在调查的时间内完全没有活性降低,是温度稳定性非常高的酶。图3的结果表明,来自No.58株的酶与来自TMK-672株的 β 淀粉酶的图线一致,因此本酶是从淀粉链的非还原末端侧以麦芽糖单位切割淀粉链的 β 淀粉酶。

[0160] 染色体DNA的制备

[0161] 将No.58株接种到100ml的2 \times TY液体培养基(表2)中,在37°C下培养2天,通过离心分离(6,000rpm,10分钟,4°C)回收菌体。然后,将其悬浮于9ml的Solution I(50mM葡萄糖,

25mM Tris-HCl, EDTA, pH8.0) 中, 然后添加数mg溶菌酶并在37°C下孵育2小时以上。

[0162] [表2]

2×TY 培养基组成

[0163]	蛋白胨	1.6	%
	酵母提取物	1.0	%
	氯化钙	0.5	%

[0164] pH调至7.0。

[0165] 根据实验, 培养基中加入100μg/ml的组成的氨苄青霉素。

[0166] 然后, 向含有培养菌体的Solution I溶液中加入10% SDS溶液, 使终浓度为0.5%, 振荡10分钟。进而, 向该混合溶液中加入5M NaCl溶液, 使NaCl的终浓度达到0.7M以上, 振荡10分钟。然后, 进行酚/氯仿提取, 将得到的酚/氯仿添加溶液进行离心分离(13,500rpm, 10分钟, 4°C), 分离为水层和油层, 回收水层。在该得到的回收物中加入12ml冰冷的2-丙醇, 颠倒混合后, 用巴斯德吸管吸取DNA沉淀并回收。将DNA用30ml的70%乙醇洗涤两次, 转移到新管中, 在减压下干燥, 然后悬浮于500μl的TE缓冲液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)中。向悬浮液中加入5μl的RNase A溶液(10mg/ml), 在37°C下孵育30分钟后, 再次进行酚/氯仿提取。向其中加入50μl的3M醋酸钠和500μl的冰冷的2-丙醇, 在冰上放置10分钟。用巴斯德吸管吸取DNA沉淀并回收, 用1ml的70%乙醇洗涤两次, 然后转移到空管中, 在减压下干燥并溶解于300μl的TE缓冲液中。

[0167] 16S rRNA的获得和分析

[0168] 通过PCR扩增16S rRNA基因。模板使用提取的染色体DNA, 引物使用基于在细菌16S rRNA基因中高度保守的区域设计的正向引物(5'-AGRRTTTGATYHTGGYTCAG3', 序列编号3)和反向引物(5'-TGACGGCGGTGTGTACAAG-3', 序列编号4)。16S rRNA区域的PCR扩增使用PrimeSTAR HS DNA polymerase(Takara Bio社制)进行, 温度循环以98°C10秒、55°C5秒、72°C90秒的循环进行30个循环。将得到的PCR产物插入用EcoR V消化的pBluescript II SK(+)(Stratagene社制)中, 在大肠杆菌中转化后, 提取质粒。测序分析委托EurofinsGenomics社。碱基序列的分析使用GENETYX-WIN Ver.7(GENETYX), 碱基序列的同一性的检索使用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLAST检索。

[0169] 通过这些分析, 将本发明的No.58株鉴定为Bacillus halosaccharovorans No.58株(No.58株)。将该菌株于2019年4月12日保藏于独立行政法人产品评价技术基础机构专利微生物保藏中心(日本千叶县木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)。保藏编号为NITE BP-02937。

[0170] 实验2β淀粉酶的纯化

[0171] No.58株的大量培养和粗酶液的获得

[0172] 在8个装入了将淀粉酶生产菌用培养基的组成变更为1.5%糊精、0.3%蛋白胨、0.3%酵母提取物、0.3%CaCl₂的培养基650ml的2.0L三角烧瓶中, 分别接种在45°C下振荡培养48小时的No.58株溶液6.5ml, 在45°C下振荡培养48小时。离心(9,000rpm, 60分钟, 4°C)No.58株的培养液, 回收培养上清, 作为粗酶液。

[0173] 蛋白质的浓度通过用分光光度计测定280nm的吸收来进行。

[0174] 通过TOYOPEARL Butyl-650M柱的纯化

[0175] 对得到的培养上清5.0L,边搅拌边一点一点添加并溶解硫酸铵570g使其达到20%饱和。溶解后,通过离心(10,800rpm,60分钟,4°C)回收上清。将回收的上清注入用含有20%饱和硫酸铵的20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)平衡的TOYOPEARL Butyl-650M 100ml中,用该缓冲液2.0L洗涤。用含有20-0%饱和硫酸铵的20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)的反向线性梯度(1.0L)进行吸附物质的洗脱,并以每10ml分部分离。测定各部分的活性,回收显示β淀粉酶活性的部分,添加并溶解硫酸铵至80%饱和浓度,在4°C下过夜使沉淀形成。将其离心分离(10,800rpm,30分钟,4°C),并回收沉淀物。将回收的沉淀物溶解于少量的20mM Tris HCl缓冲液(pH7.0)中,并使用透析膜相对于大量过量20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)进行透析。

[0176] 通过TOYOPEARL DEAE-650M柱的纯化

[0177] 将得到的透析样品注入用20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)平衡的TOYOPEARL DEAE-650M(100ml)中,用500ml该缓冲液洗涤,然后用含有0-300mM NaCl的20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)的线性梯度(1.0L)进行吸附剂的洗脱,并以每10ml分部分离。测定各部分的活性,回收显示β淀粉酶活性的部分,硫酸铵沉淀后,相对于大量过量的20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)进行透析。

[0178] SDS-PAGE

[0179] SDS-PAGE按照Laemmli的方法(Laemmli U.K.,Nature,227,680-685,1970)进行。

[0180] 制备由分离凝胶12.5%、浓缩凝胶5.0%构成的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:N,N'-亚甲基双丙烯酰胺=29.2:0.8)。向试样样品中添加6×样品缓冲液(0.375M Tris-HCl,60%甘油,6%2-巯基乙醇,0.003%溴酚蓝,pH6.8),在100°C下处理10分钟。使用垂直板式电泳装置(ATTO社制),在聚丙烯酰胺凝胶中添加加入6×样品缓冲液并加热后的试样样品,在泳动用缓冲液(0.1%SDS,25mM Tris,192mM甘氨酸)中,在20mA的恒定电流下进行电泳。电泳后,在CBB溶液(0.2%考马斯亮蓝R-250,50%乙醇,10%乙酸)中进行染色,并用脱色液(10%甲醇,7.5%乙酸)脱色。蛋白质的分子量标记使用Protein Molecular Weight Marker(Broad)(Takara Bio社制)。

[0181] 这一系列的纯化实验的结果示于表3。

[0182] [表3]

	总活性(U)	总蛋白 (A ₂₈₀)	比活性 (units/A ₂₈₀)	活性 (units/ml)	收率(%)	倍率
[0183] 粗酶液	308000	79200	3.89	62.3	100	·
Butyl-Toyoperal	239000	217	1100	796	77.6	283
DEAE-Toyoppearl	221000	51.4	4300	2510	71.8	1110

