

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02801432.4

[51] Int. Cl.

C12P 19/12 (2006.01)

A23G 3/00 (2006.01)

A23G 4/00 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23L 1/236 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100415894C

[22] 申请日 2002.4.25 [21] 申请号 02801432.4

[30] 优先权

[32] 2001.4.27 [33] JP [31] 130922/01

[86] 国际申请 PCT/JP2002/004166 2002.4.25

[87] 国际公布 WO2002/088374 日 2002.11.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.27

[73] 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 久保田伦夫 西本友之 东山隆信
渡边光 福田惠温 三宪俊雄

[56] 参考文献

CN1271539A 2000.11.1

JP1-98601A 1989.4.17

US4521252A 1985.6.4

CN1173871A 1998.2.18

审查员 汪建斌

[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 陈昕

权利要求书 2 页 说明书 62 页 附图 22 页

[54] 发明名称

异麦芽糖的制备方法及用途

[57] 摘要

本发明以提供异麦芽糖的新型制备方法及其用途为课题，在或无 α -异麦芽糖基转移酶的存在下，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与作为非还原末端的键合方式具有 $\alpha-1,4$ -葡糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类作用，生成作为非还原性末端的键合方式具有 $\alpha-1,6$ -葡糖苷键，作为该非还原性末端以外的键合方式有 $\alpha-1,4$ -葡糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的 α -异麦芽糖基葡萄糖、和 / 或环 { $1\rightarrow6$ } - α -D-吡喃葡萄糖基 - ($1\rightarrow3$) - α -D-吡喃葡萄糖基 - ($1\rightarrow6$) - α -D-吡喃葡萄糖基 - ($1\rightarrow3$) - α -D-吡喃葡萄糖基 - ($1\rightarrow1$)、使异麦芽糖游离酶与该生成物作用生成异麦芽糖、收集该生成的异麦芽糖，通过确立以此为特征的异麦芽糖的制备方法及其用途，从而解决了该课题。

1. 异麦芽糖的制备方法，其特征在于包括以下工序：使用作为非还原末端的键合方式具有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类作为底物，与 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用，生成作为非还原性末端的键合方式有 α -1, 6 糖苷键、作为该非还原性末端以外的键合方式有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的 α -异麦芽糖基葡萄糖的工序，其中，上述 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶具有由作为非还原末端的键合方式具有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖生成作为非还原性末端的键合方式有 α -1, 6 糖苷键、作为该非还原性末端以外的键合方式具有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的 α -异麦芽糖基葡萄糖的作用；使异麦芽糖葡聚糖酶与所得的 α -异麦芽糖基葡萄糖作用生成异麦芽糖的工序；收集该生成的异麦芽糖的工序。

2. 权利要求 1 所述的异麦芽糖的制备方法，其特征在于 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶是有下述物理化学性质的酶：

(1) 作用

通过由作为非还原性末端的键合方式具有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类，进行还原力实质上没有增加的 α -葡萄糖基转移，生成作为非还原性末端的键合方式具有 α -1, 6 糖苷键、作为该非还原末端以外的键合方式具有 α -1, 4 糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的糖，

(2) 分子量

采用 SDS-凝胶电泳法，约 117,000-160,000 道尔顿；

(3) 等电点

采用含有两性电解质电泳法，pI 约 4.7-5.7

(4) 最佳温度

在 pH 6.0、60 分钟反应下，约 40-45℃

在 1mM Ca²⁺ 存在下，约 45-50℃

(5) 最佳 pH

在 35℃、60 分钟反应下，pH 约 6.0-6.5

(6) 温度稳定性

在 pH6.0, 保持 60 分钟下, 约在 35 至 40℃稳定

在 1mM Ca²⁺ 存在下, 约在 40 至 45℃稳定

(7) pH 稳定性

在 4℃, 保持 24 小时下, pH 约 4.5-10.0。

3. 权利要求 1 或 2 所述的异麦芽糖的制备方法, 其特征在于使 α-异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用时, 合用环麦芽糊精葡萄糖转移酶和/或淀粉分支酶。

4. 权利要求 1 所述的异麦芽糖的制备方法, 其特征在于使异麦芽糖葡聚糖酶作用后, 使 α-糖苷酶和/或葡萄糖淀粉酶作用。

5. 权利要求 1 所述的异麦芽糖的制备方法, 其特征在于作为非还原末端的键合方式具有 α-1,4 糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类是从麦芽低聚糖、麦芽糊精、淀粉糊精、直链淀粉、支链淀粉、可溶性淀粉、液化淀粉、糊化淀粉及糖原中选出的 1 种或 2 种以上的糖。

6. 权利要求 1 所述的异麦芽糖的制备方法, 其特征在于在收集异麦芽糖的工序中, 采用使用碱金属型和/或碱土类金属型强酸性阳离子交换树脂的柱色谱法。

7. 权利要求 1 所述的异麦芽糖的制备方法, 其特征在于制得的异麦芽糖是单位固形物含有异麦芽糖 40w/w% 以上的异麦芽糖高含量物。

异麦芽糖的制备方法及用途

技术领域

本发明涉及一种异麦芽糖的新型制备方法及其用途，更详细地讲，涉及为了由作为非还原末端的键合方式的有 α -1, 4 葡糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类高收率地制得异麦芽糖的异麦芽糖的制备方法及其用途。

技术背景

异麦芽糖是发酵食品等中微量存在的难结晶性且具有良好保湿性的低甜味糖，过去，作为与葡萄糖，麦芽糖，6- α -葡萄糖基麦芽糖等的混合糖类，是在各种食品、化妆品、医药品等中广泛使用的有用的糖类。

异麦芽糖在自然界只不过是发酵食品等中微量存在的稀有糖类，众所周知，工业上采用使用酸催化剂的葡聚糖的部分水解反应，使用葡聚糖酶或异麦芽葡聚糖酶等的酶反应，使用来自葡萄糖的葡糖淀粉酶或酸催化剂的反向合成反应，使用来自麦芽糖或麦芽糊精的 α -葡萄糖苷酶的葡萄糖转移反应等的制备方法。然而，采用以往方法所得反应液中的异麦芽糖含有量每单位固形物只不过大约 10 至 25% (W/W) (以下，本说明书中，若没有特殊说明，将% (W/W) 简称为%) 左右，这作为异麦芽糖的工业制备方法纯度低，无论如何也不能满足要求。作为改进该问题的方法，例如，有特开昭 58-72598 号公报公开的柱色谱法。若采用该方法，可以从每单位固形物相当的异麦芽糖含量约 10 至约 25% 的原料糖液中，制得高纯度的异麦芽糖，然而，该异麦芽糖的制备方法中，也存在所得异麦芽糖的纯度和收率不得不依赖于原料糖液中的异麦芽糖含量的问题。

在这样的情况下，建立工业上可大量且价廉地制得高收率的异麦芽糖的新型制备方法是翘首以待的。

本发明，鉴于前述以往技术，把确立工业上可大量且价廉地高收率制得异麦芽糖的制备方法及其用途作为课题。

发明内容

本发明人等以解决前述课题为目的的深入研究中，在“欧洲生物化学杂志”(European Journal of Biochemistry)第226卷、641~648页(1994年)中，主要介绍了使水解酶交替糖酶(alternanase)与具有四个葡萄糖残基通过 α -1,3糖苷键与 α -1,6糖苷键交替地连接的结构的交替糖(alternan)作用，获得的具有分子内有异麦芽糖结构的环{ \rightarrow 6}- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow)结构的四糖类(以下，简称“环四糖”。)

另外，本发明人等在特愿2000-229557号说明书中，公开了使用由来自6- α -葡糖基麦芽糖等的淀粉的糖类生成环四糖、用 α -异麦芽糖基转移酶制备环四糖的方法，同时在特愿2000-234937号说明书中，公开了使前述异麦芽糖基转移酶和由麦芽低聚糖等生成 α -异麦芽糖基葡萄糖的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与淀粉原料作用高效地制备环四糖的方法。

其后，本发明人等着眼于前述 α -异麦芽糖基葡萄糖及环四糖的分子内具有异麦芽糖结构，对由这些的糖类制备异麦芽糖的方法进行了研究。即，本发明人等对这些 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶和 α -异麦芽糖基转移酶的酶反应机理进行研究，结果发现在没有或有 α -异麦芽糖基转移酶的存在下，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶和具有使异麦芽糖游离的作用的异麦芽糖游离酶，与作为非还原末端的键合方式的有 α -1,4葡糖苷键的葡萄糖聚合度在2以上的糖类作用，则大幅度地提高异麦芽糖的产率，而且工业上也容易实施。另外，本发明人等确立了采用这样的制备方法所制得的异麦芽糖的用途，从而完成了本发明，具体来说，本发明是确立了异麦芽糖的制备方法及其用途，其特征是在 α -异麦芽糖基转移酶的非存在或存在下，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用于作为非还原末端的键合方式有 α -1,4葡糖苷键的葡萄糖聚合度在2以上的糖类，生成作为非还原性末端的键合方式有 α -1,6葡糖苷键，作为该非还原性末端以外的键合方式有 α -1,4葡糖苷键的葡萄糖聚合度3以上的 α -异麦芽糖

基葡萄糖及/或环 { $\rightarrow 6$ } - α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow), 将异麦芽糖游离酶作用于此生成物, 生成异麦芽糖, 收集该生成的异麦芽糖, 从而解决了本发明的课题。

附图的简单说明

图 1 是表示温度对来自圆孢芽孢杆菌 (Bacillus globisporus C9) 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的酶活性影响的示意图。

图 2 是表示 pH 对来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的酶活性影响的示意图。

图 3 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的温度稳定性的图。

图 4 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的 pH 稳定性的示意图。

图 5 是表示温度对来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基转移酶的酶活性影响的示意图。

图 6 是表示 pH 对来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基转移酶的酶活性影响的示意图。

图 7 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基转移酶的温度稳定性的示意图。

图 8 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C9 的 α -异麦芽糖基转移酶的 pH 稳定性的示意图。

图 9 是表示温度对来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的酶活性影响的示意图。

图 10 是表示 pH 对来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的酶活性影响的示意图。

图 11 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的温度稳定性的示意图。

图 12 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的 pH 稳定性的示意图。

图 13 是表示温度对来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基转移酶的酶活性影响的示意图。

图 14 是表示 pH 对来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基转移酶的酶活性影响的示意图。

图 15 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基转移酶的温度稳定性的示意图。

图 16 是表示来自圆孢芽孢杆菌 C11 的 α -异麦芽糖基转移酶的 pH 稳定性的示意图。

图 17 是表示采用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶反应制得的 α -异麦芽糖基麦芽三糖的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

图 18 是表示采用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶反应制得的 α -异麦芽糖基麦芽四糖的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

图 19 是表示采用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶反应制得的 α -异麦芽糖基麦芽三糖的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图。

图 20 是表示采用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶反应制得的 α -异麦芽糖基麦芽四糖的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图。

图 21 是表示产物 A 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

图 22 是表示产物 A 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图。

实施发明的最佳方式

用于本发明的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶，是指由淀粉类生成 α -异麦芽糖基葡萄糖（别名， $6-\alpha$ -葡萄糖基麦芽糖）、 α -异麦芽糖基麦芽糖、 α -异麦芽糖基麦芽三糖、 α -异麦芽糖基麦芽四糖等的 α -异麦芽糖基葡萄糖糖类的酶，具体来说，可列举特愿 2000-234937 号说明书公开的，2000 年 4 月 25 日在日本国茨城县筑波市东 1 丁目番地 1 中央第 6 所的独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心中，保藏号码为 FERM BP-7143 的保藏的来自圆孢芽孢杆菌（*Bacillus globisporus*）C9 及保藏号码为 FERM BP-7144 的寄存的来自圆孢芽孢杆菌（*Bacillus globisporus*）C11 的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶及特愿 2001-5441 号说明书公开的基因重组型具有 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性的多肽

等。

另外，用于本发明的 α -异麦芽糖基转移酶，是指由6- α -葡萄糖基麦芽糖、异麦芽糖基麦芽糖之类的 α -异麦芽糖基葡萄糖生成环四糖的酶，可列举特愿2000-229557号说明书公开的来自圆孢芽孢菌(*Bacillus globisporus*)C9(FERM BP-7143)及来自圆孢芽孢杆菌(*Bacillus globisporus*)C11(FERM BP-7144)的 α -异麦芽糖基转移酶，及特愿2000-350142号说明书公开的基因重组型具有 α -异麦芽糖基转移酶活性的多肽等。

此外，本发明用的异麦芽糖游离酶，意味着具有使异麦芽糖从 α -异麦芽糖基葡萄糖或环四糖游离的作用的酶，例如，可列举来自“生物化学杂志”(Journal of Biochemistry)第75卷，105~112页(1974年)报道的球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)T6(NRRL B-4425)，由东京大学应用微生物研究所转让的球形节杆菌(IAM 12103)及“糖类研究(Carbohydrate Research)”第89卷，289~299页(1981年)报道的马杜拉放线菌(*Actinomadura*)R10(NRRL B-11411)等微生物的异麦芽葡聚糖酶(EC3.2.1.94)。

所谓作为用于本发明的非还原末端的键合方式的 α -1,4葡萄糖苷键的葡萄糖聚合度2以上的糖类，例如，是指玉米淀粉、米淀粉、小麦淀粉等的地上淀粉、马铃薯淀粉、甘薯淀粉、木薯淀粉等的地下淀粉及它们的部分水解物(淀粉部分分解物)。前述淀粉部分分解物，通常将上述的地上乃至地下淀粉悬浮在水中，通常配成浓度为10%以上，更优选15%~65%，再优选为20%~50%的淀粉乳，将其加热进行液化，或者可采用酸剂或酶剂将上述的地上乃至地下淀粉进行液化而制得。液化的程度可设定的较低，一般为低于DE15，优选低于DE10，更优选DE9~0.1的范围。用酸剂进行液化时，例如，采用使用盐酸、磷酸、草酸等酸剂进行液化后，通常，用碳酸钙、氧化钙、碳酸钠等的碱剂中和到要求的pH的方法。用酶剂进行液化时，本发明中可适当使用 α -淀粉酶，尤其是耐热性的液化型 α -淀粉酶。

在没有或者有 α -异麦芽糖基转移酶的存在下，使 α -异麦芽糖基葡

葡萄糖合成酶与作为这些非还原末端的键合方式有 α -1, 4 葡萄糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类作用，生成作为非还原性末端的键合方式有 α -1, 6 葡萄糖苷键、作为该非还原性末端以外的键合方式有 α -1, 4 葡萄糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的 α -异麦芽基葡萄糖和/或环 { \rightarrow 6} - α -D-吡喃葡萄糖基 - (1 \rightarrow 3) - α -D-吡喃葡萄糖基 - (1 \rightarrow 6) - α -D-吡喃葡萄糖基 - (1 \rightarrow 3) - α -D 吡喃葡萄糖基 - (1 \rightarrow 3)，使异麦芽糖游离酶与该生成物作用，生成异麦芽糖，收集该生成的异麦芽糖，可高收率地制得异麦芽糖。此外，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用时，通过使由 α -异麦芽糖基转移酶，环麦芽糊精葡聚糖转移酶（以下，简称 CGTase）、 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖淀粉酶及淀粉支化酶（异淀粉酶、支链淀粉酶等）中选出的 1 种或 2 种以上的酶作用，或者，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用后，通过使由 α -异麦芽糖基转移酶，CGTase、 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖淀粉酶及异淀粉酶中选出的 1 种或 2 种以上的酶作用，可高收率地制得异麦芽糖。尤其是，在 α -异麦芽糖基转移酶的存在下，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与作为非还原末端的键合方式有 α -1, 4 葡萄糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类作用所得环四糖再与异麦芽糖游离酶作用时，可使由环四糖制得异麦芽糖的产率最大提高到 100%。本发明中使用多种的酶时的顺序，可考虑异麦芽糖的收率、反应时间、反应条件等进行设定，也可以使多种酶同时作用，或者也可把这些酶的需用量分成几批，在不同的时标 (timing) 下使之作用。使本发明用的酶作用时的 pH，可以是前述酶可发挥这些酶活性的 pH，通常从 pH 4 ~ 10、优选从 pH 5 ~ 8 的范围选择。另外，使酶作用时的温度，通常从 10 ~ 80°C，优选从 30 ~ 70°C 的范围选择。酶量可考虑各酶的反应条件、反应时间而适当地进行增减，通常每克底物固形物， α -异麦芽糖基转移酶及 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶分别从 0.01 ~ 100 单位的范围、异麦芽糖游离酶及淀粉支化酶分别从 1 ~ 10,000 单位的范围、以及 CGTase、 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖淀粉酶及异淀粉酶从 0.05 ~ 7,000 单位的范围内适当地选用。此外，所用酶的反应时间，虽然依赖于酶量，但也可考虑异麦芽糖的生成收率来适当地选择，通常设定在 1 ~ 200 小时，优选 5 ~ 150 小时、10 ~ 100 小时完成所有酶反应。再者，各种酶反应时的 pH