[0184] 将由一系列纯化实验得到的纯化酶进行SDS-PAGE的结果如图4所示。图4显示通过纯化得到显示分子量59.4kDa的单带,该酶可以作为单酶纯化。以后,使用得到的纯化酶。

[0185] β淀粉酶序列分析

[0186] N末端氨基酸序列分析

[0187] 在使用纯化样品进行SDS-PAGE后,将凝胶在印迹液C(0.02%SDS,25mM Tris,20%甲醇,25mM硼酸)中轻轻振荡5分钟。准备6张切成凝胶尺寸的滤纸,分别在印迹液A(0.02%SDS,300mM Tris,20%甲醇)、印迹液B(0.02%SDS,25mM Tris,20%甲醇)、印迹液C中各浸

渍2张,振荡15分钟。另外,将PVDF膜(MILLIPORE社制)切成凝胶尺寸,在甲醇中振荡10分钟后,在印迹液C中浸渍15分钟。接着,从半干式印迹装置(Bio-Rad社制)的负极侧依次重叠2张滤纸(印迹液C)、凝胶、PVDF膜、2张滤纸(印迹液B)、2张滤纸(印迹液A),以每1cm²凝胶2mA的恒定电流泳动50分钟,进行蛋白质向PVDF膜的转印。将转印后的PVDF膜用超纯水轻轻洗涤后,用丽春红(Ponceau S)染色液(0.1%Ponceau S,5%乙酸)染色5分钟后,用超纯水脱色。切下目标条带的部分,回收管内并使其干燥。序列分析委托给北海道大学全球设备中心分析委托服务。

[0188] N末端氨基酸序列的解析结果可知,其为H₂N-Glu-Ile-Lys-Thr-Asp-Tyr-Lys-Ala-Ser-Val-。

[0189] β淀粉酶基因的克隆

[0190] 通过PCR扩增β淀粉酶基因。模板使用通过实验1中记载的方法制备的No.58株染色体DNA,引物使用基于在细菌β淀粉酶中高度保守的区域设计的正向引物(5'-GTNTGGTGGGNTAYGTNGA-3';序列编号5)和反向引物(5'-GGRTTRTTCATYTGCCARTG-3';序列编号6)。PCR扩增使用PrimeSTAR HS DNA polymerase(Takara Bio社制)进行,温度循环以98°C10秒、55°C5秒、72°C50秒的循环进行30个循环。将得到的PCR产物连接到用限制酶EcoRV消化的pBluescript II SK(-)上,并转化到大肠杆菌中。接种到2ml的2×TY培养基(添加100μg/ml氨苄青霉素)中,在30°C下震荡培养24小时。从转化后的大肠杆菌中提取质粒,通过进行序列分析,确认质粒中含有β淀粉酶序列。以该获得的含有基因的质粒为模板,使用由确定的β淀粉酶基因序列设计的引物PS-F(5'-GGCAGCCCAGGTAATTTCTAC-3';序列编号7)和PS-R(5'-GGAGGGTTGACTTCACTCCA-3';序列编号8),合成DIG(洋地黄毒苷)标记探针。用10种限制酶(Sac I、BamH I、Xba I、Sal I、Sph I、Hind III、Bgl II、Spe I、Nhe I、Xho I)和在获得的基因中存在剪切位点的EcoR I、Kpn I分别组合并消化No.58株基因组DNA过夜,使用合成的探针进行Southern印迹分析。由此,由于预计在约6.3kb的Bgl II消化的基因片段中包括目标基因全长,收集与约6.3kb大小相当的Bgl II消化的基因片段,将其连接到用BamH I限制酶消化的pBluescript II SK(-)上,并转化到大肠杆菌中。通过使用在探针制备时使用的引物的PCR法进行筛选,获得含有目的基因的质粒。用各种限制酶消化获得的质粒,亚克隆到pBluescript II SK(-)后,进行序列分析。

[0191] 序列分析的结果如图5所示。可知得到的序列由2536bp构成(序列编号11),其中本基因由1,659bp构成的开放阅读框(ORF)(序列编号1)构成,存在由起始密码子的上游6bp的核糖体结合位点(RBS)、上游56bp附近的-10区域、上游82bp附近的-35区域构成的启动子区域。

[0192] 分析推定的氨基酸序列的结果,发现本基因合成为由552个氨基酸组成的前体蛋白(序列编号12,对应的碱基序列为序列编号1)。存在与所确定的N末端区域的氨基酸序列完全一致的序列,该序列中存在由29个氨基酸构成的信号序列(图中用下划线表示),成熟型蛋白由523个氨基酸构成,由氨基酸序列计算出的分子量为59,403(序列编号2,对应的碱基序列为序列编号13)。已发现成熟型蛋白由N末端区域的被分类为Glycoside hydrolase family 14(GH14)的催化结构域和C末端区域的被分类为Carbohydrate-binding module 20(CBM20)的底物结合结构域构成。

[0193] β淀粉酶的诸性质的研究

[0194] 最适pH和pH稳定性

[0195] 为了确定 β 淀粉酶的最适pH,在pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.2、8.5、9.0、9.5、10.0、10.75的50mM通用缓冲液(McIlvaine缓冲液)中,除pH以外,用与上述淀粉酶活性测定同样的方法,使纯化酶与底物反应,测定酶活性。另外,为了确认pH稳定性,将酶溶液加入pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.2、8.5、9.0、9.5、10.0、10.75的50mM通用缓冲液中,将各混合溶液在4°C静置16小时。将该混合溶液用100mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)稀释10倍使其pH回到7.0。用与上述淀粉酶活性测定同样的方法,使这些稀释混合溶液在37°C下反应10分钟,测定其残留活性。pH最适性的测定结果如图6所示,与pH稳定性相关的测定结果如图7所示。在图6、图7中,纵轴是以测定的最大活性值为100%的相对活性值。从图6可以看出,本酶在pH7.0附近显示出最大活性。从图7可以看出,本酶在pH5.0-9.0的范围内显示80%以上的残留活性。

[0196] 最适温度和温度稳定性

[0197] 为了确定 β 淀粉酶的最适温度,使酶溶液在37-70°C的各温度下,除温度以外,用与上述淀粉酶活性测定同样的方法,使酶溶液和底物反应10分钟,测定酶活性。另外,温度稳定性是将酶溶液(20mM Tris-HCl缓冲液,pH7.0)在37、45、50、55、60、65、70°C下处理30分钟后,冷却,用与上述淀粉酶活性测定同样的方法在37°C下反应10分钟,测定其残留活性。另外,针对60°C和65°C,采用处理时间的进程(15、30、45、60、75分钟),对于其残留活性,对大豆 β 淀粉酶、来自*Brevibacillus* sp.TMK-672株的 β 淀粉酶、来自*Bacillus cereus*的 β 淀粉酶、来自大麦的 β 淀粉酶也同样进行测定,将结果进行比较。最适温度的测定结果如图8所示,60°C时各 β 淀粉酶的残留活性如图9所示,65°C时各 β 淀粉酶的残留活性如图10所示。图8将以测定的最大活性值为100%的相对活性值相对于各温度表示。在图9、图10的处理时间的图表中,分别以处理时间0分钟的值设为100%的相对值表示。从图8可以看出,该酶的最适温度接近50°C。由图9可知,活性按来自大麦的 β 淀粉酶、来自芽孢杆菌的 β 淀粉酶、来自*Brevibacillus* sp.TMK-672株的 β 淀粉酶的顺序降低,用已知具有耐热性的来自大豆的 β 淀粉酶处理60-80分钟后显示80%左右的残留活性。另一方面,来自No.58株的 β 淀粉酶显示比来自大豆的 β 淀粉酶更优良的耐热性,本实验的热处理后也维持100%的残留活性。由图10可知,65°C下的热处理30分钟处理后的残留活性,来自大豆的酶为25%左右,来自No.58株的酶为40%左右。由该数值可知,本发明的 β 淀粉酶即使在65°C下也显示比来自大豆的 β 淀粉酶等优异的耐热性。