及温度也可在完成本发明中的酶反应的工序中适当地进行变更。

这样制得的酶反应液中的异麦芽糖含量，通常每单位固形物为 30% 以上，优选 40% 以上，更优选 50% 以上，最大也可达到 99% 以上。特别是在这些作为非还原末端的键合方式有 α -1, 4 葡糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类中，同时或按顺序添加 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶、 α -异麦芽糖基转移酶及异麦芽糖游离酶时，可容易地制得每单位固形物的异麦芽糖含有率 50% 以上的酶反应液。前述酶反应液通常采用过滤、离心分离等常用方法除去酶反应液中的不溶物，然后用活性炭脱色，再用 H 型、OH 型离子交换树脂等脱盐，进行精制、浓缩成为糖浆状制品，或者，再将其干燥成粉末状制品。如果需要的话，还可以例如将采用离子交换柱色谱法、活性炭柱色谱法、硅胶柱色谱法等的柱色谱法的级分、使用醇及丙酮等的机溶剂的分离，膜分离法等的 1 种或 2 种以上的适当组合进行精制，可以制成异麦芽糖高含量物。尤其是，作为异麦芽糖高含量物的工业化大量制备方法，优选采用离子交换树脂柱色谱法。具体例如，特开昭 58-23799 号公报及特开照 58-72598 号公报等公开的，采用键合磺酸基的苯乙烯 - 二乙烯基苯交联共聚物树脂的 Na⁺ 形、K⁺ 形等碱金属型及 Ca²⁺ 型 Mg²⁺ 型等碱土金属型的 1 种或 2 种以上的强酸性阳离子交换树脂的离子交换树脂柱色谱法时，工业上可高收率，大量、容易且价廉地制备异麦芽糖高含量物。作为前述市售的强酸性阳离子交换树脂，可列举道化学公司制的商品名 (Dowex 50WX2) (Dowex 50WX4) 及 (Dowex 50WX8)，罗姆·哈斯公司制的商品名 (アンバーライト CG-120) 东京有机化学工业公司制的商品名 (XT-1022E)、三菱化成工业公司制的商品名 (Diaion SK1B) (Diaion SK102) 及 (Diaion SK104) 等。前述离子交换树脂柱色谱法中，可采用固定床方式，移动床方式，类似移动床方式的任一种方式。若采用这样的方法，每单位异麦芽糖的固形物的纯度一般可达 60% 以上，优选 80% 以上，更优选达到 99% 以上的最高纯度。再者，除最高纯度的异麦芽糖以外的异麦芽糖，即，异麦芽糖高含量物通常除异麦芽糖以外，还含有每单位固形物一般为 1~60% 的由葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、其他的淀粉部分水解物、 α -异麦芽糖基葡萄糖类及 α -

葡糖基-(1→6)- α -葡糖基-(1→3)- α -葡糖基-(1→6)- α -葡萄糖(以下, 有时简称“开环四糖”。) 中选出的 1 种或 2 种以上的糖类。

这样制得的本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物, 具有良好的质量和上等品质的甜味, 同时具有阻止作为引起禹齿原因之一的葡聚糖生成的作用, 优选作为难以引起禹齿的甜味剂使用。另外, 本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物的储存稳定性也好。尤其是异麦芽糖结晶高含量制品的情况, 可与 Pullulan、羟乙基淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮等公知的粘合剂并用, 也有利于作为片剂的糖衣剂使用。另外, 本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物也兼具渗透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖类结晶析出性、难发酵性、防糊化淀粉老化性等的有用的性质。因此, 本发明的麦芽糖及麦芽糖高含量物作为甜味料、矫味剂、风味改剂、品质改良剂、稳定剂、赋形剂等, 可优选在食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等各种组合物中使用。

本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物, 也可作为使各种物品带甜味的调味料使用。还可根据需要, 例如与饴糖、葡萄糖、果糖、乳果糖、麦芽糖、蔗糖、异构化糖、蜂蜜、槭糖、异麦芽低聚糖、半乳低聚糖、果低聚糖、山梨糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇(ラクチトール)、二氢化查尔酮、甜菊昔, α -葡糖基甜菊昔、菜状特昔、甘草酸、L-天门冬酰基-L-苯丙氨酸甲酯、スクラロース、阿斯塞夫 K(アセスルフ, μ k, acesulfame, 双氧 噻嗪)、糖精、甘氨酸、丙氨酸等之类的其他的甜味料的 1 种或 2 种以上并用, 如果需要, 也可随意与糊精、淀粉、乳糖等的增量剂的 1 种或 2 种以上并用。

另外, 本发明的异麦芽糖或异麦芽糖高含量物, 尤其是它们的粉末状制品, 可以直接或根据需要与适宜的增量剂、赋形剂、粘结剂、甜味料等的 1 种或 2 种以上并用, 可随意地加工成颗粒、球状、短棒状、板状、立方体状、片剂状、薄膜状或薄片状等各种形状使用。

而且, 本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物的甜味, 也可以与具有酸味, 咸味、涩味、鲜味、苦味等其他味道的各种物质充分地调和, 由于本身耐酸性、耐热性大, 可以用于各种饮食品的着甜味, 味道改良

或品质改良而使用。具体例如，可用作为氨基酸、肽类、酱油、粉末酱油、酱汤、粉末酱汤料、粗制酱油、酱、撒味料、蛋黄酱、调味品、食醋、三杯醋（料酒、酱油、醋各一杯混成的醋）、粉末生鱼片用醋、中华之素、糖水、面汤、沙司、番茄酱、烧肉饭料、咖喱酱、炖味料、汤料、海带鲤鱼制调料、核酸类调味料、复合调味料、糯米制料酒、新糯米料酒、餐点用糖、咖啡用糖等各种调味料。另外，例如，可在酥脆饼干、糯米点心、米花糖、饼类、豆沙包、黑麦卷、馅类、羊羹、水羊羹、蛋羹、果冻、蛋糕、糖球等的各种日本式点心，面包、饼干、咸饼干、小甜饼、小面包、布丁、黄油羹、鸡蛋羹、雪糕、窝状儿饼、松蛋糕、炸面圈、巧克力、口香糖、焦糖、糖果等的洋糕点，冰激淋、果子露等的冰点、水果糖蜜罐头、冰蜜等的果子露类，面粉糊、花生酱、水果酱、膏状食品等的酱类，果子酱、橘皮果酱、糖渍水果、糖果等的水果、蔬菜的加工食品类、什锦酱菜、暴腌咸菜、千层咸菜、腌薤等的腌菜类、咸萝卜咸菜之素、腌白菜之素等的腌菜之素类、火腿、香肠等折畜肉制品类、鱼肉火腿、鱼肉香肠、鱼糕、烤鱼、炸虾等的鱼肉制品，海胆、墨鱼的腌制物、醋海带、干鱿鱼片、料酒浸河豚干等的各种珍味类，用紫菜、野菜、干鱿鱼、小鱼、贝等制备的煮制食品类，煮豆、马铃薯沙拉、海带卷等的家常菜食品，酸奶酪、干酪等的乳制品，鱼肉、畜肉、水果、蔬菜的瓶装罐头、罐头类、日本清酒、合成酒、甜酒、洋酒等的酒类，咖啡、红茶、可可、果汁、碳酸饮料、乳酸饮料、乳酸菌饮料等的清凉水饮料，布丁混合物、热饼混合物、快速年糕小豆汤、快餐汤等的快餐食品，还有断奶食品、治疗食品、饮料冲剂、肽食品、冷冻食品、健康食品等的各种饮食品中利用。

此外，为了提高家畜、家禽、蜜蜂、蚕、鱼等饲养动物用的饲料、饵料的嗜食性，也可以使用。除此之外，还可作为香烟、牙膏、口红、愈裂膏、内服液、片剂、糖衣剂、肝油丸、口腔清凉剂、口腔芳香剂、漱口剂等各种固形物用甜味剂、或用作为这些的味道改良剂、矫味剂、品质改良剂、稳定剂等。

本发明的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物作为品质改良剂和/或稳定

剂，通过配合用在含有效成份、活性成分或生理活性物质的健康食品、医药品等中，可制得稳定且高品质的液状、糊状或固体状的健康食品或医药品。作为前述有效成分或生理活性物质，可列举如 α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、TNF- α 、TNF- β 、巨噬细胞移动抑制因子、集落刺激因子、转移因子、白介素等的淋巴因子、胰岛素、生长激素、催乳素、红细胞生成素、卵细胞刺激激素等的激素，BCG疫苗、日本脑炎疫苗、麻疹疫苗、小儿麻痹疫苗、天花疫苗、破伤风类毒素、蛇毒（ハブ）抗毒素、人免疫球蛋白等的生物制剂、青霉素、红霉素、氯霉素、四环素、链霉素、硫酸卡那霉素等的抗生物质、硫胺素、核黄素、L-抗坏血酸、 α -葡萄糖基抗坏血酸、鱼肝油、类胡萝卜素、麦角甾醇、生育酚、芦丁、 α -葡萄糖基芦丁、柚皮苷、 α -葡萄糖基柚皮苷、橙皮苷、 α -葡萄糖基橙皮苷等的维生素类、脂酶、弹性蛋白酶、尿激酶、蛋白酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶、葡糖化酶、乳糖酶等的酶、人参提取物、矮竹提取物、梅提取物、松提取物、甲鱼提取物、小球藻提取物、芦荟提取物、芦荟胶提取物等的提取物类、病毒、乳酸菌、酵母等的活菌、蜂王精等。

使以上所述的各种组合物含有本发明的异麦芽糖或异麦芽糖高含量物的方法是可在制成这些组合物的工序中使之含有，例如，适当选择混合、溶解、熔解、浸渍、浸透、分散、涂布、包覆、喷雾、注入、晶析、固化等公知的方法。其量通常相对于每单位重量前述组合物，在0.1%以上，优选1%以上，更优选2~99.99%。

以下，用实施例具体地说明本发明。

实验例1： α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶的配制。

把淀粉部分分解物（商品名“パインデックス#4”松谷化学株式会社制）4.0w/v%、酵母提取物（商品名“アサヒミースト”朝日啤酒株式会社制）1.8w/v%、磷酸氢二钾0.1w/v%、磷酸二氢钠·12水盐0.06w/v%、硫酸镁·7水盐0.05w/v%及水所组成的液体培养基100ml加到500ml三角烧瓶中，在高压釜中，121℃灭菌20分钟，冷却后接种圆孢芽孢杆菌C9（FERM BP-7143），在27℃、230rpm条件下旋转振荡48小时，把培养物

作为种培养物。

把与种培养时相同组成的培养基约 20L 加到容量 30L 的发酵器中、加热杀菌、冷却到温度 27℃后，接种种培养液 1v/v%，边保持温度 27℃，pH6.0~8.0，边通气搅拌培养 48 小时。培养后，培养液中的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性约为 0.45 单位/ml， α -异麦芽糖基转移酶活性约为 1.5 单位/ml，环四糖生成活性约为 0.95 单位/ml，离心分离（10,000rpm、30 分钟），测定回收的上清液约 18L 的酶活性，结果该上清液中 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶大约为 0.45 单位/ml 的活性（总活性约 8,110 单位）， α -异麦芽糖基转移酶有大约 1.5 单位/ml 的活性（总活性约 26,900 单位），该上清液可用作为含有 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶及 α -异麦芽糖基转移酶的酶剂。

再有，前述酶活性按如下方式测定。即， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性，是使麦芽三糖溶解在 100mM 醋酸缓冲液（pH6.0）中使浓度为 2w/v%，作为底物液，在其底物液 0.5ml 中加入酶液 0.5ml，在 35℃进行酶反应 60 分钟，将该反应液煮沸 10 分钟，使反应停止后，用高效液相色谱（以下，简称 HPLC 法）定量分析反应液中主要生成的异麦芽糖基麦芽糖与麦芽糖中的该麦芽糖的量。HPLC 法使用 YMC Pack ODS-AQ303 柱（YMC 株式会社制），在柱温度 40℃、流速 0.5ml/min 的水的条件下进行检测，使用示差折射计（RI-8012）（东曹株式会社）进行检测。 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的活性 1 单位，定义为在上述的条件下，1 分钟生成 1 微摩尔麦芽糖的酶量。

此外， α -异麦芽糖基转移酶活性，是使 6- α -葡糖基麦芽糖溶解在 100mM 醋酸缓冲液（pH6.0）中使浓度为 2w/v%，以此作为底物液，在该底物液 0.5ml 中加入酶液 0.5ml，在 35℃进行酶反应 30 分钟，将该反应液煮沸 10 分钟，使反应停止后，用葡萄糖氧化酶法定量分析在该反应液中主要生成的环四糖和葡萄糖中的该葡萄糖量。 α -异麦芽糖基转移酶的活性 1 单位，定义为在上述的条件下 1 分钟生成 1 微摩尔的葡萄糖的酶量。

环四糖生成活性，是使淀粉部分分解物（商品名パインデックス

#100、松谷化学株式会社制)溶解在 50mM 醋酸缓冲液 (pH6.0) 中使浓度为 2w/v%，以此作为底物液，在该底物液 0.5ml 中加入酶液 0.5ml，在 35℃进行酶反应 60 分钟，将该反应液在 100℃热处理 10 分钟，使反应停止后，再加入含有 α -葡萄糖苷酶(商品名糖苷转移酶 L “AMANO” 天野制药制) 70 单位/ml 和葡萄糖淀粉酶(大加世生化学工业株式会社销售) 27 单位/ml 的 50mM 醋酸缓冲液 (pH5.0) 1ml，在 50℃处理 60 分钟，在 100℃将该液体热处理 10 分钟，使酶失活后，用上述 HPLC 法定量环四糖量。环四糖生成活性 1 单位定义为在上述条件下 1 分钟生成 1 微摩尔的环四糖的酶量。

实验例 2： α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶的分离
<实验例 2-1： α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的分离>

用 80%饱和硫酸铵溶液盐析实验例 1 制得的培养上清液约 18L，在 4℃放置 24 小时后，将其盐析沉淀物进行离心分离 (10,000rpm、30 分钟)、回收、溶解在 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.5) 中后，对该缓冲液透析，制得粗酶液约 400ml。该粗酶液具有 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性 8,110 单位， α -异麦芽糖基转移酶活性 24,700 单位和环四糖生成活性约 15,600 单位。将该粗酶液供使用三菱化学株式会社制 Sepabeads FP-DA13 凝胶的离子交换色谱法用 (凝胶容量 1,000ml)。此时， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶、 α -异麦芽糖基转移酶和环四糖的任一种，均不吸附在 Sepabeads FP-DA13 凝胶上，溶解在非吸附流分中流出。将该酶液透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中，离心分离该透析液，除去杂质，供使用 Amersham Pharmacia Biotech 株式会社制 (Sephacryl HR S-200) 凝胶的亲和色谱法 (凝胶量 500ml) 用。酶活性成分吸附在 Sephacryl HR S-200 凝胶上，硫酸铵从 1M 到 0M 呈线性梯度、麦芽四糖从 0mM 到 100mM 呈线性梯度洗脱，结果 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶分离，流出， α -异麦芽糖基转移酶活性在硫酸铵的线性梯度中，在其浓度大约 0M 左右洗脱， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性，因麦芽四糖的线性梯度中，在其浓度大约 30mM 左右洗脱，因此分别收集回收 α -异麦芽糖基转移酶活性部分和 α -异麦芽糖基葡萄糖合成

酶活性部分。

进一步，将前述 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性部分透析到含1M硫酸铵的10mM磷酸缓冲液(pH7.0)中，离心分离该透析液，除去不溶物，供使用东曹株式会社制(Butyl-Toyopearl 650M)凝胶的疏水色谱法用(凝胶量350ml)。该酶活性成分吸附在(Butyl-Toyopearl 650M)凝胶上，硫酸铵从1M到0M呈线性洗脱，结果在硫酸铵浓度约0.3M左右，吸附的酶活性成分洗脱，收集回收表示该酶活性的部分。再将回收液透析到含1M硫酸铵的10mM磷酸缓冲液(pH7.0)中，离心分离该透析液，除去不溶物，采用使用(Sephacryl HR S-200)凝胶的亲和色谱法进行精制。该精制各步骤中的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性量、比活性、收率如表1所示。

表 1

工序	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性量 (单位)	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 比活性(单位/mg蛋白)	收率(%)
培养上清液	8,110	0.12	100
硫酸铵盐析后的透析液	7,450	0.56	91.9
离子交换柱洗脱液	5,850	1.03	72.1
亲和柱洗脱液	4,040	8.72	49.8
疏水柱洗脱液	3,070	10.6	37.8
亲和柱洗脱液	1,870	13.6	23.1

采用含7.5w/v%浓度的聚丙烯酰胺的凝胶电泳测定精制的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的纯度，结果蛋白谱带单一，是纯度高的酶标准品。

<实验例2-2： α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的性质>

将实验例2-1制得的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶供SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法用(凝胶浓度7.5w/v%)，同时与泳动的分子量标识器(日本BioRad Laboratories株式会社制)进行比较，测定该酶的分子量，结果分子量约是140,000±20,000道尔顿。

把精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶供于含2w/v%ampholine(两性

电解质) (Amersham Pharmacia Biotec 公司制) 等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 泳动后测定蛋白谱带与凝胶的 pH, 求出该酶的等电点, 结果等电点 pI 约为 5.2 ± 0.5 。

按照活性测定的方法, 分析温度、pH 对该酶活性的影响。再者, 温度的影响是在没有 Ca^{2+} 存在下和 1mM 存在下进行测定。这些的结果如图 1 (温度的影响), 图 2 (pH 的影响) 所示。酶的最适温度在 pH6.0、60 分钟反应下是约 40°C (没有 Ca^{2+} 存在) 和约 45°C (有 1mM Ca^{2+} 存在), 最佳 pH 在 35°C、60 分钟反应下是约 6.0~6.5。该酶的温度稳定性是在没有 Ca^{2+} 存在下或有 1mM Ca^{2+} 存在下将酶溶液 (20mM 醋酸缓冲液, pH6.0) 在各温度保持 60 分钟, 水冷却后, 通过测定残存的酶活性而求出。另外, pH 稳定性是在各 pH 下、50mM 缓冲液中把该酶在 4°C 保持 24 小时后。调整 pH 到 6.0, 通过测定残存的酶活性而求出。结果分别如图 3 (温度稳定性)、图 4 (pH 稳定性) 所示。该酶的温度稳定性在约 35°C (没有 Ca^{2+} 存在)、在约 40°C (有 1mM Ca^{2+} 存在), pH 稳定性约在 4.5~9.0。

在浓度 1mM 的各种金属盐存在下, 按照活性测定的方法分析金属离子对该酶活性的影响。结果如表 2 所示。

表 2

金属离子	相对活性 (%)	金属离子	相对活性 (%)
未添加	100	Hg^{2+}	4
Zn^{2+}	92	Ba^{2+}	65
Mg^{2+}	100	Sr^{2+}	80
Ca^{2+}	115	Pb^{2+}	103
Co^{2+}	100	Fe^{2+}	98
Cu^{2+}	15	Fe^{3+}	97
Ni^{2+}	98	Mn^{2+}	111
Al^{3+}	99	EDTA	20

由表 2 的结果可以看出, 该酶活性因 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、EDTA 存在而明显受抑制, 因 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 存在受到抑制。因 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 存在被活化。

<实验例 2-3: α -异麦芽糖基转移酶的分离>

将实验例 2-1 制得的 α -异麦芽糖基转移酶部分对含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 进行透析, 离心分离该透析液, 除去不溶物,

供给于使用东曹株式会社制 (Butyl-Toyopearl 650M) 凝胶的疏水色谱法用 (凝胶量 350ml)。该酶吸附在 (Butyl-Toyopearl 650M) 上，在硫酸铵从 1M 到 0M 呈线性洗脱时，在硫酸铵浓度约 0.3M 左右时从凝胶中洗脱，收集该酶活性部分。将该回收馏分再一次透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中，离心分离该透析液，除去不溶物，采用使用 (Sephacryl HR S-200) 凝胶的亲和色谱法进行精制。各精制阶段的 α -异麦芽糖基转移酶活性量、比活性、收率如表 3 所示。

表 3

工序	α -异麦芽糖基葡萄糖转移酶活性量 (单位)	α -异麦芽糖基葡萄糖转移酶比活性 (单位/mg 蛋白)	收率 (%)
培养上清液	26,900	0.41	100
硫酸铵盐析后的透析液	24,700	1.85	91.8
离子交换柱洗脱液	19,400	3.41	72.1
亲和柱洗脱液	13,400	18.6	49.8
疏水柱洗脱液	10,000	21.3	37.2
亲和柱洗脱液	6,460	26.9	24.0

<实验例 2-4: α -异麦芽糖基转移酶的性质>

将实验例 2~3 制得的精制 α -异麦芽糖基转移酶供于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (凝胶浓度 7.5w/v%)，同时与泳动的分子量标识器 (日本 BioRad Laboratories 公司制) 进行比较测定该酶的分子量，结果分子量是约 $112,000 \pm 20,000$ 道尔顿。

把精制 α -异麦芽糖基转移酶供于含有 2w/v% ampholine (两性电解质) (Amersham Pharmacia Biotech 公司制) 的等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳法，泳动后测定蛋白谱带与凝胶的 pH，求出该酶的等电点，结果等电点 pI 约为 5.5 ± 0.5 。

按照活性测定的方法，分析温度、pH 对该酶活性的影响。结果如图 5 (温度的影响)、图 6 (pH 的影响) 所示。酶的最适温度在 pH6.0、30

分钟反应下约为 45℃、最佳 pH 在 35℃、30 分钟反应下约为 6.0。该酶的温度稳定性是将酶溶液 (20mM 醋酸缓冲液, pH6.0) 在各温度保持 60 分钟, 水冷却后, 通过测定残存的酶活性而求出。而 pH 稳定性是在各 pH 的 50mM 缓冲液中把该酶在 4℃保持 24 小时后, 把 pH 调整到 6.0, 通过测定残存的酶活性而求出。各结果分别如图 7 (温度稳定性)、图 8 (pH 稳定性) 所示, 该酶的温度稳定性约在 40℃以下, pH 稳定性约在 4.0~9.0。

在浓度 1mM 的各种金属盐存在下, 按照活性的测定方法分析金属离子对该酶活性的影响。结果如表 4 所示。

表 4

金属离子	相对活性 (%)	金属离子	相对活性 (%)
未添加	100	Hg ²⁺	1
Zn ²⁺	88	Ba ²⁺	102
Mg ²⁺	98	Sr ²⁺	101
Ca ²⁺	101	Pb ²⁺	89
Co ²⁺	103	Fe ²⁺	96
Cu ²⁺	57	Fe ³⁺	105
Ni ²⁺	102	Mn ²⁺	106
Al ³⁺	103	EDTA	104

由表 4 的结果可以看出, 该酶活性因 Hg²⁺ 存在明显受抑制, 因 Cu²⁺ 存在受抑制。另外, 不因 Ca²⁺ 存在被活化, 也不因 EDTA 存在受抑制。

本发明中也可优选使用来自前述圆孢芽孢杆菌 C9 (FERM BP-7143) 的 α-异麦芽糖基葡萄糖合成酶及 α-异麦芽糖基转移酶的任一种。

<实验例 3: α-异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α-异麦芽糖基转移酶的配制。

把淀粉部分分解物 “パインジックス#4” 4.0w/v%、酵母提取物 “又 #ヒシースト” 1.8w/v%、磷酸氢二钾 0.1w/v%、磷酸二氢钠·12 水盐 0.06w/v%、硫酸镁·7 水盐 0.05w/v% 及水所组成的液体培养基 100ml 加到 500ml 三角烧瓶中, 在高压锅中 121℃ 杀菌 20 分钟, 冷却, 接种 *Bacillus glonisporus* C11 (FERM BP-7144), 把在 27℃、230rpm 条件下旋转振荡

48 小时的培养物作为种培养。

把与种培养时相同组成的培养基约 20L 加到容量 30L 的发酵器中，加热杀菌，冷却到温度 27℃后，接种种培养液 1v/v%，边保持温度 27℃、pH6.0~8.0，边通气搅拌培养 48 小时。培养后，培养液中的该酶活性约为 0.55 单位/ml、 α -异麦芽糖基转移酶活性约为 1.8 单位/ml、环四糖生成活性约为 1.1 单位/ml，离心分离 (10,000rpm、30 分钟)，回收，测定回收的上清液约 181 的酶活性，结果 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶是约 0.51 单位/ml 的活性 (总活性约 9,180 单位)、 α -异麦芽糖基转移酶是约 1.7 单位/ml 的活性 (总活性约 30,400 单位)。

用 80% 饱和硫酸铵液盐析前述培养上清液约 18L，在 4℃放置 24 小时后，将其盐析沉淀物离心分离 (10,000rpm、30 分钟)，回收，溶解在 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.5) 中后，对该缓冲液透析，制得粗酶液约 416ml。判明该粗酶液中， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性有 8,440 单位， α -异麦芽糖基转移酶活性有约 28,000 单位，环四糖生成活性有约 17,700 单位。把该粗酶液供于使用实施例 2-1 所述的 (Sepabeads FP-DA13) 凝胶的离子交换色谱法。 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性， α -异麦芽糖基转移酶活性、环四糖生成活性的任一种均不吸附在 (Sepabeads FP-DA13) 凝胶上，而洗脱在非吸附馏分中。对该非吸附馏分透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0)，离心分离该透析液，除去不溶物，供给于使用 Amersham Pharmacia Biotec 株式会社制 (Sephacryl HR S-200) 凝胶的亲合色谱法 (凝胶量 500ml)。酶活性成分吸附在 (Sephacryl HR S-200) 凝胶上，在硫酸铵从 1M 到用 0M 的线性梯度、麦芽四糖从 0mM 到 100mM 的线性梯度中洗脱，结果 α -异麦芽糖基转移酶活性成分与 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶分离而洗脱， α -异麦芽糖基转移酶活性成分，在硫酸铵的线性范围，在其浓度约 0.3M 左右洗脱， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性，在麦芽四糖的线性范围，在其浓度约 30mM 左右洗脱。然后，分别收集回收 α -异麦芽糖基转移酶活性部分和 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶部分。

实验例 4： α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶的分离

<实验例 4-1: α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的分离>

将实验例 3 制得的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶成分透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液中 (pH7.0), 离心分离该透析液, 除去不溶物, 供使用东曹株式会社制 “Butyl-Toyopearl 650M” 凝胶的疏水色谱法 (凝胶量 350ml) 用。该酶吸附在 “Butyl-Toyopearl 650M” 凝胶上, 在硫酸铵从 1M 到 0M 的线性梯度洗脱, 结果在硫酸铵浓度约 0.3M 左右, 吸附的酶洗脱、收集回收显示该活性的成分。将该回收液再一次透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 离心分离该透析液, 除去不溶物, 采用使用 “Sepbacryl HR S-200” 凝胶的亲和色谱法进行精制。该精制的各阶段的 α -异麦芽糖基葡萄糖糖类合成酶活性量、比活性、收率如表 5 所示。

表 5

工序	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶活性量 (单位)	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 比活性 (单位/mg 蛋白)	收率 (%)
培养上清液	9,180	0.14	100
硫酸铵盐析后的透析液	8,440	0.60	91.9
离子交换柱洗脱液	6,620	1.08	72.1
亲和柱洗脱液	4,130	8.83	45.0
疏水柱洗脱液	3,310	11.0	36.1
亲和柱洗脱液	2,000	13.4	21.8

对精制的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶采用含 7.5w/v% 浓度聚丙烯酰胺的凝胶电泳测定该的纯度, 结果蛋白谱带单一, 是纯度高的酶标准品。

<实验例 4-2: α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的性质>

把实验例 4-1 制得的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶供 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (凝胶浓度 7.5w/v%) 用, 同时与泳动的分子量标识器 (日本 BioRad Laboratories 株式会社制) 进行比较, 测定该酶的分子量, 结果分子量是约 $137,000 \pm 20,000$ 道尔顿。

把精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶供含有 2w/v% ampholine (两性电解质) (Amersham Pharmacia Biotec 公司制) 的等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳法用、泳动后、测定蛋白谱带与凝胶的 pH, 求出该酶的等电点, 结果等电点 pI 约 5.2 ± 0.5 。

按照活性测定的方法, 分析温度、pH 对该酶活性的影响。然后, 有关温度的影响是在没有 Ca^{2+} 存在下和有 1mM Ca^{2+} 存在下进行测定。其结果如图 9 (温度的影响)、图 10 (pH 的影响) 所示。酶的最佳温度在 pH6.0、60 分钟反应下是约 45°C (没有 Ca^{2+} 存在)、约 50°C (有 Ca^{2+} 1mM 存在), 最佳 pH 在 35°C、60 分钟反应下是约 6.0。该酶的温度稳定性是在没有 Ca^{2+} 在下或有 1mM Ca^{2+} 存在下, 把酶溶液 (20mM 醋酸缓冲液、pH6.0) 在各温度保持 60 分钟, 水冷却后、测定残存的酶活性而求出。另外, pH 稳定性是在各 pH50mM 缓冲液中把该酶在 4°C 保持 24 小时后, 把 pH 调整到 6.0, 测定残存的酶活性而求出。各结果分别如图 11 (温度稳定性)、图 12 (pH 稳定性) 所示。该酶的温度稳定性达到约 40°C (没有 Ca^{2+} 存在) 和约 45°C (有 1mM Ca^{2+} 存在), pH 稳定性是约 5.0~10.0。

在浓度 1mM 的各种金属盐存在下, 按照活性测定的方法分析金属离子对该酶活性的影响。结果如表 6 所示。

表 6

金属离子	相对活性 (%)	金属离子	相对活性 (%)
未添加	100	Hg^{2+}	4
Zn^{2+}	91	Ba^{2+}	65
Mg^{2+}	98	Sr^{2+}	83
Ca^{2+}	109	Pb^{2+}	101
Co^{2+}	96	Fe^{2+}	100
Cu^{2+}	23	Fe^{3+}	102
Ni^{2+}	93	Mn^{2+}	142
Al^{3+}	100	EDTA	24

由表 6 的结果可以看出, 该活性因 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、EDTA 存在而明显受抑制, 因 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 存在受抑制。因 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 存在被活性化。

<实验例 4-3: α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的氨基酸序列>

本发明不是关于 α -异麦芽葡萄糖合成酶自身的发明，此外，有关其详细的氨基酸序列的分析方法，由于特愿 2001-5441 号说明书已详细公开，故省略，而实验例 4-1 制得的 α -异麦基葡萄糖合成酶与特愿 2001-5441 号说明书所公开的多肽同样，具有序列表中序列序号 1 中合记的氨基酸序列中的第 36 ~ 1284 号氨基酸序列。

<实验例 4-4: α -异麦芽糖基转移酶的分离>

将实验例 3 制得的 α -异麦芽糖基转移酶馏分透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液中 (pH7.0)，离心分离该透析液，除去不溶物，供使用东曹株式会社制 “Butyl-Toyopearl 650M” 凝胶的疏水色谱法用 (凝胶量 350ml)。该酶吸附在 “Butyl-Toyopearl 650M” 凝胶上，在硫酸铵从 1M 到 0M 的线性梯度洗脱，结果在硫酸铵浓度约 0.3M 左右，吸附的酶洗脱，收集回收显示该酶活性的组分。将该回收液再一次透析到含 1M 硫酸铵的 10mM 磷酸缓冲液中 (pH7.0)、离心分离该透析液，除去不溶物，采用使用 “Sephacryl HR S-200” 凝胶的亲和色谱法进行精制。该精制的各阶段的 α -异麦芽糖基转移酶活性量、比活性、收率如表 7 所示。