[0198] 生淀粉分解活性

[0199] 进行用于比较 β 淀粉酶对生淀粉的分解活性的实验。作为生淀粉,使用来自玉米的生淀粉和来自小麦的生淀粉。在20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.0)、5mM CaCl₂、酶0.1 μ g/ml的存在下使各生淀粉1.0mg/ml反应,通过将适量的反应液添加到装有0.4ml DNS溶液的试管中而使反应停止,通过实验1中记载的还原糖定量方法评价生淀粉分解活性。作为 β 淀粉酶,分别使用本发明的 β 淀粉酶、来自大麦的 β 淀粉酶、来自大豆的 β 淀粉酶。已知来自大麦的 β 淀粉酶具有生淀粉的分解活性,来自大豆的 β 淀粉酶虽然生淀粉的活性弱,但耐热性高。来自小麦的淀粉在60°C反应,来自玉米的淀粉在70°C反应。对来自小麦的淀粉的反应结果如图11所示,对来自玉米淀粉的反应结果如图12所示。由图11可知,相对于来自小麦的生淀粉,来自大麦的 β 淀粉酶和来自大豆的 β 淀粉酶几乎未见分解活性,而本发明的 β 淀粉酶在24小

时将生淀粉分解65%。图12的结果也同样,相对于玉米生淀粉,来自大麦的 β 淀粉酶和来自大豆的 β 淀粉酶几乎未见分解活性,而本发明的 β 淀粉酶在8小时内将生淀粉分解27%。从这些结果可以看出,该酶在生淀粉分解活性相对较高的来自大麦的酶不能反应高温条件下良好地分解了生淀粉。另外,温度稳定性高但生淀粉分解活性弱的来自大豆的酶,未见生淀粉的分解。由这些结果可知, No. 58株的 β 淀粉酶分解生淀粉的能力高,其活性方面耐热性也高。

[0200] 实验5

[0201] β 淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达

[0202] 在大肠杆菌内异种表达来自No. 58株的 β 淀粉酶基因。为了使 β 淀粉酶基因在大肠杆菌中表达,首先以含有 β 淀粉酶基因的质粒为模板,利用使用引物RBS-F (5' -CCGAGCTCCTCGAGGCGTTTGCTTAGGTTACGTA-3' :序列编号9)和exp-R (5' -CCCTGCAGGATCCTACCACTGTATTGTATAAC TTG-3' :序列编号10)的PCR,扩增含有 β 淀粉酶基因的编码区和核糖体结合部位的DNA片段。将扩增的DNA片段用Xho I和Pst I切割,插入用相同的限制酶切割的pBluescript SK(-),转化E. coli BL21 (DE3)。PCR的条件与实验3的方法相同。将得到的转化体接种到2ml的2×TY培养基(添加100 μ g/ml氨苄青霉素)中,在30℃振荡培养24小时。通过离心(10,000rpm,2分钟,4℃)回收菌体,悬浮于1ml的20mM Tris-HCl缓冲液pH7.0、5mM CaCl₂中,使用Handy sonic disruptor UD1 (Tomys精工社制)超声破碎30秒×4个循环。将破碎液离心(15,000rpm,10分钟,4℃)后的上清作为粗酶,测定淀粉酶活性,结果以可溶性淀粉为底物确认了还原糖的生成。使用TLC检测反应产物仅为麦芽糖。酶活性为每1ml培养液55.1U/ml。

[0203] 实验6在 β 淀粉酶基因中引入位点特异性突变

[0204] 对来自No. 58株的 β 淀粉酶基因引入位点特异性突变,制作突变酶,测定其酶活性。

[0205] 引入 β 淀粉酶基因的位点特异性突变通过PCR-mega primer法进行。首先,以含有 β 淀粉酶基因的编码区和核糖体结合部位的质粒为模板,用下述表4所示的4种突变引入引物(序列编号14-17)和exp-R引物(序列编号10),按照与“ β 淀粉酶基因的克隆”同样的方法进行PCR,得到mega primer。

[0206] 接着,以得到的mega primer和RBS-F引物(序列编号9)、含有上述 β 淀粉酶基因的编码区和核糖体结合部位的质粒为模板,用同样的方法进行PCR,从而得到引入突变的 β 淀粉酶基因全长。用与实验5同样的方法将该基因片段构建表达质粒,将其转化到E. coli BL21 (DE3)株中,得到生产 β 淀粉酶突变酶转化体。

[0207] [表4]

[0208] 突变引入用引物

[0209]

引物	序列(5' →3')	序列编号
T4P-F	AATGCCGAAATCAAGCCAGATTATAAAGCATC	序列编号14
T15K-F	GTTATGGCACCATTAAAAAAGATTACGAACTGG	序列编号15
T15R-F	GTTATGGCACCATTACGCAAGATTACGAACTGG	序列编号16
Q306D-F	ATAGATCAATTCAAGGASAGTAATTTACACCTT	序列编号17

[0210] 将得到的各转化体用与实验5同样的方法培养,通过破碎菌体得到粗酶。用与实验2相同的方法对该粗酶进行纯化。各突变酶的纯化结果示于图13。

[0211] 对于这些纯化酶,与“ β 淀粉酶的确认”同样地进行温度稳定性的评价。将各酶试样

放入微量管中,在65°C保温后,15、30、60分钟后取样,在冰上冷却。冷却后样品的残留酶活性通过测定还原糖生成量来测定,评估得到的淀粉酶在65°C的温度稳定性。此外,作为对照,也同样处理未变异的纯化酶,评价温度稳定性。其结果示于图14。数据以处理时间0分钟的值100%的相对值表示。图14的wt表示本发明的No.58株的 β 淀粉酶,T4P、T15K、T15R、Q306D分别表示变异酶(例如T4P时,表示序列编号2的第4位氨基酸残基T变异为P)。

[0212] 60分钟后的残留活性是突变前的 β 淀粉酶为37.7%,与之相对,T4P为80.9%,Q306DE为50.1%,T15K为44.4%,T15R为44.2%,可以看出,得到的突变酶与突变前的 β 淀粉酶相比,热稳定性提高。