表 7

工序	α -异麦芽糖基转移酶活性量(单位)	α -异麦芽糖基转移酶比活性 (单位/mg 蛋白)	收率 (%)
培养上清液	30,400	0.45	100
硫酸铵盐析后的透析液	28,000	1.98	92.1
离子交换柱洗脱液	21,800	3.56	71.7
亲和柱洗脱液	13,700	21.9	45.1
疏水柱洗脱液	10,300	23.4	33.9
亲和柱洗脱液	5,510	29.6	18.1

<实验例 4-5: α -异麦芽糖基转移酶的性质>

把实验例 4-4 制得的精制 α -异麦芽糖基转移酶供 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (凝胶浓度 7.5w/v%)，同时与泳动的分子量标识器 (日本株式会社制) 进行比较，测定该酶的分子量，结果分子量是约 102,000 \pm 20,000 道尔顿。

把精制 α -异麦芽糖基转移酶供含有 2w/v% ampholine (两性电解质)

(Amersham Pharmacia Biotec 公司制) 的等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳法用, 泳动后, 测定蛋白谱带与凝胶的 pH, 求该酶的等电点, 结果等电点 pI 是约 5.6 ± 0.5 。

按照活性测定的方法, 分析温度、pH 对该酶活性的影响。结果如图 13 (温度的影响)、图 14 (pH 的影响) 所示。酶的最佳温度在 pH6.0、30 分钟反应下是约 50℃, 最佳 pH 在 35℃、30 分钟反应下是约 5.5~6.0。该酶的温度稳定性是将酶溶液 (20mM 醋酸缓冲液, pH6.0) 在各温度保持 60 分钟, 水冷却后, 测定残存的酶活性而求出。另外, pH 稳定性是在各 pH50mM 缓冲液中把该酶在 4℃ 保持 24 小时后, 把 pH 调整到 6.0, 测定残存的酶活性而求出。各结果分别如图 15 (温度稳定性)、图 16 (pH 稳定性)。该酶的温度稳定性是达到约 40℃, pH 稳定性是约在 4.5~9.0。

按照活性测定的方法, 分析浓度 1mM 的各种金属盐存在下, 金属离子对该酶活性的影响。结果如表 8 所示。

表 8

金属离子	相对活性 (%)	金属离子	相对活性 (%)
未添加	100	Hg ²⁺	2
Zn ²⁺	83	Ba ²⁺	90
Mg ²⁺	91	Sr ²⁺	93
Ca ²⁺	91	Pb ²⁺	74
Co ²⁺	89	Fe ²⁺	104
Cu ²⁺	56	Fe ³⁺	88
Ni ²⁺	89	Mn ²⁺	93
Al ³⁺	89	EDTA	98

由表 8 的结果可以看出, 该酶活性因 Hg²⁺ 存在明显受抑制, Cu²⁺ 存在受抑制。而不因 Ca²⁺ 存在活化, 也不因 EDTA 存在受抑制。

<实验例 4-6: α -异麦芽糖基转移酶的氨基酸序列>

本发明不是关于 α -异麦芽糖基转移酶自身的发明, 此外, 有关其详细的氨基酸序列的分析方法, 由于特愿 2000-350142 号说明书详细公开, 故省略。而实验例 4-4 制得的 α -异麦芽糖基转移酶已在特愿 2000-350142 号说明书中公开, 具有序列表中序列序号 2 中合记的氨基酸序列中的第 30~第 1093 号的氨基酸序列。

实验例 5: α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶对各种糖类的作用

对 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶对各种糖类(底物)的作用进行了试验。即, 配制含麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖、异麦芽糖、异麦芽三糖、 $6-\alpha$ -葡糖基麦芽糖、异- $6-\alpha$ -葡糖基麦芽糖、 α , α -海藻糖、曲二糖、黑曲霉二糖、新海藻糖、纤维二糖、龙胆二糖、麦芽糖醇、麦芽三糖醇、乳糖、蔗糖、吡喃葡糖基庶糖、樱胶糖、麦芽糖基葡糖昔、异麦芽糖基葡糖昔的溶液, 在这些的溶液中, 按每克底物固形物分别加入来自实验例 2-1 制得的圆孢芽孢杆菌 C9 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶、或来自实验例 4-1 制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶标准品 2 单位, 将底物浓度调整到 2% (w/v), 在 30°C、pH6.0 条件下反应 24 小时。把酶反应前后的反应液供硅胶薄层色谱(以下, 简称 TLC 法)分析用。TLC 法中, 作为展开溶剂使用正丁醇、吡啶和水的混合液(体积比 6:4:1), 作为薄层板使用墨克公司制“キ-ゼル 凝胶 60”(氧化铝板, 20×20cm), 展开 2 次分离糖类, 然后在氧化铝板上喷硫酸-甲醇使之显色, 检测全部糖类。另外, 通过采用二苯基胺-苯胺法使还原糖显色检测的方法进行检测。TLC 法的结果如表 9 所示。

表 9

底物	酶作用		底物	酶作用	
	C9 酶	C11 酶		C9 酶	C11 酶
麦芽糖	+	+	黑曲霉二糖	+	+
麦芽三糖	++	++	新海藻糖	+	+
麦芽四糖	+++	+++	纤维二糖	-	-
麦芽五糖	+++	+++	龙胆二糖	-	-
麦芽六糖	+++	+++	麦芽糖醇	-	-
麦芽七糖	+++	+++	麦芽三糖醇	+	+
异麦芽糖	-	-	乳糖	-	-
异麦芽三糖	-	-	蔗糖	-	-
$6-\alpha$ -葡糖基麦芽糖	-	-	吡喃葡糖基庶糖	+	+
异- $6-\alpha$ -葡糖基麦芽糖	++	++	樱胶糖	-	-
海藻糖	-	-	麦芽糖基葡糖昔	++	++
曲二糖	+	+	异麦芽糖基葡糖昔	-	-

注) 在酶反应前后

(-) 表示无变化

(+) 表示底物的斑点略有减少，有其他生成物。

(++) 表示底物的斑点减少很多，有其他生成物。

(+++) 表示底物的斑点基本消失，有其他生成物。

由表 9 的结果可以看出， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶，在试验的多种糖类中，充分地与葡萄糖聚合度 3 以上、非还原末端有麦芽糖结构的糖作用。另外表明，葡萄糖聚合度 2 的糖中，对麦芽糖、曲二糖、黑曲霉二糖、新海藻糖、麦芽三糖醇、吡喃葡萄糖基庶糖略有作用。

实验例 6：来自麦芽低聚糖的生成物

在浓度 1% 的麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖或麦芽五糖水溶液中，加入实验例 4-1 制得的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶，相对于每克固体物分别为，相对于麦芽糖和麦芽三糖为 2 单位，相对于麦芽四糖为 0.2 单位、相对于麦芽五糖为 0.1 单位。在 35℃、pH6.0 的条件下作用 8 小时后，在 100℃ 保持 10 分钟，使酶失活停止反应。采用 HPLC 法测定制得的酶反应液的糖组成。作为 HPLC 法，使用 (YMC Pack ODS-AQ303) 柱 (YMC 株式会社制) 在温度 40℃、流速 0.5ml/min 水的条件下进行，检测使用示差折光仪 (商品名 (RI-8012)，东曹株式会社制) 进行。将其结果示于表 10。

表 10

反应生成的糖的种类	底物			
	麦芽糖	麦芽三糖	麦芽四糖	麦芽五糖
葡萄糖	8.5	0.1	0.0	0.0
麦芽糖	78.0	17.9	0.3	0.0
麦芽三糖	0.8	45.3	22.7	1.9
麦芽四糖	0.0	1.8	35.1	19.2
麦芽五糖	0.0	0.0	3.5	34.4
麦芽六糖	0.0	0.0	0.0	4.6
异麦芽糖	0.5	0.0	0.0	0.0
葡糖基麦芽糖	8.2	1.2	0.0	0.0
葡糖基麦芽三糖	2.4	31.5	6.8	0.0
X	0.0	2.1	30.0	11.4
Y	0.0	0.0	1.4	26.8
Z	0.0	0.0	0.0	1.7
其他	0.6	0.1	0.2	0.0

表中的葡萄糖基麦芽糖是 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名: $6^2\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$ 、 $6\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$)、葡萄糖基麦芽三糖是 α -异麦芽糖基麦芽糖(别名: $6^3\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽三糖}$)。X是实验例7所述的 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名: $6^4\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽四糖}$ ，Y是实验例7所述的 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名: $6^5\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽五糖}$ ，Z是未鉴定的糖类。

由表10的结果可以看出，该酶的作用结果是由底物麦芽糖，主要生成葡萄糖和 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名: $6^2\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$ 、 $6\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$)、生成少量麦芽三糖、异麦芽糖、 α -异麦芽糖基麦芽糖(别名: $6^3\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽三糖}$)。另外，由底物麦芽三糖，主要生成麦芽糖和 α -异麦芽糖基麦芽糖，还生成少量葡萄糖、麦芽四糖、 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名: $6^2\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$ 、 $6\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽糖}$)、生成物X。由底物麦芽四糖，主要生成麦芽三糖和生成物X，生成少量麦芽糖、麦芽五糖、 α -异麦芽糖基麦芽糖(别名: $6^3\text{-}\alpha\text{-葡萄糖基麦芽三糖}$)和生成物Y。由底物麦芽五糖，主要生成麦芽四糖和生成物Y，生成少量麦芽三糖，麦芽六糖、生成物X及生成物Z。

将作为来自底物麦芽四糖的主要生成物的生成物X和作为来自底物麦芽五糖的主要生成物的生成物Y进行分离和精制。用制备用HPLC柱(YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A)(YMC株式会社制)进行精制，分别从来自上述麦芽四糖的反应物、来自麦芽五糖的反应物中，分离出纯度99.9%以上的生成物X、固形物收率约8.3%，分离出纯度99.9%以上的生成物Y、固形物收率约11.5%。

实验例7：生成物的结构解析

用实验6方法制得的生成物X与生成物Y，按照常规方法进行甲基化分析和NMR分析。甲基化分析的结果归纳于表11。有关NMR分析的结果，将 $^1\text{H-NMR}$ 光谱归纳于图17(生成物X)、图18(生成物Y)，将 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱和归属归纳于图19(生成物X)、图20(生成物Y)和表12。

表 11

分析甲基化物的种类	组成比	
	生成物X	生成物Y
2, 3, 4-三甲基化物	1.00	1.00
2, 3, 6-三甲基化物	3.05	3.98
2, 3, 4, 6-四甲基化物	0.82	0.85

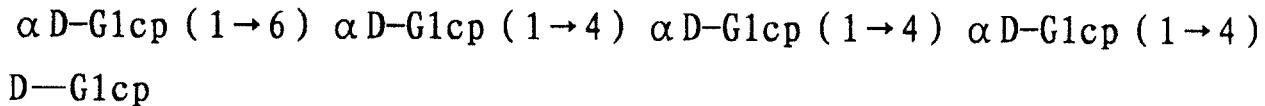
表 12

葡萄糖序号	碳序号	NMR 化学位移值 (ppm)	
		生成物 X	生成物 Y
a	1a	100.8	100.8
	2a	74.2	74.2
	3a	75.8	75.7
	4a	72.2	72.2
	5a	74.5	74.5
	6a	63.2	63.1
b	1b	102.6	102.6
	2b	74.2	74.2
	3b	75.8	75.7
	4b	72.1	72.1
	5b	74.0	74.0
	6b	68.6	68.6
c	1c	102.3	102.3
	2c	74.2	74.2
	3c	76.0	76.0
	4c	79.6	79.5
	5c	73.9	73.9
	6c	63.2	63.1
d	1d	102.2	102.3
	2d	74.0 (α) , 74.4 (β)	74.2
	3d	76.0	76.0
	4d	79.8	79.5
	5d	73.9	73.9
	6d	63.2	63.1
e	1e	94.6 (α) , 98.5 (β)	102.1
	2e	74.2 (α) , 76.7 (β)	74.0 (α) , 74.4 (β)
	3e	75.9 (α) , 78.9 (β)	76.0
	4e	79.6 (α) , 79.4 (β)	79.8
	5e	72.6 (α) , 77.2 (β)	73.9
	6e	63.4 (α) , 63.4 (β)	63.1
f	1f		94.6 (α) , 98.5 (β)
	2f		74.2 (α) , 76.7 (β)
	3f		76.0 (α) , 78.9 (β)
	4f		79.6 (α) , 79.5 (β)
	5f		72.6 (α) , 77.2 (β)
	6f		63.3 (α) , 63.3 (β)

由这些的结果可以看出，由于 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶的作用，来自麦芽四糖的生成物 X 是葡糖基在麦芽四糖的非还原末端葡萄糖的 6

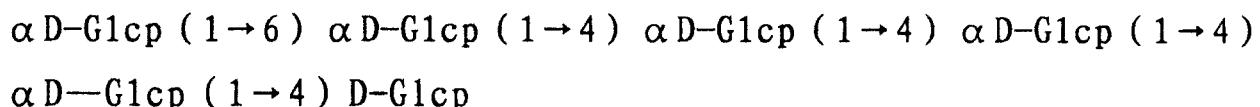
位羟基进行 α 键合的五糖，是结构式1表示的 α -异麦芽糖基葡萄三糖(别名， 6^4 -O- α -葡糖基麦芽四糖)。

结构式1：



另外，来自麦芽五糖的生成物Y，是葡萄糖基在麦芽五糖的非还原末端葡萄糖的6位羟基进行 α 键合的六糖，是结构式2表示的 α -异麦芽糖基葡萄四糖(别名， 6^5 -O- α -葡糖基麦芽五糖)。

结构式2：



由以上结果来看， α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶对麦芽低聚糖的作用判断如下。

(1)该酶与作为底物的由 α -1,4糖苷键构成的葡萄糖聚合度2以上的糖(麦芽低聚糖)作用，对具有将其非还原性末端的葡糖残基转移到其他分子的非还原性末端的葡糖残基的6位的作用的分子间6-葡糖基转移进行催化，生成在非还原末端有6-O- α -葡糖基的葡萄糖聚合度增加1的 α -异麦芽糖基葡萄糖(别名，6-O- α 葡糖基麦芽低聚糖)和葡萄糖聚合度减少1的麦芽低聚糖。

(2)该酶也稍催化4-葡糖基转移，由麦芽低聚糖生成极少量葡萄糖聚合度增加1的麦芽低聚糖和葡萄糖聚合度减少1的麦芽低聚糖。

实验例8：转移受体特异性

用各种糖进行是否可成为该酶的糖转移受体的试验。即，用D-葡萄糖、D-木糖、L-木糖、D-半乳糖、D-果糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-岩藻糖、L-山梨糖、L-鼠李糖、甲基- α -葡糖苷、甲基- β -葡糖苷、N-乙酰基-葡糖胺、山梨糖醇、 α ， α -海藻糖、异麦芽糖、异麦芽三糖、纤维二糖、龙胆糖、麦芽糖醇、乳糖、蔗糖、 α -环糊精、 β -环糊精或 γ -环糊精配制浓度1.6%的溶液(糖转移受体溶液)，然后加入作为糖供体的淀粉部分分解物(パインデックス#100)(浓度4%)，相对于每克

糖供给体固体物，分别加 1 单位来自 *Bacillus golbisporus* C9 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶或来自圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶，这 2 种酶分别是用实验例 2-1 的方法和实验例 4-1 的方法制得的，将其在 30℃、pH6.0 的条件下反应 24 小时。糖受体是单糖或二糖类时用气相色谱法（以下，简称“GLC 法”）、糖受体是三糖类以上时用 HPLC 法对酶反应后的反应液进行分析，确认各种糖受体是否由于该酶变成糖转移受体。另外。GLC 法中，GLC 装置用“GC-16A”（岛津制作所株式会社制）、色谱柱用 GL 科学株式会社制填充“2% 硅胶 OV-17/タクヨウモゾルブ W”的不锈钢制柱（3mmΦ×2m）、载气用氮气、流量 40ml/分、按 7.5℃/分的升温速度从 160℃ 升到 320℃，用氢焰离子检测器进行分析。HPLC 法中，HPLC 的装置用东曹株式会社制“CCPD”、色谱柱用“ODS-AQ-303”（YMC 株式会社制）、洗脱液用水、流速 0.5ml/分、用示差折射检测器进行分析。结果如表 13 所示。

表 13

糖类	糖转移生成物		糖类	糖转移生成物	
	C9 酶	C11 酶		C9 酶	C11 酶
D-葡萄糖	+	+	山梨糖醇	-	-
D-木糖	++	++	海藻糖	++	++
L-木糖	++	++	异麦芽糖	++	++
D-半乳糖	+	+	异麦芽三糖	++	++
D-果糖	+	+	纤维二糖	++	++
D-甘露糖	-	-	龙胆二糖	++	++
D-阿拉伯糖	±	±	麦芽糖醇	++	++
D-岩藻糖	+	+	乳糖	++	++
L-山梨糖	+	+	蔗糖	-	-
L-鼠李糖	-	-	α -环糊精	-	-
甲基- α -葡萄糖	++	++	β -环糊精	-	-
甲基- β -葡萄糖	++	++	γ -环糊精	-	-
N-乙酰基葡萄糖胺	+	+			

表中的

(-) 表示没测出转移到受体的糖转移物

(±) 表示虽测出转移到受体的糖转移物，但生成量低于 1%。

(+) 表示转移到受体的糖转移物在 1%以上、低于 10%。

(++) 表示转移到受体的糖转移物在 10%以上。

由表 13 的结果可以看出, α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶, 可利用各种糖作为糖转移受体, 尤其是具有有效转移成 D-木糖、L-木糖、甲基- α -葡糖昔、甲基- β -葡糖昔、 α , α -海藻糖、异麦芽糖、异麦芽三糖、纤维二糖、龙胆二糖、麦芽糖醇、乳糖及蔗糖, 其次也可以转移成 D-葡萄糖、D-果糖、D-岩藻糖、L-山梨糖及 N-乙酰基葡糖胺, 还可以转移成 D-阿拉伯糖作用的酶。

实验例 9: 由培养物配制环四糖

把淀粉部分分解物(商品名“パインデックス#1”松谷化学株式会社制)5w/v%、酵母提取物(商品名“スサヒミースト”, 朝日啤酒株式会社制)1.5w/v%、磷酸氢二钾0.1w/v%、磷酸二氢钠·12水盐0.06w/v%、硫酸镁·7水盐0.05w/v%及水所组成的液体培养基100ml加入到500ml容量的三角烧瓶中, 在高压锅中121℃杀菌20分钟、冷却后, 接种圆孢芽孢杆菌C9(FERM BP-7143), 在27℃, 230rpm条件下旋转振荡培养48小时后, 离心分离除去菌体, 获得培养上清液。再将该培养上清液进行高压热煮(120℃、15分钟), 放冷后, 离心分离除去不溶物回收上清液。把该上清液90ml调整到pH5.0、温度45℃后, 按每克固体物添加 α -葡糖昔酶(商品名“糖昔转移酶L(Z)”, 天野制药株式会社制)1,500单位和按每克固体物添加葡糖淀粉酶(ナガセ生物化学工业株式会社销售)75单位, 处理24小时, 然后用氢氧化钠把pH调整到12, 煮沸2小时, 分解残存的还原糖。过滤除去不溶物后, 用三菱化学制离子交换树脂(DiaionPK218)和(Diaion WA30)脱色、脱盐, 再用三菱化学制阳离子交换树脂(Diaion SK-1B)和有机制阴离子交换树脂(IRA411)再次脱盐, 用活性炭脱色、精密过滤后, 用蒸发器浓缩, 真空冷冻干燥成固体物, 制得约0.6g糖粉。本糖粉含有环四糖99.9%以上。

实验例 10: 环四糖的生成

利用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶的作用, 用各种糖进行环四糖生成试验。作为糖使用麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四

糖、麦芽五糖、直链淀粉、可溶性淀粉、淀粉部分分解物“商品名パインデックス#100”、松谷化学株式会社制)或糖原(来自牡蛎、和光纯药株式会社销售),分别配制成它们的水溶液。

在它们的水溶液(浓度0.5%)中,按每克固体物加入来自实验例4-1方法的圆孢芽孢杆菌C11的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶1单位和按每克固体物加入来自实验例4-4方法制得的圆孢芽孢杆菌C11的精制 α -异麦芽糖基转移酶10单位,在30℃、pH6.0的条件下使它们作用。作用条件按以下的4个体系进行。

(1)使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与各种糖作用24小时后,将酶热失活,然后、使 α -异麦芽糖基转移酶作用24小时后,使酶热失活。

(2)使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶作用24小时后,使酶热失活。

(3)只用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用24小时后,使酶热失活。

(4)只用 α -异麦芽糖基转移酶作用24小时后,使酶热失活。

为了弄清这些热失活的反应液中的环四糖的生成量,使用与实验例1同样的 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖淀粉酶进行处理,水解残存的还原性低聚糖,用HPLC法定量环四糖。结果如表14所示。

表 14

底物	环四糖生成量(%)			
	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用后, α -异麦芽糖基转移酶作用	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶同时作用	只用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用	只用 α -异麦芽糖基转移酶作用
麦芽糖	4.0	4.2	0.0	0.0
麦芽三糖	10.2	12.4	0.0	0.0
麦芽四糖	11.3	21.5	0.0	0.0
麦芽五糖	10.5	37.8	0.0	0.0
直链淀粉	3.5	31.6	0.0	0.0
可溶性淀粉	5.1	38.2	0.0	0.0
淀粉部分分解物	6.8	63.7	0.0	0.0
糖 原	10.2	86.9	0.0	0.0

由表14的结果可以看出,试验的任一种糖,在只用 α -异麦芽糖基

葡萄糖合成酶作用及只用 α -异麦芽糖基转移酶作用时，完全不生成环四糖，而合用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶生成环四糖。在使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用后再使 α -异麦芽糖基转移酶作用时，其生成量较低，大约为 11%以下，而 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶并用时，任一种糖的环四糖的生成量均提高，尤其是糖原增加到约 87%，淀粉部分分解物增加到约 64%。

该 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶并用生成环四糖的机理，从两种酶的反应特性来看估计如下。

(1) α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与糖原或部分分解物等的 α -1, 4 葡聚糖链的非还原末端葡萄糖基作用，使其葡萄糖基分子间转移到其他的 α -1, 4 葡聚糖链的非还原末端葡萄糖基的 6 位羟基上，生成非还原末端有 α -异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链。

(2) α -异麦芽糖基转移酶作用于非还原末端有异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链。使其异麦芽糖基分子间转移到其他的非还原末端有异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链的非还原末端葡萄糖基的 3 位羟基，生成非还原末端有异麦芽糖基-1, 3-异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链。

(3) 然后， α -异麦芽糖基转移酶作用于该非还原末端有异麦芽糖基-1, 3-异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链，通过分子内转移作用，将异麦芽糖基-1, 3-异麦芽糖基从 α -1, 4 葡聚糖链切断，环化后生成环四糖。

(4) 切断的 α -1, 4 葡聚糖链，再一次通过经(1)~(3)的反应，重新生成环四糖。推测由于 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶的并用，如上所述两种酶反复作用，使环四糖的生成量增加。

实验例 11：淀粉液化度的影响

使玉米淀粉配成浓度 15%的淀粉乳，在其中加入碳酸钙 0.1%调整到 pH6.0，按每克淀粉加入 α -淀粉酶（商品名“タマシ-60L”ノ木公司制）0.2~2.0%，在 95℃反应 10 分钟，然后在 120℃，高压煮 20 分钟，急冷到约 35℃、制得 DE3.2~20.5 的液化溶液，然后，按每克固形物加入精制 α -异麦芽转移酶 20 单位和精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 2 单位，它们分别来自实验例 4-4 制得的 *Bacillus glohisporns* C11 和来自

实验例 4-1 的方法制得的 *Bacillus glohisporus* C11，在 35℃ 反应 24 小时。在 100℃ 热处理 15 分钟使酶失活。接着，与实验例 1 同样地用 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖淀粉酶进行处理，水解残存的还原性低聚糖，用 HPLC 法定量环四糖。这些结果如表 15 所示。

表 15

单位淀粉相当的 α -淀粉酶使用量 (%)	DE	环四糖产率 (%)
0.2	3.2	54.5
0.4	4.8	50.5
0.6	7.8	44.1
1.0	12.5	39.8
1.5	17.3	34.4
2.0	20.5	30.8

由表 15 的结果可以看出，利用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与 α -异麦芽糖基转移酶生成环四糖中，因淀粉的液化程度的不同而受影响，液化程度越低，即，DE 值越低，则来自淀粉的环四糖的产率越高，相反，液化程度越高，即，DE 值越高，来自淀粉的环四糖的产率越低。具体地，可以看出淀粉的部分分解程度约 20 以下，优选 DE 约 12 以下，更优选 DE 约 5 以下的值。

实验例 12：淀粉部分分解物浓度的影响

配制淀粉部分分解物“バインデックス#100”(DE 约 2~5) 的最终浓度为 0.5~40% 的水溶液，按每克固体物加入精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 1 单位和精制 α -异麦芽糖基转移酶 10 单位，它们分别来自实验例 4-1 制得的 *Bacillus glonisporus* C11 和来自实验例 4-4 制得的圆孢芽孢杆菌 C11，合用两种酶，在 30℃、pH6.0 的条件下作用 48 小时后，在 100℃ 热处理 15 分钟，使酶失活。接着，与实验例 1 同样地使用 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖淀粉酶，水解残存的还原性低聚糖，用 HPLC 法定量环四糖，其结果如表 16 所示。

表 16

バインデックス濃度 (%)	環四糖生成量 (%)
0.5	63.6
2.5	62.0
5	60.4
10	57.3
15	54.6
20	51.3
30	45.9
40	39.5

由表 16 的结果可以看出，淀粉部分解物的浓度是 0.5% 的低浓度时，环四糖的生成量是约 64%，而浓度是 40% 的高浓度时，环四糖的生成量为约 40%，表明环四糖的生成量随作为底物的淀粉部分分解物浓度的不同而变化。从该结果可以看出，环四糖的生成量根据淀粉部分分解物的浓度而进行变化。

实验例 13；添加环糊精葡萄糖转移酶的作用

配制淀粉部分分解物“バインデックス#100”水溶液（浓度 15%），按每克固体物加入来自实验例 4-1 制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 1 单位，按每克固体物加入来自实验 4-4 制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基转移酶 10 单位，按每克固体物加入来自嗜热脂肪芽孢杆菌（Bacillus Stearothermophilus）的 CGTase 0~0.5 单位，合用两种酶，在 30℃、pH6.0 的条件下作用 48 小时后，在 100℃ 热处理 15 分钟使酶失活。接着，酶反应液用 α -葡萄糖苷酶（商品名：糖苷转移酶“アマノ”，天野制药株式会社制）和葡萄糖淀粉酶（メガセ生化学工业株式会社销售）水解残存的还原性低聚糖，用 HPLC 法定量环四糖。定量的结果如表 17 所示。

表 17

CGTase 添加量 (单位)	环四糖生成量 (%)
0	54. 6
2. 5	60. 1
5	63. 1
10	65. 2

由表 17 的结果可以看出，通过添加 CGTase，环四糖的生成量增加。

实验例 15：异麦芽糖游离酶的配制

将葡聚糖 3.0w/v%、胨 0.7w/v%、磷酸氢二钾 0.2w/v%、硫酸镁·7水盐 0.05w/v%及水组成的液体培养基 100ml 加入 500ml 容量三角烧瓶中，在高压锅中 121℃ 杀菌 20 分钟，冷却后，接种球形节杆菌 (*arthrobacter globiformis*, IAM12103)，把在 27℃、230rpm 条件下旋转振荡培养 48 小时的培养物作为种培养。把与种培养时相同组成的培养基约 20L 加入容量 30L 的发酵器中，加热杀菌，冷却到温度 27℃ 后，接种种培养液 1v/v%，边保持温度 27℃、pH6.0~8.0，边通气搅拌培养 72 小时。培养后，作为培养液中的异麦芽糖游离酶的异麦芽葡聚糖酶活性是约 16.5 单位/ml、测定离心分离 (10,000rpm、30 分钟) 后回收的上清液约 18L 的酶活性，结果该酶是约 16 单位/ml 的活性 (总活性约 288,000 单位)。异麦芽葡聚糖酶活性的测定是以含浓度为 0.1M 醋酸缓冲液 (pH5.5) 的浓度 1.25w/v% 葡聚糖水溶液 4ml 为底物溶液，向该底物液中加入酶液 1ml，在 40℃ 酶反应 20 分钟，取其反应液 1ml，将其加到索莫吉氏铜液 2ml 中，使反应停止后，用索莫吉-纳尔逊法定量生成的异麦芽糖的还原力。异麦芽葡聚糖酶的活性 1 单位定义为在上述条件下，1 分钟生成相当于 1 微摩尔异麦芽糖的还原力的酶量。用 UF 膜将培养上清液约 18L 浓缩成约 2L 后，用 80% 饱和硫酸铵液盐析，在 4℃ 放置 24 小时。离心分离 (10,000rpm, 30 分钟)、回收其盐析沉淀物，溶解在 5mM 磷酸缓冲液 (pH6.8) 中后，对该缓冲液进行透析，获得粗酶液约 400ml。将该粗酶液供使用“Sepabeads FP-DA13”凝胶的离子交换色谱法 (凝胶量 2L) 用。异麦芽

葡聚糖酶活性不吸附在“SepabeadsFP-DA 13”凝胶上，而随非吸附组分洗脱。回收该活性成分，用80%饱和硫酸铵液进行盐析，在4℃放置24小时。离心分离(10,000rpm 30分钟)、回收其盐析沉淀物，溶解在5mM磷酸缓冲液(pH6.8)中后，对该缓冲液进行透析，获得含 α -异麦芽葡聚糖酶活性161,000单位的部分精制酶液约500ml。

实验例16：来自 α -异麦芽糖基葡萄糖及环四糖的异麦芽糖的配制

在最终固形物浓度0.2%的6- α -葡糖基麦芽糖、 α -异麦芽糖基麦芽糖、 α -异麦芽糖基三糖、 α -异麦芽糖基四糖或环四糖水溶液中，按每克固形物加入用实验例15的方法制得的异麦芽葡聚糖酶100单位(环四糖的情况下，为100单位或3000单位)，在40℃、pH5.5的条件下作用24小时，在100℃保持20分钟，停止反应。用HPLC法测定该酶反应液的糖组成。HPLC在使用“MCIGEL CK04SS”柱(三菱化学株式会社制)，柱内温度80℃，作为洗脱液的水的流速0.5ml/min的条件下进行测定，检测使用示差折射检测器“RI-8012”(东曹株式会社制)进行，其结果如表18所示。

表 18

底物	酶量 (单位)	反应生成的糖(HPLC 面积%)					
		G1	IM	G2	G3	G4	A
IMG1	100	35	65	0	0	0	0
IMG2	100	0	51	49	0	0	0
IMG3	100	0	41	0	59	0	0
IMG4	100	0	35	0	0	65	0
环四糖	100	0	22	0	0	0	78
	3000	0	100	0	0	0	0

表中，IMG1、IMG2、IMG3、IMG4分别意味着6- α -葡糖基麦芽糖、 α -异麦芽糖基麦芽糖、 α -异麦芽糖三糖、异麦芽糖四糖，G1、IM、G2、G3、G4分别意味着葡萄糖、异麦芽糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖，A意味着在由环四糖生成异麦芽糖过程中的中间体。

由表18的结果可以看出，使异麦芽葡聚糖酶作用与 α -异麦芽糖基

葡萄糖的结果是，由作为底物的 $6-\alpha$ -葡萄糖基麦芽糖只生成葡萄糖和异麦芽糖，由作为底物的 α -异麦芽糖基麦芽糖只生成异麦芽糖和麦芽糖，由作为底物的 α -异麦芽糖基三糖只生成异麦芽糖和麦芽三糖，由作为底物的 α -异麦芽糖基四糖只生成异麦芽糖和麦芽四糖。另外，也看出由作为底物的环四糖，以生成物 A 作为中间体，只生成异麦芽糖。