[0213] 此外,得到的4种转化体具有的 β 淀粉酶突变酶分别具有序列编号2记载的氨基酸序列的氨基酸编号4位的苏氨酸变为脯氨酸的突变(序列编号18:图14的T4P)、氨基酸编号15位的苏氨酸变为赖氨酸的突变(序列19编号:图14的T15K)、氨基酸编号15位的苏氨酸变为精氨酸的突变(序列编号20:图14的T15R)、或者氨基酸编号306位的谷氨酰胺变为天冬氨酸的突变(序列编号21:图14的Q306D)。

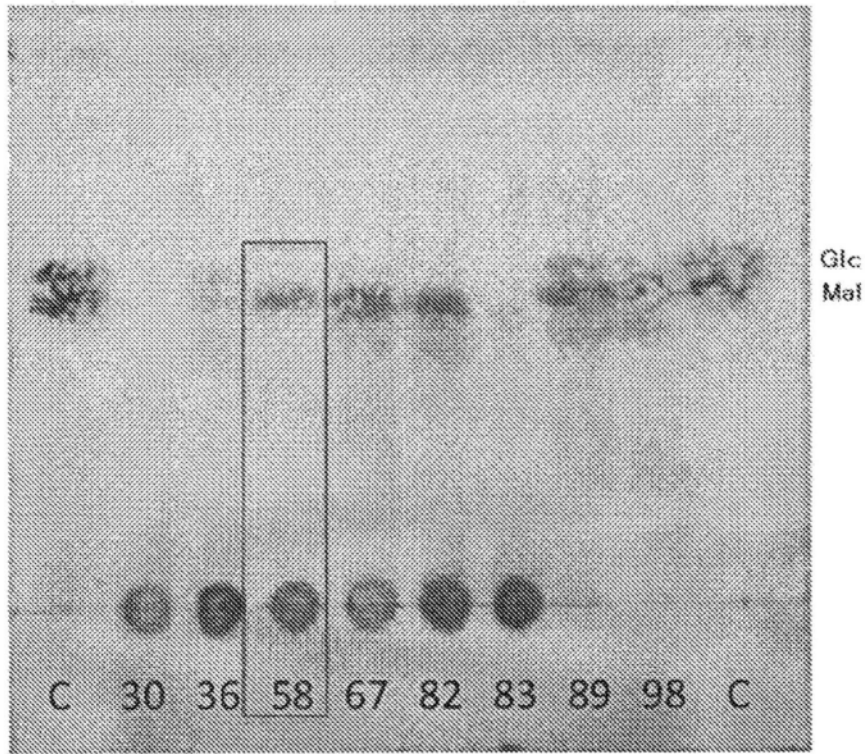


图1

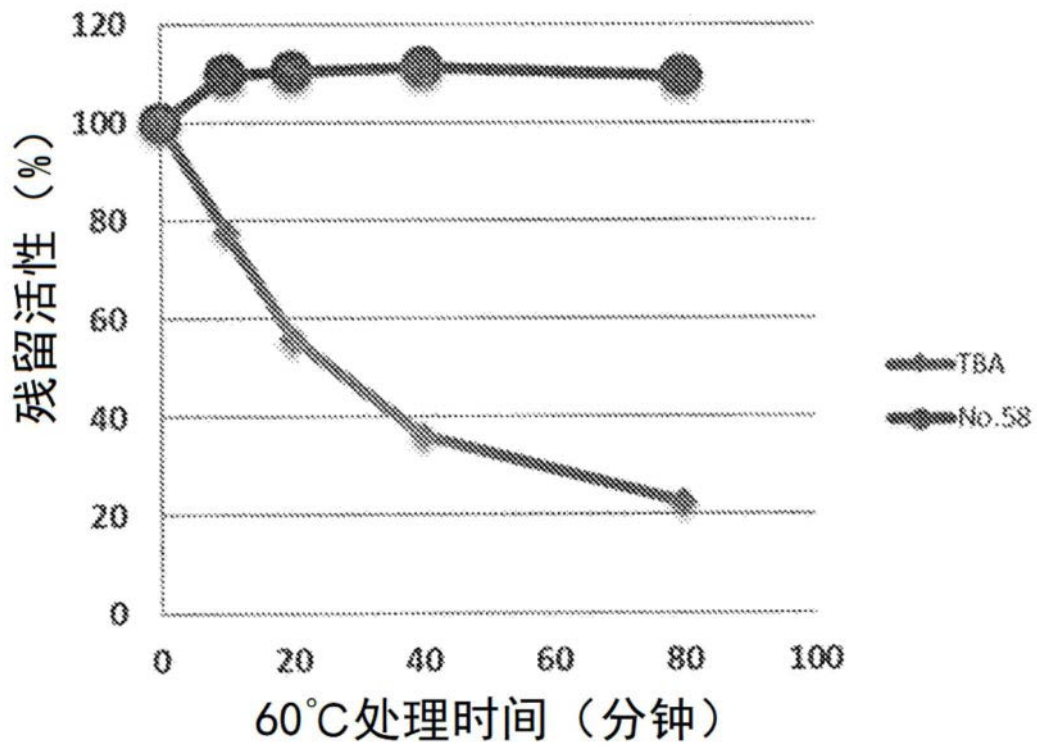


图2

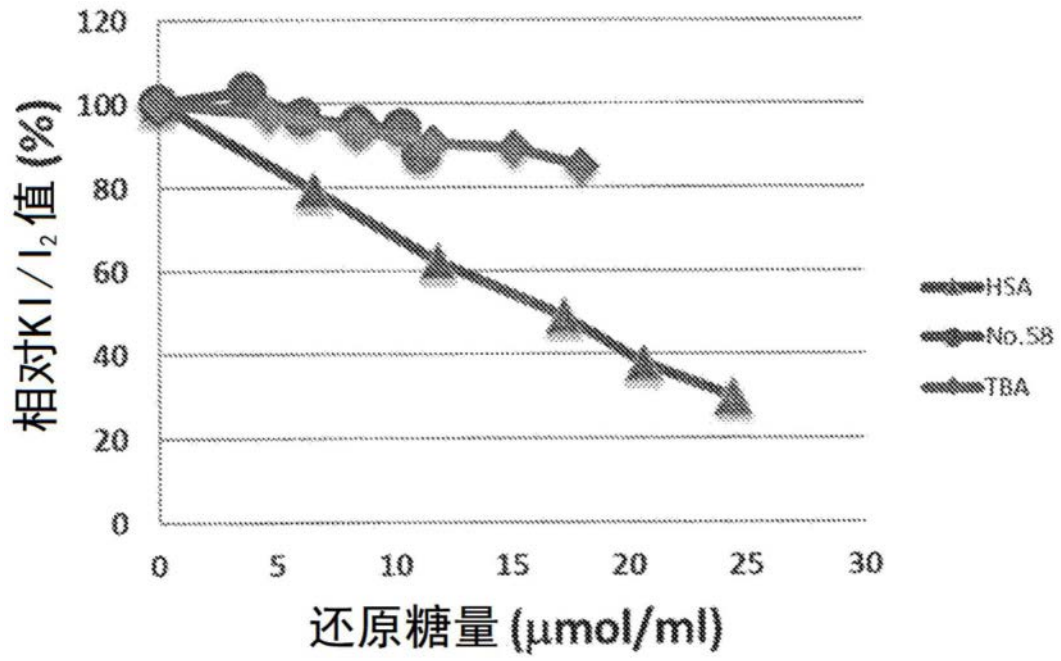


图3

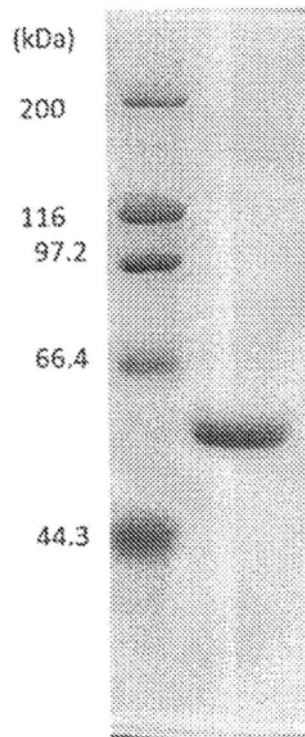


图4

```

1 ACAGAGGATTAAGTATGACAGAGCAATCTGGCTGAAACCAAAATGATTTGCTTAGATGATTTGTGAGTAGCTTACATGGTGGTAATCAACTCTTATTTGGGATTAATTAAGTGAATTA 120
241 AAAAGACTTAAAGGTTATCTTATTTCTTATFACACACTGATATTAAAGCGGCTATACGATTAGTGTATTCATTTGGTATCCTCGAAATGGAGACTAGTGGAGATACCAATTCAAAAG 240
281 ATACTTTTATCAATCAGAACTTTCAGAAAGTAAGGAGATGGAGGATTTCCATTTCTTGGGAGCATCCACTTATCTGTACGGTTAGAGCAAGATAAATATTCAGGATCCCAAAMTTTAT 360
361 TAAGCTAAGGGATATATACCTTGTATTTCTTCTTACAAATYACACGAACCTTTGCTACTGACCTTAAGTAATCTCCAAAGAACTCTGTAAATTTCTACGCTCAAAACCTTGTATTAA 480
481 AGGACTGAGGCTTTTATGCTTGAACCTGGCATAAGGAGCATTATCCGGACTACTTGGAAAATTCATCTCTTAGGTCCTGGTAAABAGTAAATYAGAAATGGAGCCCTTTCTCT 600
681 TGATGTATAAAGTGAATTTTCCTTCTAGATATGAGACTTACATAAATTTGCTCAGGCTTTGCTTAAAGTTCAGTAACTGATTTATATGGAGGGGGATTTTATGAACATTTGTT 720
-35 -10
885 IMVHLF
721 ATGCGTTTAGGDAATTAAGTATTAATGATCGCTGTACTTATGATTTACCTCTTTTTCAGACGGCMTAAATGCTGAAATCAAGACAGATTAABAGCATECTGTATGGACCAATTAACAAAT 840
MRRLGISEMIAVILNVELPLFDTAVNAEEXETDYKAXVMAPLTK
841 ATTAGGACTTGAATGACTTTGCAAAAGCAACTTGTACGCTAAAAGTAATGGTGTATTGCTTAAAGGACGATGTTTGGTGGGAGATGTCAGAAAATGGGATAATCAGTTTGGAT 960
ITNWNDFARQLALATIKSNGVYALTYTBYVWVGQDVEKNGDNQFD
961 TGGTCTTATTAATCTCAATTTCCACAAAGCAGTAAGAGATCTEGAAATTAATYGGTACCCATTTTATTTTACACATCAGTGGYGGAAATGAGAGATGATTTGATATCTCTGTACCA 1080
NSYYRQYFAQTYVRESDILKNVFXLSYTHQCQGNVQDDCNIPIVP
1081 AATTTGGTATGGGATTTAGATTTCCATTTGATCTCTTACACATAAGTCCGAACAGGTTATGTAGTAAAGAAAGGCTTCTTCAATGGGAGGELCAGGTAATTTCTACACAAATATGATGA 1200