然后，对生成物 A 进行精制与分离，它是来自作为底物的环四糖的中间体。即，通过采用制备用 HPLC 柱“YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A”（YMC 株式会社制）精制，分离生成物，从来自上述环四糖的反应物中，分离出纯度 98.2% 以上的生成物 A，固体物收率约 7.2%。

对生成物 A 按照常用方法进行甲基化分析和 NMR 分析。甲基化分析结果归纳于表 19。有关 NMR 分析结果，“ $^1\text{H-NMR}$ 光谱如图 21 所示。 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱如图 22 所示。将这些的归属归纳于表 20。

表 19

分析甲基化物的种类	组成比
2, 3, 4-三甲基化物	2.00
2, 4, 6-三甲基化物	0.92
2, 3, 4, 6-四甲基化物	0.88

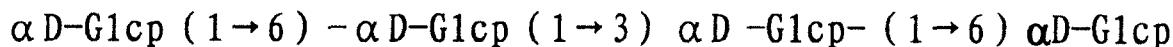
表 20

葡萄糖序号	碳序号	NMR 化学位移值 (ppm)
a	1a	100.7
	2a	74.2
	3a	75.8
	4a	72.3
	5a	74.5
	6a	63.2
b	1b	102.1
	2b	74.3
	3b	75.9
	4b	72.6
	5b	74.2
	6b	68.0
c	1c	100.6
	2c	72.8
	3c	83.0
	4c	72.0
	5c	73.1
	6c	62.9
e	1e	94.9 (α), 98.8 (β)
	2e	74.1 (α), 76.6 (β)
	3e	75.8 (α), 78.7 (β)
	4e	72.1 (α), 72.1 (β)
	5e	72.6 (α), 76.9 (β)
	6e	68.3 (α), 68.3 (β)

由这些的结果可以看出，生成物 A 即，采用异麦芽葡聚糖酶由环四糖生成异麦芽糖时的中间体，是环四糖的 α -1, 3 糖苷键的任一个水解开环的四糖类，是结构式 (3) 所示的 α -葡糖基- (1 \rightarrow 6) - α -葡糖基- (1

$\rightarrow 3) - \alpha - \text{葡萄糖基} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - \text{葡萄糖}$ (开环四糖)。

结构式 3:



由以上的结果判断异麦芽葡聚糖酶对 α -异麦芽糖基葡萄糖的作用如下。

异麦芽葡聚糖酶作用于作为底物的非还原末端有 $6-0-\alpha$ -葡萄糖基的 α -异麦芽糖基葡萄糖，特异性地水解其非还原性末端的异麦芽糖基残基和葡萄糖(麦芽低聚糖)残基间的 $\alpha-1,4$ 糖苷键，生成异麦芽糖和葡萄糖(麦芽低聚糖)。另外，异麦芽葡聚糖酶也作用与作为底物的环四糖，水解其 $\alpha-1,3$ 糖苷键，开环后生成作为中间体的开环四糖，再作用与开环四糖，水解其 $\alpha-1,3$ 糖苷键，生成异麦芽糖。

实验例 17：由各种底物生成异麦芽糖

使用各种糖，对在 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶及异麦芽葡聚糖酶的作用下生成异麦芽糖进行试验。即，用麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖、直链淀粉或淀粉部分分解物(商品名 バインデックス#100，松谷化学株式会社制)和氯化钙，分别配制使水溶液的糖最终浓度为 5%，氯化钙最终浓度为 1mM。然后，按每克固形物加入来自实验例 4-1 所制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 0.2 单位和按每克固形物加入来自实验例 15 的方法所制得的异麦芽葡聚糖酶 100 单位，使它们在 40℃、pH5.5 的条件下反应。反应条件用下述 2 种体系进行。

(1) 使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与糖类作用 65 小时后，使酶热失活，接着，使异麦芽葡聚糖酶作用 65 小时后，使酶热失活。

(2) 将 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡聚糖酶并用，与糖类作用 65 小时后，使两种酶加热失活。然后，用 HPLC 法定量加热处理的酶反应液中的异麦芽糖生成量。定量的结果如表 21 所示。

表 21

底物	异麦芽糖生成量 (%)	
	α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用后，异麦芽葡萄聚糖酶作用	并用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡萄聚糖酶
麦芽糖	6.6	7.0
麦芽三糖	15.7	18.7
麦芽四糖	15.8	45.4
麦芽五糖	15.3	55.0
麦芽六糖	10.1	58.1
麦芽七糖	8.5	63.6
直链淀粉	4.0	64.9
淀粉部分分解物	3.8	62.7

由表 21 的结果可以看出，通过 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶和异麦芽葡萄聚糖酶的作用，可由试验的任一种糖生成异麦芽糖。在使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用后再使异麦芽葡萄聚糖酶作用时，其生成量较低，约为 15%以下。而将 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡萄聚糖酶共同作用时，由任一种糖生成异麦芽糖的生成量提高，尤其是，麦芽五糖、直链淀粉、淀粉部分分解物，其异麦芽糖生成量增加到 60%以上。该 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡萄聚糖酶并用的异麦芽糖的生成机理，从两种酶的反应特性来看估计如下。

(1) α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶作用于直链淀粉或淀粉部分分解物等的 α -1, 4 葡聚糖链的非还原末端葡萄糖基，使该葡萄糖基分子间转移到其他的 α -1, 4 葡聚糖链的非还原末端葡萄糖基的 6 位羟基，生成非还原末端有 α -异麦芽糖基的 α -1, 4 葡聚糖链。

(2) 异麦芽葡萄聚糖酶作用于非还原末端有异麦芽糖基的 α -1, 4-葡聚糖链，水解该异麦芽糖基与 α -1, 4 葡聚糖链间的 α -1, 4 糖苷键，生成异麦芽糖和葡萄糖聚合度减少 2 的葡聚糖链。

(3) 切断的 α -1, 4 葡聚糖链，再一次通过(1)~(2)的反应重

新生成异麦芽糖。由于并用 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡聚糖酶，如上所述，两种酶反复作用，使异麦芽糖的生成量增加。

实验例 18：添加异淀粉酶的作用

配制淀粉部分分解物“バインデックス#100”水溶液（最终浓度 5%，含有 1mM 氯化钙），按每克淀粉加入来自实验例 4-1 所制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 0.2 单位、按每克淀粉加入来自实验例 15 所制得的异麦芽葡聚糖酶 100 单位和按每克淀粉加入来自介支淀粉假单胞菌（*Pseudomonas amyloferamosas*）的异淀粉酶（林原生物化学研究所株式会社制）0~250 单位，在 40℃，pH5.5 的条件下并用，作用 65 小时后，在 100℃热处理 15 分钟使酶失活。用 HPLC 法定量生成的异麦芽糖，定量的结果如表 22 所示。

表 22

异淀粉酶添加量（单位）	异麦芽糖生成量（%）
0	62.7
50	65.1
250	71.1

由表 22 的结果可以看出，通过添加异淀粉酶，异麦芽糖的生成量增加。

实验例 19：淀粉部分分解物浓度的影响

配制浓度不同的 8 种淀粉部分分解物“バインデックス#100”（DE 约 2~5）的水溶液（最终浓度 1~40% 的水溶液，含有 1mM 的氯化钙），相对于每克固体分别加入来自实验例 4-1 所制得的球孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 0.2 单位，实验例 15 的方法所制得的异麦芽葡聚糖酶 100 单位，来自介支淀粉假单胞菌的异淀粉酶（林原生物化学研究所制）250 单位，在 40℃、pH5.5 的条件下并用，作用 65 小时后，在 100℃热处理 15 分钟使酶失活。用 HPLC 法定量生成的异麦芽糖。定量的结果如表 23 所示。

表 23

パインデックス濃度 (%)	异麦芽糖生成量 (%)
1	73.0
2.5	72.8
5	71.1
10	67.0
15	63.7
20	60.7
30	55.4
40	50.7

由表 23 的结果可以看出，淀粉部分分解物的浓度是 1% 的低浓度时，异麦芽糖的生成量是约 73%，而浓度 40% 的高浓度时，异麦芽糖的生成量为约 51%，异麦芽糖的生成量随作为底物的淀粉部分分解物的浓度而进行变化。

实验例 20：淀粉液化程度的影响

将玉米淀粉配制成为浓度 15% 的淀粉乳，在其中加入碳酸钙 0.1%，调整到 pH6.0，按每克淀粉加入 α -淀粉酶（商品名“ターマミール 60L”）（本公司制）0.2~2.0%，在 95℃ 反应 10 分钟，然后在 120℃ 高压热煮，急冷到约 40℃，制得 DE3.2~20.5 的液化溶液，然后调整到最终淀粉浓度为 5%、pH5.5 后，相对于每克固体物加入来自实验例 4-1 所制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶标准品 0.2 单位、相对于每克固体物加入来自实验例 15 的方法所制得的异麦芽聚糖酶 100 单位和相对于每克固体物来自介支淀粉假单胞菌的异淀粉酶（林原生物化学研究所株式会社制）250 单位，在 40℃ 反应 65 小时。在 100℃ 热处理 15 分钟使酶失活。用 HPLC 法定量生成的异麦芽糖。定量的结果如表 24 所示。

表 24

α -淀粉酶使用量(每克淀粉的% (w/w))	DE	异麦芽糖产率 (%)
0.2	3.2	71.5
0.4	4.8	71.0
0.6	7.8	66.2
1.0	12.5	59.8
1.5	17.3	53.2
2.0	20.5	47.9

由表 24 的结果可以看出，在 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡聚糖酶作用下，异麦芽糖产率受淀粉液化度的影响，液化程度愈低，即，DE 值愈低，来自淀粉的异麦芽糖的产率愈高。反之，液化程度愈高，即，DE 值愈高，来自淀粉的异麦芽糖的产率愈低。具体地，淀粉部分分解的程度为 DE 约 20 以下，优选 DE 约 12 以下，更优选 DE 约 5 以下。

实验例 23：添加环糊精葡糖转移酶与葡糖淀粉酶的作用

配制淀粉部分分解物“バインデックス#100”水溶液(最终浓度 20%，含有 1mM 氯化钙)，相对于每克淀粉加入来自实验例 4-1 所制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 0.2 单位、相对于每克固形物加入来自实验例 15 的方法所制得的异麦芽葡聚糖酶 100 单位、相对于每克淀粉加入来自介支淀粉假单胞菌的异淀粉酶(林原生物化学研究所计株式会社制) 250 单位和来自嗜热脂肪芽孢杆菌的 CGTase(林原生物化学研究所株式会社制) 0~0.5 单位，并用这些酶，在 40℃、pH5.5 的条件下作用 65 小时，在 100℃热处理 15 分钟使酶失活。接着，相对于每克淀粉加入葡糖淀粉酶(商品名“XL-4”，ナガセ生化学工业株式会社制) 20 单位，在 50℃作用 24 小时后，在 100℃热处理 20 分钟使酶失活。用 HPLC 法定量生成的异麦芽糖。定量的结果如表 25 所示。

表 25

CGTase 添加量 (每克淀粉的单位数)	异麦芽糖生成量 (%)
0	60.7
0.1	62.9
0.25	65.0
0.5	66.4

由表 25 的结果可以看出，在 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶与异麦芽葡聚糖的酶反应体系中，通过添加 CGTase，异麦芽糖的生成量增加。再者，为了从在 CGTase 存在下生成的、异麦芽糖上键合了 1 个以上的 D-葡萄糖残基的糖类上游离 D-葡萄糖残基，再生成异麦芽糖，使用前述葡糖淀粉酶。

以下，在实施例 A 及实施例 B 中，对本发明的异麦芽糖或异麦芽糖高含量物的制备方法及其用途进行详细的进行说明。

实施例 A-1

把来自玉米的植物葡糖昔（フイトグリコーゲン）（キユーピー株式会社制）的水溶液（约 100L）调整到浓度 4w/v%、pH6.0，温度 30℃后，按每克淀粉加入来自实验例 4-1 的方法制得的圆孢芽孢杆菌 C11 的精制 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 1 单位和按每克淀粉加入来自实验例 4-4 的方法制得的精制 α -异麦芽糖基转移酶 10 单位，反应 48 小时后，在 100℃热处理 10 分钟使酶失活。取该酶反应液的一部分，用 HPLC 法测定环四糖的生成量，结果糖组成是约 84%。HPLC 法用“ShodexKS-801 柱”（昭和电工株式会社制），在柱温度 60℃，流速 0.5ml/分的水的条件下进行测定，用示差折射检测器“RI-8012”（东曹株式会社制）进行检测。把该酶反应液调整到 pH5.0、温度 45℃后，按每克淀粉加入 α -葡糖昔酶（商品名“糖昔转移酶”アマノ，天野酶株式会社制）1500 单位和葡糖淀粉酶（商品名“XL-4”，ナガセ生化学工业株式会社制）75 单位，反应 24 小时，水解残存的还原性低聚糖等，再用氢氧化钠将 pH 调整到 5.8，在温度 90℃下保持 1 小时使酶失活，然后滤去不溶物。用反渗透膜（商品

名“木口セブ HR5155PI”，东洋纺织株式会社制)把该滤液浓缩到固体成分浓度约 16%后，按照常规方法，通过脱色、脱盐、过滤、浓缩，制得含固体成分约 3,700g 的糖液约 6.2kg。把本糖液供填充离子交换树脂(商品名“アンバーライト CR-1310 (Na⁺型) 型”、有机公司制)的柱(凝胶量约 225L)用，在柱温 60℃、流速约 45L/h 的条件下进行色谱分离。用前述 HPLC 法监控洗脱液的糖组成，回收环四糖纯度 98%以上的组分，按照常规方法将其进行脱盐、脱色、过滤、浓缩，制得含固体成分约 2500g 的糖液约 7.5kg。用 HPLC 法测定本糖液的糖组成，结果环四糖的纯度是约 99.5%。用蒸发器将制得的含环四糖液浓缩到浓度约 50%后，把该浓缩液约 5kg 加到圆筒状塑料容器中，边慢慢旋转边用约 20 小时使温度从 65℃降到 20℃，晶析环四糖。接着，用离心过滤器进行分离，回收环四糖，结晶湿重量 1360g，再在 60℃干燥 3 小时，制得环四糖结晶粉末 1170g，用 HPLC 法测定本结晶粉末的糖组成，结果环四糖结晶粉末的纯度在 99.9%以上，纯度极高。

然后，将前述环四糖结晶粉末溶解于去离子水中，调整到浓度 1%、pH5.5、温度 50℃后，按每克固体物加入实验例 15 的方法配制的异麦芽糖基葡聚糖酶 500 单位，在 pH5.5、温度 50℃下反应 70 小时。在 95℃加热保持 10 分钟后，冷却，把过滤获得的滤液按常规方法，用活性炭脱色，用 H 型及 OH 型离子交换树脂脱盐精制，再浓缩到浓度约 75%，制得糖浆状异麦芽糖高含量物，每克固体物的收率是约 95%。

本品是固体时，含有异麦芽糖 96.1%，开环四糖 2.8%及其他糖 1.1%。本品由于具有难结晶性良好的保湿性、低甜味性、浸透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖晶析性、难发酵性、防淀粉老化性等。利于在各种饮食品、健康食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等中使用。

实施例 A-2

把实施例 A-1 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物供使用强酸性阳离子交换树脂(商品名“アンバーファイト CR-1310”、Na⁺型、有机株式

会社制)的柱色谱法用。即,把前述树脂填充在10根内径12.5cm带夹套的不锈钢制柱中,将这些柱串联连接使树脂总长为16米。将柱内温度保持在40℃,相对于树脂量加前述糖浆1.5v/v%,向其中通40℃的温水,以SV0.2进行分离,边用HPLC法监控洗脱液的糖组成,边收集异麦芽糖高含量组分,将其进行精制,获得异麦芽糖高含量液体。每单位异麦芽糖固体物的收率约是80%。按照常规方法,将该液进行脱色,脱盐、浓缩,制得浓度约75%的糖浆状异麦芽糖高含量物。