NWFNBILDSIYTDILTHKSEYTYGYSKRTYVSPWAQAQVJSTQYHE
1201 CTCTATCAATCTTTTGCACAAATTTCTAGACTTAAAGGACATATYATTAABATATATYTTAGTGGYGGACAGGCGGTGAACYTAGATTTCTTCTATGTTTCAATGATAGCTGC 1320
LYQSDPFKDEIIEIKIYISGQPAQELRFPSYVSDSN
1321 TCATACCTTTCAGAGGAAACCTTCAATCTTACAGAGACCCGAACAGTACCTTCAAGGCAATYACAAAGCAAAATATAGCACCTTCTCAATTTAATTTCTGATGAAACCAAT 1440
SYPSRDKLQSYTDIAKNDFRSHMQAKYSYLSNLNSAWNTN
1441 CTAACTCTTGGAGTGAAGTCAACCTTCTTGTGATGAGACTTTTCTACTTCAAGTGTGCTATATATAGTCAATATGGTAAAGGACTTTATGACCTGGTATCAGAAATGATTAAT 1560
LTSNSSEYVNFPSRQDNFFYSGAAYYSQYQKDFHTWYQXVEI
1561 AAGCATTTAGGCTGTATAGTAGTAAAGCGCATGAAACTTGTATTAACCTTCCGGGTTCAATTTGGCAAGATTTCCAGGAAATTTATGGAAATGATGATCCTATGCTCCGCAC 1680
XHLERJSSRAHNEFDSTFGVPIGAKIAGIHNENNDPSPHF
1681 GCAGCTGAATATTCAGGAGTACTATCAATACACAACTAAATAGATCAATYACAGATAAGTAAATTTACACCTTACCTTACATGCTAGAAATGATGATGATGAGCTTATTAACAG 1800
AAEYSAAGYYQYTYTIXIBQFKISNLHLTYFTCLENDDSUAYYS
1801 CCTTATYATTCGACCTAAATCTCTTGTACACAAATTCAGAAATATAGCAACTTCAAGGGTATGCTTAAATGATGAGAAATGACTAGCTATCTTACTGTTAGATGCAATTAAGC 1920
PYYSAPKSLVYIQIXANXATISRGIVLNGENBLAISSEHANNYS
1921 GAACTCGATATCGAATATGCTGACACTTATTTAACGAAGGATTTAGCGGCTTACATTTATGAAATGAAACATTTGTAATGCTGATGGGACGAAABAGETGAACGGATCT 2040
ETRYRNQYAQLFLFRGFSQFTLLLRNENIXVNAOQYKTAETDR
2041 TTTAGAGATATTTTATGCTTAAACCAATTAAGGATGAAATTTGTTCTGAAAATTTCTTACATATATGATGATTTCTGTTATTAACAGGTAACCGATGGAAATGGGATGTTGGGCT 2160
FRHXLVLYLTPIXKYEFYVKNRPTYYVYGDSSVYIYGNRWENENWA
2161 ACTCAGGATGGCAAAAGATTAACCTTACTTGGATGATCAATAGGATTTGGAGGATGCTGATATATTTCCAGCTACTCTTATGAGTAAAGCTGTAAATTAAGATTTCAAT 2280
SQDQKKKXKILTWDQYKRDWRGTYIAASRYVEFKRYIEBSSN
2281 GGAAACACAAAGCATGGGAACTTAAATGACAAAGCTTTGGACTACACCTTAGCAATGACACAAGTATACATGAGTGGYAGGACTTATATATAGTAAAGGATCAATCAATCAAAA 2400
GNTKARENPHSNVWYTPSNQDTSYTIQNM*
2401 AGAACTGAGTGGCAACAGACTATCTGAGTTCTTCTTAAATCAATTTGTAATTAAGATGCTTAATAAGTTTAACTACGATTTGGAJAGGCTTTTCTTGTAAAGCAATCGGGCAG 2520
2521 ATCTGGAACAAGGAGA 3536

```

图5

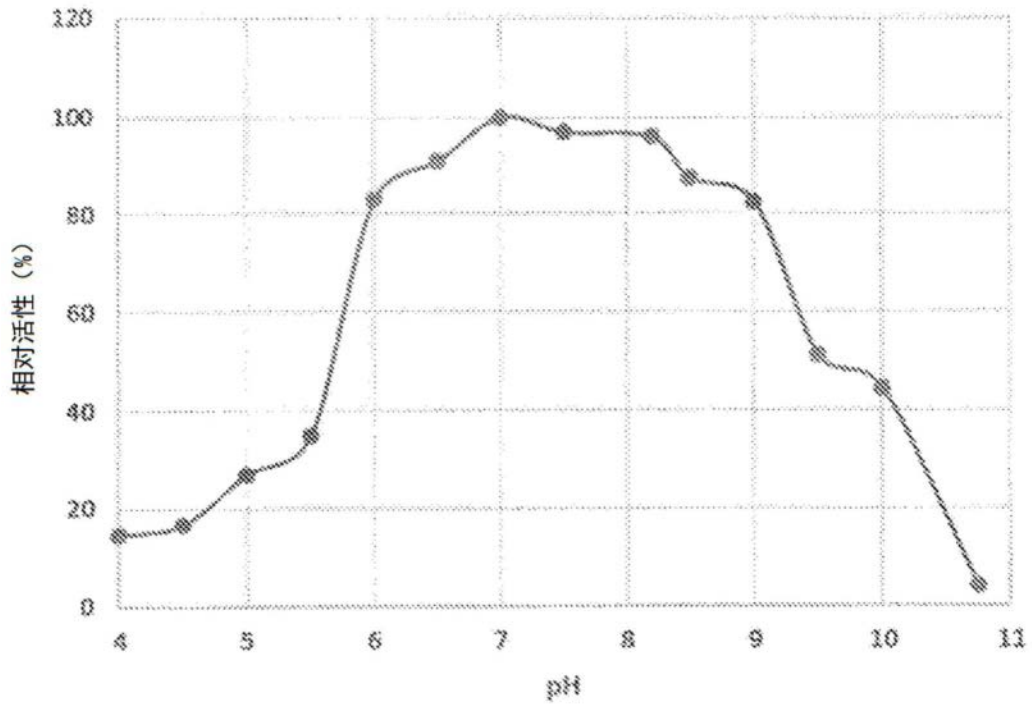


图6

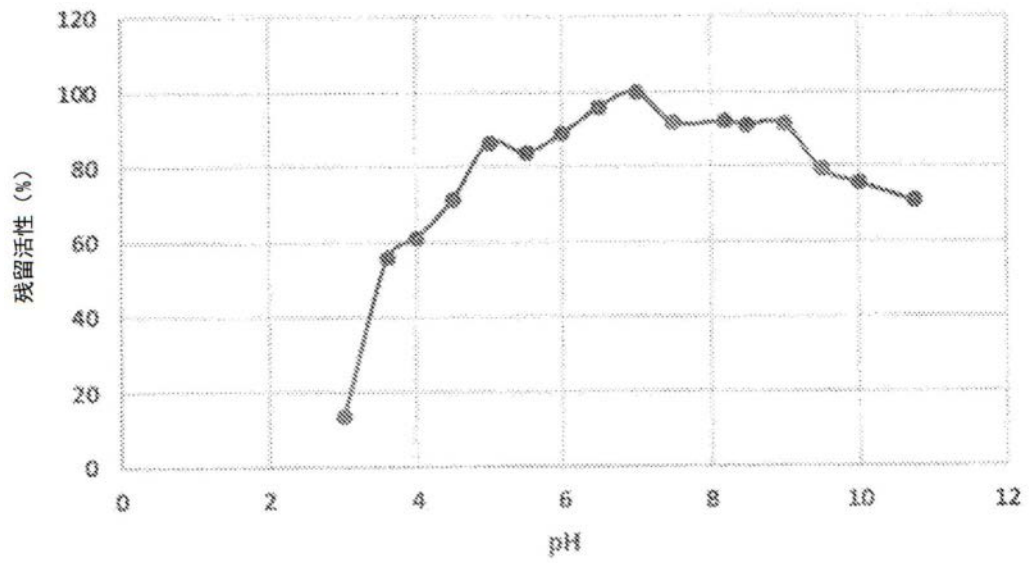


图7

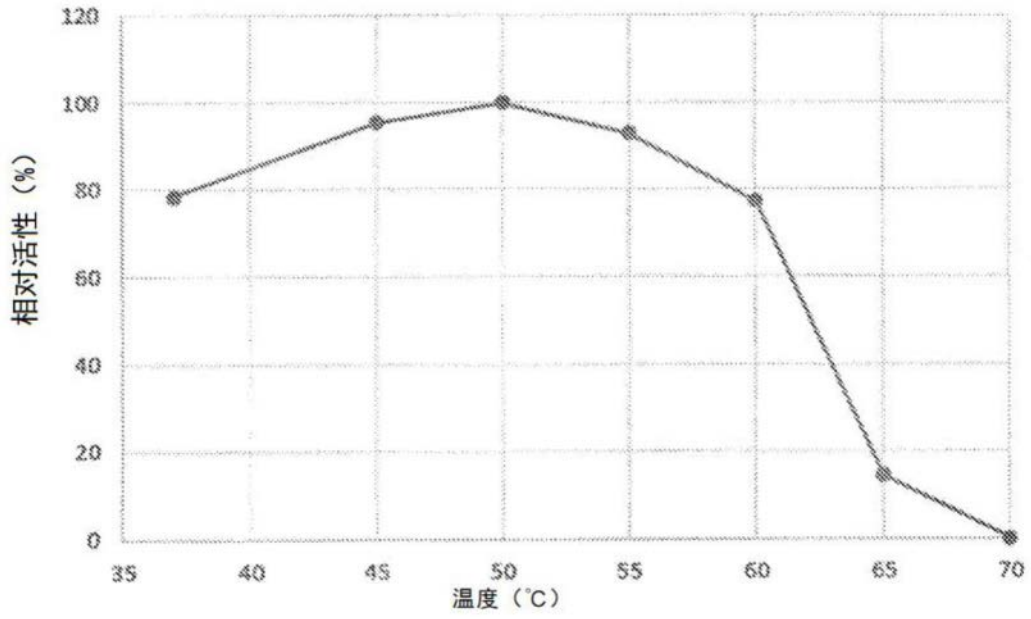