本品的每单位固体物含有99.9%以上极高纯度的异麦芽糖。本品由于具有难结晶性良好的保湿性、低甜味性、浸透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖晶析性、难发酵性、防淀粉老化性等,利于在各种饮食品、健康食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等中使用。

实施例A-3

把木薯淀粉制成浓度约20%的淀粉乳,在其中加入碳酸钙0.1%,调整到pH6.5,按每克淀粉加入 α -淀粉酶(商品名“ターマーL 60L,ノホリ公司制)0.3%,在95℃反应15分钟,然后在120℃高压热煮20分钟,再急冷到约40℃制得DE约4的液化溶液,按每克淀粉向其中加入实验例2-1的方法所制得的 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶0.2单位、实验例15的方法制得的异麦芽葡聚糖酶100单位,异淀粉酶(林原生物化学研究所株式会社制)250单位、CGTase(林原生物化学研究所株式会社制)0.5单位,在pH5.5、温度40℃下反应64小时。在95℃将该反应液保持30分钟后,调整到温度50℃后,按每克固体物加入葡萄糖淀粉酶剂(商品名“グルコチム”ナガセ生化学工业株式会社制)10单位,反应24小时,将该反应液加热到95℃保持30分钟后,冷却,按照常规方法,把过滤获得的滤液用活性炭脱色、用H型及OH型离子交换树脂脱盐精制,再浓缩,干燥、粉化、造粒,制得颗粒状异麦芽糖高含量物,单位固体物的收率是约95%。

本品含有葡萄糖11.0%,异麦芽糖66.5%,其他的二糖类2.4%、三糖

类以上的为 20.1%。本品由于具有良好的保湿性、低甜味性、浸透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖晶析性、难发酵性、防淀粉老化性等，利于在各种饮食品，健康食品，饲料，饵料、化妆品、医药品、嗜好品等中使用。

实施例 A-4

按照实验例 1 的方法，把圆孢芽孢杆菌 C9 (FERM BP-7143) 在发酵器中培养 48 小时。培养后，用 SF 膜除菌过滤，回收约 18L 的培养滤液，再将该滤液进行 UF 膜浓缩，回收含有 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶 8.8 单位/ml 和 α -异麦芽糖基转移酶 26.7 单位/ml 的浓缩酶液约 1L。把玉米淀粉制成浓度约 27% 的淀粉乳，向其中加入碳酸钙 0.1%，调整到 pH6.5，按每克淀粉加入 α -淀粉酶(商品名“タ-マニ-ル 60L”，ノボ公司制)0.3%，在 95℃ 反应 15 分钟，然后，在 120℃ 高压热煮 20 分钟，再急冷到约 40℃，制得 DE 约 4 的液化溶液，向其中按每克淀粉加入含上述 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶和 α -异麦芽糖基转移酶的浓缩酶液，使之成为 0.25ml 的比例，再按每克淀粉加入实验例 15 的方法制得异麦芽葡聚糖酶 100 单位- α -异淀粉酶（林原生物化学研究所株式会社制）250 单位和 CGTase（林原化学研究所株式会社制）0.5 单位，在 pH5.5，温度 40℃ 下反应 70 小时。将该反应液在 95℃ 加热保持 10 分钟后，温度调节到 50℃ 后，按每克淀粉加入葡萄糖淀粉酶剂（商品名“グルコチ-ム”ナガセ生化学工业株式会社制）20 单位，反应 24 小时，将该反应液在 95℃ 加热保持 30 分钟后，冷却，过滤，按常规方法将得到的滤液用活性炭脱色，用 H 型及 OH 型离子交换树脂脱盐精制，再浓缩，得到浓度 75% 的糖浆状异麦芽糖高含量物，单位固形物的收率是约 95%。

本品单位固形物含有葡萄糖 32.6%，异麦芽糖 59.4%，其他的二糖类 1.2%，三糖类以上为 6.8%。本品由于具有难结晶性良好的保湿性、低甜味性、渗透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖晶析性、难发酵性、防淀粉老化性，利于在各种饮食品，健康食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等中使用。

实施例 A-5

将实施 A-4 的方法制得的含麦芽糖糖浆为原糖液，为了提高异麦芽糖的含量，按照实施例 A-2 的方法进行盐型强酸性阳离子交换树脂的柱色谱法后，收集异麦芽糖高含量组分，将其进行精制、浓缩，制得异麦芽糖高含量糖浆，单位固形物的收率是约 60%。

本品单位固形物含有葡萄糖 4.8%，异麦芽糖 85.3%，其他的二糖类 3.9%，三糖类以上为 6.0%，本品由于具有难结晶良好的保湿性，低甜味性、渗透压调节性、赋形性，赋亮泽性，保湿性、粘性、防止糖晶析性、难发酵性、防淀粉老化性，利于在各种饮食品，健康食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等中使用。

实施例 B-1：甜味剂

在采用实施例 A-1 的方法制得的粉末状异麦芽糖高含量物 0.8 重量份中，均匀地混合海藻糖含水结晶（注册商标“トレハ”、林原商事株式会社销售）0.2 重量份、 α -葡糖基蛇菊苷（商品名“ α G シイ-ト”，东洋精糖株式会社销售）0.01 重量份及 L-天冬氨酸基-L-苯丙氨酸甲酯（商品名“アスパルテ-ム”）0.01 重量份，均匀混合，加到颗粒成型机中制得颗粒状甜味剂。本品甜味的品质好，有大约 2 倍蔗糖的甜味度，本品是含有具有难结晶性良好的保湿性、低甜味性的异麦芽糖的低甜味料组合物。另外，本品在室温保存下稳定，没有变质劣化的问题。

实施例 B-2 硬糖

在浓度 55% 蔗糖溶液 100 重量份中混合用实施例 A-2 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 50 重量份，加热混合，然后在减压下加热浓缩到水分 2% 以下，与柠檬酸 0.6 重量份及适量的柠檬香料和着色料混合，按照常规方法成型，制得制品。本品是齿咬感、味道、风味均良好，也没有出现蔗糖晶析，吸湿性少，稳定，高质量的硬糖。

实施例 B-3：口香糖

把胶料 3 重量份加热熔融到柔软的程度，然后加入无水结晶麦芽糖醇 2 重量份，木糖醇 2 重量份，用实施例 A-5 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 2 重量份及海藻糖含水结晶 1 重量份，再与适量的香料和着色料混合，按常规方法用滚筒捏合、成型、包装，制得制品。本品质地、味道、风味良好，优选作为低蚀性、低热量的口香糖。

实施例 B-4：粉末肽

在 40% 食品用大豆肽溶液（商品名ハイニコート S，不二制油株式会社销售）1 重量份中混合实施例 A-4 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 2 重量份，放到塑料大桶中，在 50℃ 减压干燥，粉碎后制得粉末肽。本品风味良好，不仅优选作为プレミックス（premix）、冰点等的低热量制果材料使用，也优选作为经口流食、经管流食用的难消化性的食物纤维、整肠材料、健康食品材料使用。

实施例 B-5：浴用剂

相对于柚皮汁 1 重量份，按实施例 A-3 的方法制得的颗粒状异麦芽糖高含量物 10 重量份及环四糖 1 重量份的比例进行混合，粉化后制得含有柚皮汁的异麦芽糖粉末。

在该粉末 5 重量份中混合烧碱 90 重量份、海藻糖含水结晶 2 重量份，二氧化硅 1 重量份及 α -葡糖基橙皮苷（商品名“ α G ヘスペリシン”、林原株式会社销售）0.5 重量份，制备浴用剂。

本品柚香郁浓，可在洗澡水中稀释到 100-10000 倍使用，是洗澡后使皮肌湿润光滑，不觉得水冷的高品质的浴用剂。

实施例 B-6：化妆用乳膏

将单硬脂酸聚氧乙二醇 2 重量份，自乳化型单硬脂酸甘油脂 5 重量份，实施例 A-2 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 2 重量份， α -葡糖基芸香苷（商品名 α G ルチン、林原株式会社销售）1 重量份，液体石

蜡 1 重量份，三辛酸甘油酯 10 重量份与适量的防腐剂，按常规方法加热溶解，然后加 L-乳酸 2 重量份、1, 3-丁二醇 5 重量份与精制水 66 重量份，加到均化器中乳化，再加适量的香料搅拌混合，制得化妆用雪花膏。本品有抗氧化性，稳定性高，高效防晒、可优选作为美肤剂，增白剂使用。

实施例 B-7：牙膏

把磷酸氢钙 45 重量份、月桂基硫酸钠 1.5 重量份、甘油 25 重量份、聚氧乙烯山梨糖醇酐月桂酯 0.5 重量份、实施例 A-5 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 15 重量份、糖精 0.02 重量份、防腐剂 0.05 重量份与水 13 重量份混合制得牙膏。本品不降低表面活性剂的洗涤力，改进难闻味道、使用后感觉也良好。

实施例 B-8：流食用固体制剂

配制由实施例 A-1 的方法制得的粉末状异麦芽糖高含量物 100 重量份、海藻糖含水结晶 200 重量份，麦芽四糖高含量粉末 200 重量份、粉末蛋黄 270 重量份，脱脂奶粉 209 重量份，氯化钠 4.4 重量份、氯化钾 1.8 重量份，硫酸镁 4 重量份、硫胺素 0.01 重量份，抗坏血酸钠 0.1 重量份，维生素 E 乙酸酯 0.6 重量份及烟酰胺 0.04 重量份组成的组合物，每 25 克该组合物填充到防潮性复合小袋中，密封制得制品。

本品是整肠作用好的流食。把 1 袋溶解在约 150-300ml 的水中，配成流食，人优选通过经口、或通过管经鼻腔、胃、肠等使用方法利用、可有效地用于补充身体的能量。

实施例 B-9：片剂

在阿斯匹林 50 重量份中充分混合实施例 A-2 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 14 重量份、玉米淀粉 4 重量份后，按照常规方法，用打片机打片，制得厚 5.25mm，每片 680mg 的片剂。

本品是利用异麦芽糖的赋形性的制品，无吸湿性、物理强度也好，

而且非常容易在水中崩解。

实施例 B-10：糖衣片

以重 150mg 的基片为芯剂，用实施例 A-1 的方法制得的粉末状异麦芽糖高含量物 40 重量份、聚麦芽三糖（プルラン）（平均分子量 20 万）2 重量份、水 30 重量份、滑石 25 重量份与氧化钛 3 重量份组成的片包衣液、进行包糖衣，使片剂重量达到约 230mg，然后，用环四糖结晶粉末 65 重量份、聚麦芽三糖 1 重量份及水 34 重量份组成的包衣液进行糖衣，再用蜡液抛光，得到有光泽的外观好的糖衣片。本品耐冲击性好，长时间保持高品质。

实施例 B-11：外伤治疗用药膏

在实施例 A-5 的方法制得的糖浆状异麦芽糖高含量物 100 重量份与麦芽糖 300 重量份中，加入溶解有碘 3 重量份的甲醇 50 重量份，进行混合，再加入 10w/v% 聚麦芽三糖水溶液 200 重量份，进行混合，制得适度的延展有粘附性的外伤治疗用药膏，本品由于异麦芽糖可防止碘、甲醇的挥发，是经时变化少、商品价值高的药膏。

此外，本品不仅利用碘有杀菌作用，而且因麦芽糖也作为用作为对细胞的能量补充剂，故缩短治疗时间，很好地治疗创伤面。

如以上所说明，本发明涉及异麦芽糖的新型制备方法及其用途，更详细地讲，其特征在于，在没有或有 α -异麦芽糖基转移酶的存在下，使 α -异麦芽糖基葡萄糖合成酶，与作为非还原末端的键合方式有 α -1, 4 葡糖苷键的葡萄糖聚合度 2 以上的糖类作用，生成作为非还原性末端的键合方式有 α -1, 6 葡糖苷键，作为该非还原性末端以外的键合方式有 α -1, 4 葡糖苷键的葡萄糖聚合度 3 以上的 α -异麦芽糖基葡萄糖、和/或环状 $(\rightarrow 6)-\alpha-D-\text{吡喃葡萄糖基}-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-\text{吡喃葡萄糖基}-(1\rightarrow 6)-\alpha-D-\text{吡喃葡萄糖基}-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-\text{吡喃葡萄糖基}-(1\rightarrow)$ ，然后使异麦式糖游离酶作用，生成异麦芽糖，收集该生成的异麦芽糖，在该业界可在工业上大量且价廉而高收率地制得有用的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物。由这

样的本发明制得的异麦芽糖及异麦芽糖高含量物，由于具有难结晶性、良好的保湿性、低甜味性、渗透压调节性、赋形性、赋亮泽性、保湿性、粘性、防糖析晶性、难发酵性、防淀粉老化性等，利于在各种饮食品、健康食品、饲料、饵料、化妆品、医药品、嗜好品等领域中使用。

本发明是具有如此显著作用效果的发明，是对该业界有极大意义的发明。

序列列表

<110> 株式会社林原生物化学研究所

<120> 异麦芽糖的制备方法及用途

<130> WO899

<150> JP 130,922/01

<151> 2001-4-27

<160> 2

<210> 1

<211> 5234

<212> DNA

<213> 微生物

<220>

<221> CDS

<222> (877)...(4731)

<400> 1

atctaccgtt	ttttgtgaag	tttggcagta	ttcttcgat	gaatttgaac	gchgcaatata	60										
aagtggcg	gaccattggc	aacagcttg	cggactacac	aatctcg	ttccgcattt	120										
atccgcttgg	gacaacaacg	tacgactgga	atgatgat	tggcggtcg	gtgaaaacca	180										
taacttctac	agagcaat	gggttgaata	aagaaaccgt	gactgttcca	gcgattaa	240										
ctaccaagac	attgcaagt	tttacgacta	agccccc	tgttaacggt	ggtggttct	300										
tgatgacaga	gtacagtact	ttaactgcc	taacgggagc	gtcgacaggc	tggtaactat	360										
atactgtaca	gaaattcact	tacgtcaagc	ttgggttcaag	tgcatactg	caatccgtt	420										
tgctaaatgg	cgttaataag	gtggaaatat	aagcagaatt	cggcgtgca	agcggcg	480										
caacgaacac	gaaccatgca	ggttatact	gtacaggatt	tgtggacggc	tttggagact	540										
ttggagacaa	tgttgctt	ttt	gatgttcc	tcaaagccgc	aggtaactat	600										
ttcggtattc	atccgggt	gca	ggcaatgg	ctatgt	aatccaaag	660										
tgacggacct	tgccttgc	caaaca	caa	gctggata	atggggact	720										
gcgtctcg	ct	gat	gat	gtc	ctatgtat	780										
ttggcattaa	tttcgataa	ac	atcg	gatt	accagg	840										
cctcccttaa	tttcta	atcg	aaagg	gagta	tcctt	876										
atg	cgt	cca	cca	aac	aaa	924										
Met	Arg	Pro	Pro	Asn	Glu	Ile	Pro	Arg	Ile	Leu	Ala	Phe	Phe	Thr		
1	5	10	15													
gcg	ttt	acg	ttg	ttt	ggt	tca	acc	ctt	gcc	ttg	ctt	cct	gct	ccg	cct	972
Ala	Phe	Thr	Leu	Phe	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	
20	25															

gct cat gcc tat gtc agc agc cta gga aat ctc att tct tcg agt gtc			1020
Ala His Ala Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile Ser Ser Ser Val			
35	40	45	
acc gga gat acc ttg acg cta act gtt gat aac ggt gct gag ccg agt			1068
Thr Gly Asp Thr Leu Thr Val Asp Asn Gly Ala Glu Pro Ser			
50	55	60	
gat gac ctc ttg att gtt caa gca gtc gaa aac ggt att ttg aag gtc			1116
Asp Asp Leu Leu Ile Val Gln Ala Val Gln Asn Gly Ile Leu Lys Val			
65	70	75	80
gat tat cgt cca aat agc ata acg ccg agc gct aag acg ccg atg ctg			1164
Asp Tyr Arg Pro Asn Ser Ile Thr Pro Ser Ala Lys Thr Pro Met Leu			
85	90	95	
gat ccg aac aaa act tgg tca gct gta gga gct acg att aat acg aca			1212
Asp Pro Asn Lys Thr Trp Ser Ala Val Gly Ala Thr Ile Asn Thr Thr			
100	105	110	
gcc aat cca atg acc atc acg act tcc aat atg aag att gag att acc			1260
Ala Asn Pro Met Thr Ile Thr Thr Ser Asn Met Lys Ile Glu Ile Thr			
115	120	125	
aag aat cca gta cga atg acg gtc aag aag gct gac ggc act acg cta			1308
Lys Asn Pro Val Arg Met Thr Val Lys Lys Ala Asp Gly Thr Thr Leu			
130	135	140	
ttc tgg gaa cca tca ggc gga ggg gta ttc tca gac ggt gtg cgc ttc			1356
Phe Trp Glu Pro Ser Gly Gly Val Phe Ser Asp Gly Val Arg Phe			
145	150	155	160
ctt cat gcc aca ggg gat aat atg tat ggc atc cgg agc ttc aat gct			1404
Leu His Ala Thr Gly Asp Asn Met Tyr Gly Ile Arg Ser Phe Asn Ala			
165	170	175	
ttt gat agc ggg ggt gac ctg ctg cgg aat tcg tcc aat cat gcc gcc			1452
Phe Asp Ser Gly Gly Asp Leu Leu Arg Asn Ser Ser Asn His Ala Ala			
180	185	190	
cat gct ggt gaa cag gga gat tcc ggt ggt ccg ctt att tgg agt acg			1500
His Ala Gly Glu Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Trp Ser Thr			
195	200	205	
gca gga tat gga cta tta gtc gat agc gat ggc ggc tac ccc tat aca			1548
Ala Gly Tyr Gly Leu Leu Val Asp Ser Asp Gly Gly Tyr Pro Tyr Thr			
210	21	220	
gat agc aca acc ggt caa atg gag ttt tat tat ggt ggg acc cct cct			1596
Asp Ser Thr Thr Gly Gln Met Glu Phe Tyr Tyr Gly Gly Thr Pro Pro			
225	230	235	240
gag gga cgt cgt tat gct aaa caa aac gtc gaa tat tat att atg ctc			1644
Glu Gly Arg Arg Tyr Ala Lys Gln Asn Val Glu Tyr Tyr Ile Met Leu			
245	250	255	
gga acc ccc aag gaa att atg acc gac gta ggg gaa atc aca ggg aaa			1692
Gly Thr Pro Lys Glu Ile Met Thr Asp Val Gly Glu Ile Thr Gly Lys			