图8

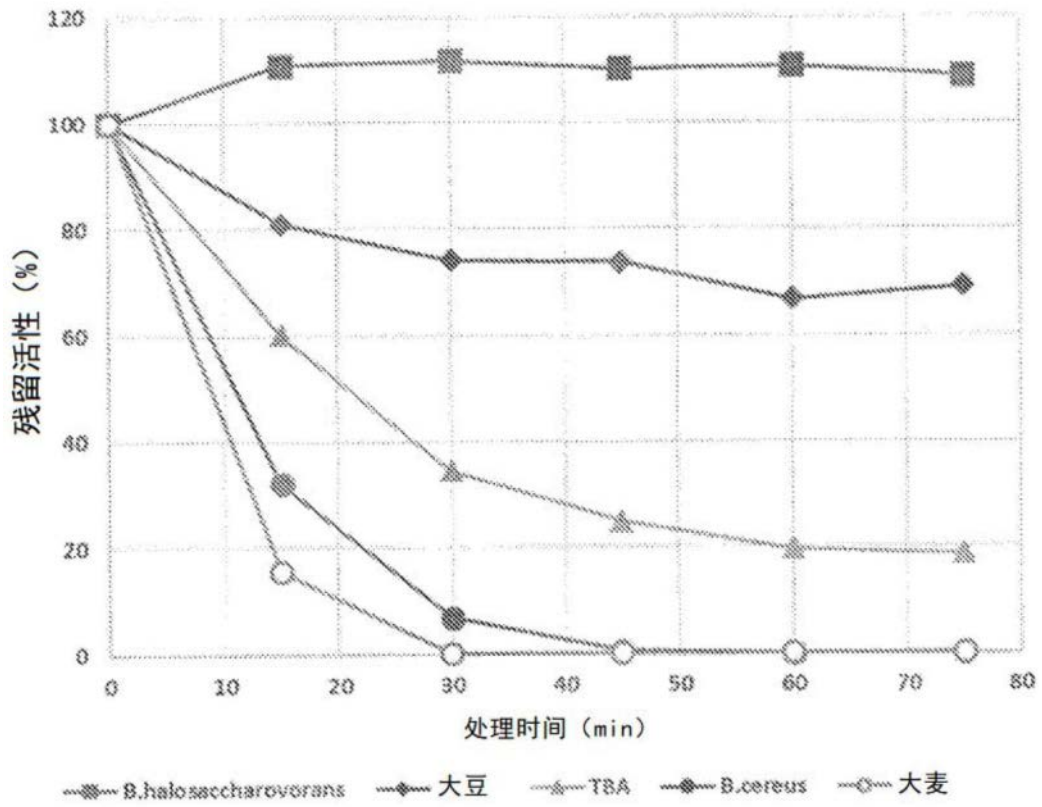


图9

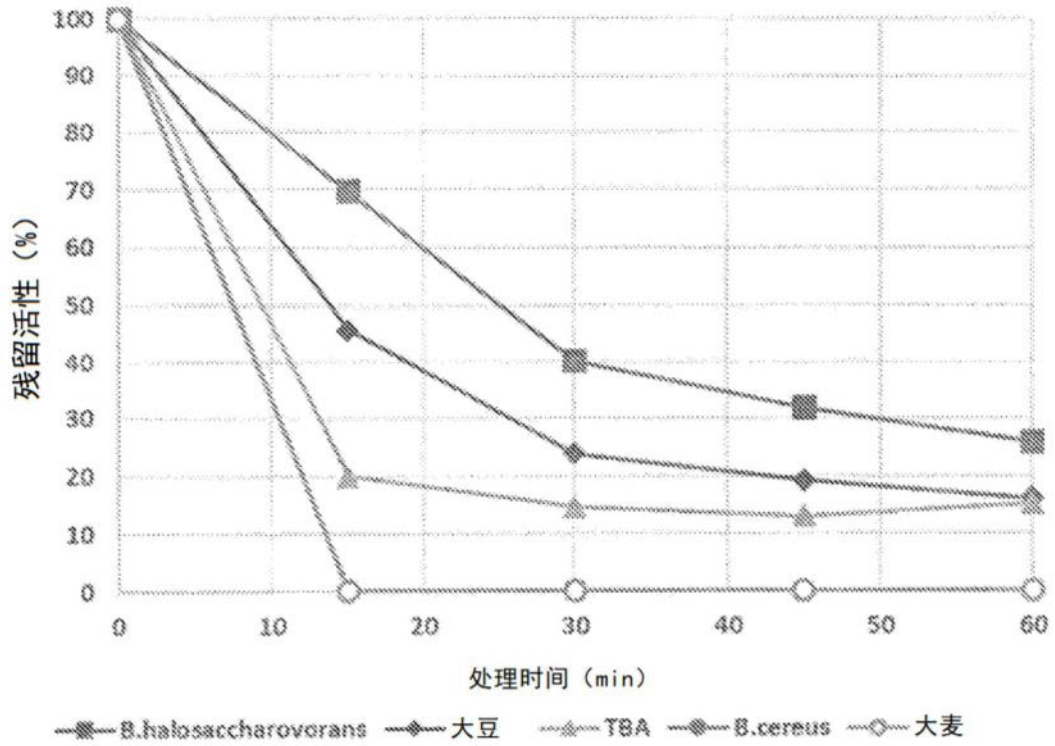


图10

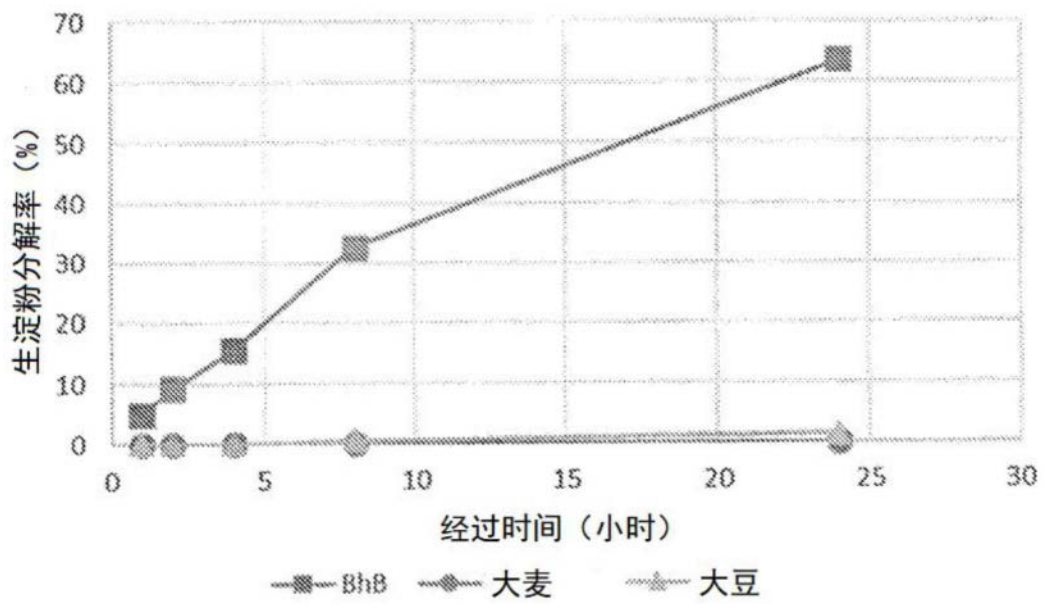


图11

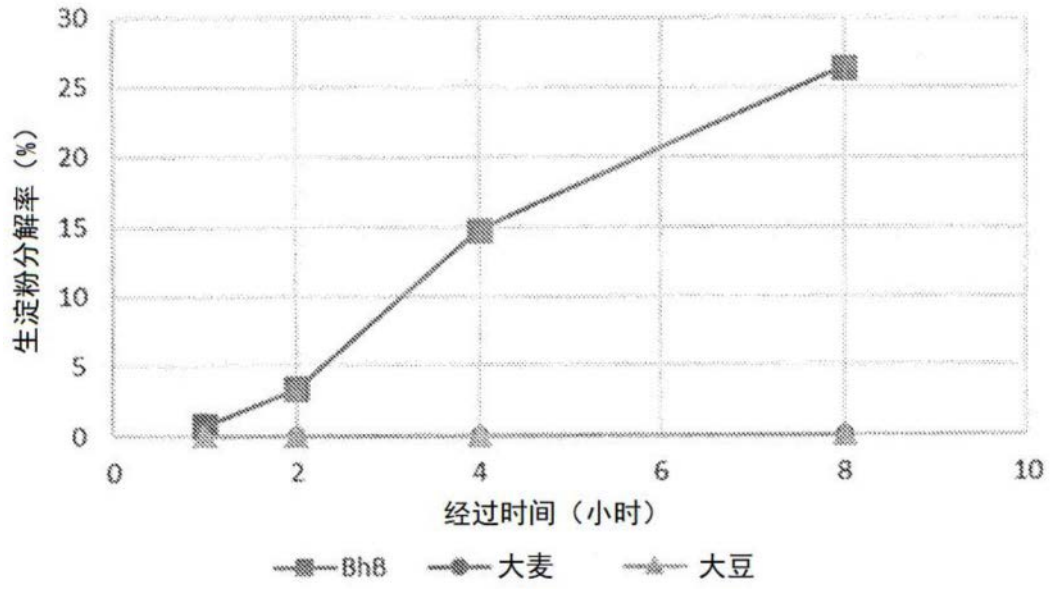


图12

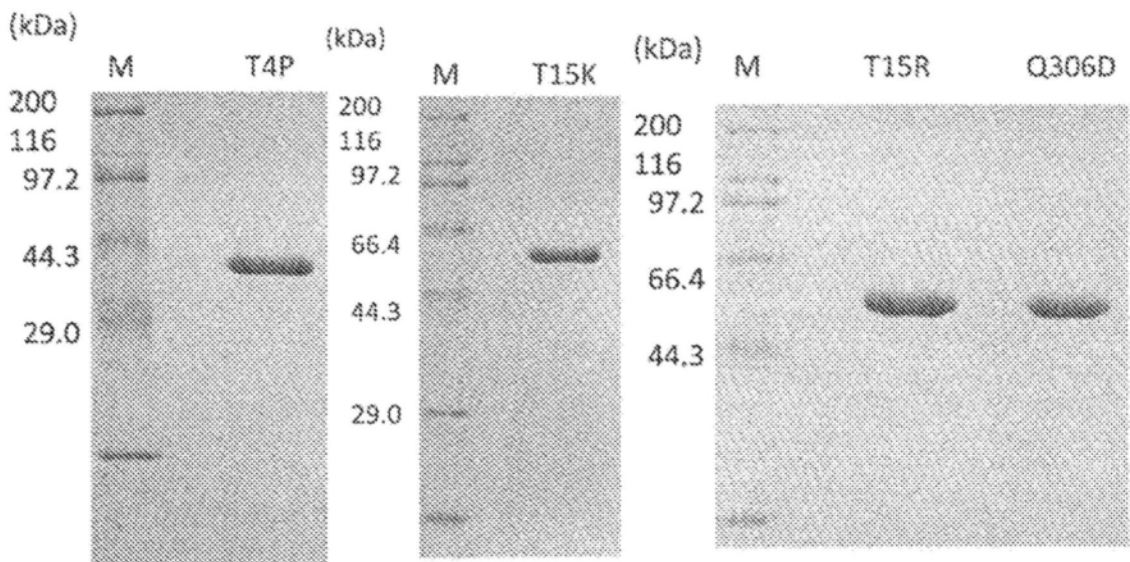


图13

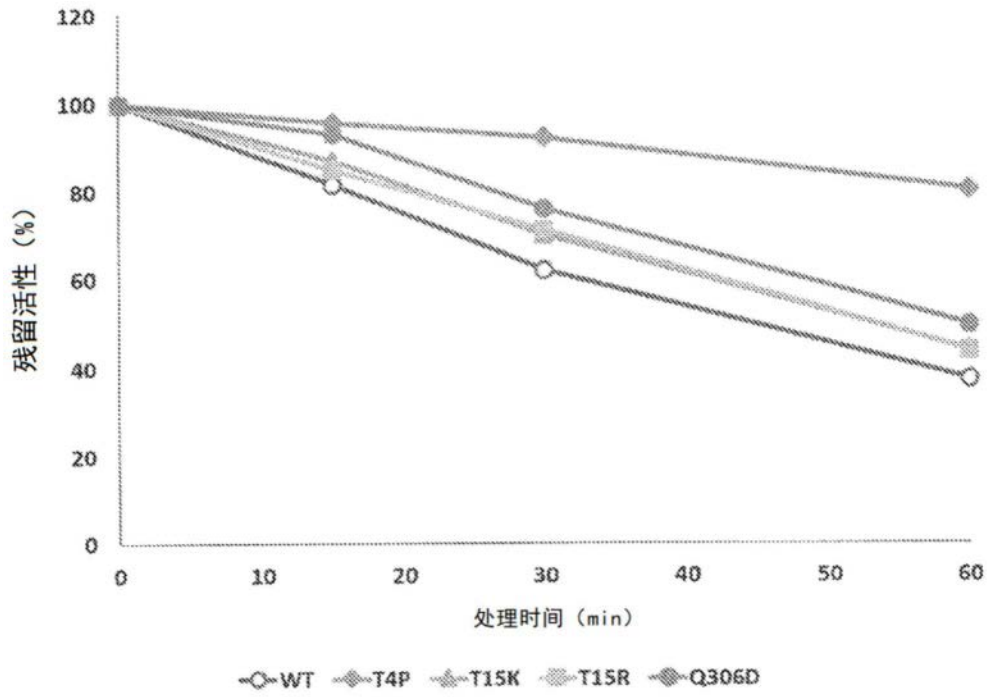


图14