260	265	270	
ccg cct atg ctg cct aag tgg tcg ctt gga ttc atg aac ttt gag tgg 1740			
Pro Pro Met Leu Pro Lys Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe Glu Trp			
275	280	285	
gat acg aat caa acg gag ttt acg aat aat gtg gat acg tat cgt gcc 1788			
Asp Thr Asn Gln Thr Glu Phe Thr Asn Asn Val Asp Thr Tyr Arg Ala			
290	295	300	
aaa aat atc ccc ata gat gct tac gcc ttc gac tat gac tgg aaa aag 1836			
Lys Asn Ile Pro Ile Asp Ala Tyr Ala Phe Asp Tyr Asp Trp Lys Lys			
305	310	315	320
tac ggg gaa acc aac tat ggt gaa ttc gcg tgg aat acg act aat ttc 1884			
Tyr Gly Glu Thr Asn Tyr Gly Glu Phe Ala Trp Asn Thr Thr Asn Phe			
325	330	335	
cct tct gcg tca acg act tct tta aag tca aca atg gat gct aaa ggc 1932			
Pro Ser Ala Ser Thr Thr Ser Leu Lys Ser Thr Met Asp Ala Lys Gly			
340	345	350	
atc aaa atg atc gga att aca aaa ccc cgc atc gtt acg aag gat gct 1980			
Ile Lys Met Ile Gly Ile Thr Lys Pro Arg Ile Val Thr Lys Asp Ala			
355	360	365	
tca gcg aat gtg acg acc caa ggg acg gac gcg aca aat ggc ggt tat 2028			
Ser Ala Asn Val Thr Thr Gln Gly Thr Asp Ala Thr Asn Gly Gly Tyr			
370	375	380	
ttt tat cca ggc cat aac gag tat cag gat tat ttc att ccc gta act 2076			
Phe Tyr Pro Gly His Asn Glu Tyr Gln Asp Tyr Phe Ile Pro Val Thr			
385	390	395	400
gtg cgt agt atc gat cct tac aat gct aac gaa cgt gct tgg ttc tgg 2124			
Val Arg Ser Ile Asp Pro Tyr Asn Ala Asn Glu Arg Ala Trp Phe Trp			
405	410	415	
aat cat tcc aca gat gcg ctt aat aaa ggg atc gta ggt tgg tgg aat 2172			
Asn His Ser Thr Asp Ala Leu Asn Lys Gly Ile Val Gly Trp Trp Asn			
420	425	430	
gac gag acg gat aaa gta tct tcg ggt gga gcg tta tat tgg ttt ggc 2220			
Asp Glu Thr Asp Lys Val Ser Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Trp Phe Gly			
435	440	445	
aat ttc aca aca ggc cac atg tct cag acg atg tac gaa ggg ggg cgg 2268			
Asn Phe Thr Thr Gly His Met Ser Gln Thr Met Tyr Glu Gly Gly Arg			
450	455	460	
gct tac acg agt gga gcg cag cgt gtt tgg caa acg gct aga acc ttc 2316			
Ala Tyr Thr Ser Gly Ala Gln Arg Val Trp Gln Thr Ala Arg Thr Phe			
465	470	475	480
tac cca ggt gcc cag cgg tat gcg act acg ctt tgg tct ggc gat att 2364			
Tyr Pro Gly Ala Gln Arg Tyr Ala Thr Thr Leu Trp Ser Gly Asp Ile			
485	490	495	
ggc att caa tac aat aaa ggc gaa cggt atc aat tgg gct gcc ggg atg 2412			

Gly Ile Gln Tyr Asn Lys Gly Glu Arg Ile Asn Trp Ala Ala Gly Met
 500 505 510
 cag gag caa agg gca gtt atg cta tcc tcc gtg aac aat ggc cag gtg 2460
 Gln Glu Gln Arg Ala Val Met Leu Ser Ser Val Asn Asn Gly Gln Val
 515 520 525
 aaa tgg ggc atg gat acc ggc gga ttc aat cag cag gat ggc acg acg 2508
 Lys Trp Gly Met Asp Thr Gly Gly Phe Asn Gln Gln Asp Gly Thr Thr
 530 535 540
 aac aat ccg aat ccc gat tta tac gct cgg tgg atg cag ttc agt gcc 2556
 Asn Asn Pro Asn Pro Asp Leu Tyr Ala Arg Trp Met Gln Phe Ser Ala
 545 550 555 560
 cta acg cct gtt ttc cga gtg cat ggg aac aac cat cag cag cgc cag 2604
 Leu Thr Pro Val Phe Arg Val His Gly Asn Asn His Gln Gln Arg Gln
 565 570 575
 cca tgg tac ttc gga tcg act gcg gag gag gcc tcc aaa gag gca att 2652
 Pro Trp Tyr Phe Gly Ser Thr Ala Glu Glu Ala Ser Lys Glu Ala Ile
 580 585 590
 cag ctg cgg tac tcc ctg atc cct tat atg tat gcc tat gag aga agt 2700
 Gln Leu Arg Tyr Ser Leu Ile Pro Tyr Met Tyr Ala Tyr Glu Arg Ser
 595 600 605
 gct tac gag aat ggg aat ggg ctc gtt cgg cca ttg atg caa gcc tat 2748
 Ala Tyr Glu Asn Gly Asn Gly Leu Val Arg Pro Leu Met Gln Ala Tyr
 610 615 620
 cca aca gat gcg gcc gtc aaa aat tac acg gat gct tgg atg ttt ggt 2796
 Pro Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe Gly
 625 630 635 640
 gac tgg ctg ctg gct gca cct gtg gta gat aaa cag cag acg agt aag 2844
 Asp Trp Leu Leu Ala Ala Pro Val Val Asp Lys Gln Gln Thr Ser Lys
 645 650 655
 gat atc tat tta ccg tct ggg tca tgg att gac tat gcg cga ggc aat 2892
 Asp Ile Tyr Leu Pro Ser Gly Ser Trp Ile Asp Tyr Ala Arg Gly Asn
 660 665 670
 gca ata act ggc ggt caa acc atc cga tat tcg gtt aat ccg gac acg 2940
 Ala Ile Thr Gly Gly Gln Thr Ile Arg Tyr Ser Val Asn Pro Asp Thr
 675 680 685
 ttg aca gac atg cct ctc ttt att aaa aaa ggt gcc att att cca aca 2988
 Leu Thr Asp Met Pro Leu Phe Ile Lys Lys Gly Ala Ile Ile Pro Thr
 690 695 700
 cag aaa gtg cag gat tac gta ggg cag gct tcc gtc act tcc gtt gat 3036
 Gln Lys Val Gln Asp Tyr Val Gly Gln Ala Ser Val Thr Ser Val Asp
 705 710 715 720
 gtg gat gtg ttt ccg gat acg acg cag tcg agt ttc acg tac tac gat 3084
 Val Asp Val Phe Pro Asp Thr Thr Gln Ser Ser Phe Thr Tyr Tyr Asp
 725 730 735

gat gat ggc gcc agt tat aac tat gag agc ggc act tat ttt aag caa			3132
Asp Asp Gly Ala Ser Tyr Asn Tyr Glu Ser Gly Thr Tyr Phe Lys Gln			
740	745	750	
aat atg act gct cag gat aat ggg tca ggc tcg tta agt ttt act tta			3180
Asn Met Thr Ala Gln Asp Asn Gly Ser Gly Ser Leu Ser Phe Thr Leu			
755	760	765	
gga gca aag agt ggc agt tac acg ccg gct ctc caa tcc tat atc gtt			3228
Gly Ala Lys Ser Gly Ser Tyr Thr Pro Ala Leu Gln Ser Tyr Ile Val			
770	775	780	
aag ctg cac ggt tct gct gga act tct gtt acg aat aac agc gca gct			3276
Lys Leu His Gly Ser Ala Gly Thr Ser Val Thr Asn Asn Ser Ala Ala			
785	790	795	800
atg aca tct tat gca agc ttg gaa gca tta aaa gct gct gct ggg gaa			3324
Met Thr Ser Tyr Ala Ser Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Glu			
805	810	815	
ggc tgg gcg act ggg aag gac att tat ggg gat gtc acc tat gtg aaa			3372
Gly Trp Ala Thr Gly Lys Asp Ile Tyr Gly Asp Val Thr Tyr Val Lys			
820	825	830	
gtg acg gca ggt aca gct tct tct aaa tct att gct gtt aca ggt gtt			3420
Val Thr Ala Gly Thr Ala Ser Ser Lys Ser Ile Ala Val Thr Gly Val			
835	840	845	
gct gcc gtg agc gca act act tcg caa tac gaa gct gag gat gca tcg			3468
Ala Ala Val Ser Ala Thr Thr Ser Gln Tyr Glu Ala Glu Asp Ala Ser			
850	855	860	
ctt tct ggc aat tcg gtt gct gca aag gcg tcc ata aac acg aat cat			3516
Leu Ser Gly Asn Ser Val Ala Ala Lys Ala Ser Ile Asn Thr Asn His			
865	870	875	880
acc gga tat acg gga act gga ttt gta gat ggt ttg ggg aat gat ggc			3564
Thr Gly Tyr Thr Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Leu Gly Asn Asp Gly			
885	890	895	
gct ggt gtc acc ttc tat cca aag gtg aaa act ggc ggt gac tac aat			3612
Ala Gly Val Thr Phe Tyr Pro Lys Val Lys Thr Gly Gly Asp Tyr Asn			
900	905	910	
gtc tcc ttg cgt tat gcg aat gct tca ggc acg gct aag tca gtc agt			3660
Val Ser Leu Arg Tyr Ala Asn Ala Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Ser			
915	920	925	
att ttt gtt aat gga aaa aga gtg aag tcc acc tcg ctc gct aat ctc			3708
Ile Phe Val Asn Gly Lys Arg Val Lys Ser Thr Ser Leu Ala Asn Leu			
930	935	940	
gca aat tgg gac act tgg tct aca caa tct gag aca ctg ccg ttg acg			3756
Ala Asn Trp Asp Thr Trp Ser Thr Gln Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr			
945	950	955	960
gca ggt gtg aat gtt gtg acc tat aaa tat tac tcc gat gcg gga gat			3804
Ala Gly Val Asn Val Val Thr Tyr Lys Tyr Ser Asp Ala Gly Asp			

965	970	975	
aca ggc aat gtt aac atc gac aac atc acg gta cct ttt gcg cca att			3852
Thr Gly Asn Val Asn Ile Asp Asn Ile Thr Val Pro Phe Ala Pro Ile			
980	985	990	
atc ggt aag tat gaa gca gag agt gct gag ctt tct ggt ggc agc tca			3900
Ile Gly Lys Tyr Glu Ala Glu Ser Ala Glu Leu Ser Gly Gly Ser Ser			
995	1000	1005	
ttg aac acg aac cat tgg tac tac agt ggt acg gct ttt gta gac ggt			3948
Leu Asn Thr Asn His Trp Tyr Tyr Ser Gly Thr Ala Phe Val Asp Gly			
1010	1015	1020	
ttg agt gct gta ggc gcg c ^{tg} gtg aaa tac aac gtg aat gtc cct agc			3996
Leu Ser Ala Val Gly Ala Gln Val Lys Tyr Asn Val Asn Val Pro Ser			
1025	1030	1035	1040
gca gga agt tat cag gta ggc ctg cga tat gcg aat ggc agt gca gcg			4044
Ala Gly Ser Tyr Gln Val Ala Leu Arg Tyr Ala Asn Gly Ser Ala Ala			
1045	1050	1055	
acg aaa acg ttg agt act tat atc aat gga gcc aag ctg ggg caa acc			4092
Thr Lys Thr Leu Ser Thr Tyr Ile Asn Gly Ala Lys Leu Gly Gln Thr			
1060	1065	1070	
agt ttt acg agt cct ggt acg aat tgg aat gtt tgg cag gat aat gtg			4140
Ser Phe Thr Ser Pro Gly Thr Asn Trp Asn Val Trp Gln Asp Asn Val			
1075	1080	1085	
caa acg gtg acg tta aat gca ggg gca aac acg att gcg ttt aaa tac			4188
Gln Thr Val Thr Leu Asn Ala Gly Ala Asn Thr Ile Ala Phe Lys Tyr			
1090	1095	1100	
gac gcc gct gac agc ggg aac atc aac gta gat cgt ctg ctt ctt tca			4236
Asp Ala Ala Asp Ser Gly Asn Ile Asn Val Asp Arg Leu Leu Ser			
1105	1110	1115	1120
act tcg gca gcg gga acg ccg gtt tct gag cag aac ctg cta gac aat			4284
Thr Ser Ala Ala Gly Thr Pro Val Ser Glu Gln Asn Leu Leu Asp Asn			
1125	1130	1135	
ccc ggt ttc gag cgt gac agt caa acc aat aac tgg att gag tgg			4332
Pro Gly Phe Glu Arg Asp Thr Ser Gln Thr Asn Asn Trp Ile Glu Trp			
1140	1145	1150	
cat cca ggc acg caa gct gtt gtc ttt ggc gtt gat agc ggc tca acc			4380
His Pro Gly Thr Gln Ala Val Ala Phe Gly Val Asp Ser Gly Ser Thr			
1155	1160	1165	
acc aat ccg ccg gaa tcc ccg tgg tcg ggt gat aag cgt gcc tac ttc			4428
Thr Asn Pro Pro Glu Ser Pro Trp Ser Gly Asp Lys Arg Ala Tyr Phe			
1170	1175	1180	
ttt gca gca ggt gcc tat caa caa agc atc cat caa acc att agt gtt			4476
Phe Ala Ala Gly Ala Tyr Gln Gln Ser Ile His Gln Thr Ile Ser Val			
1185	1190	1195	1200
cct gtt aat aat gta aaa tac aaa ttt gaa gcc tgg gtc cgc atg aag			4524

Pro Val Asn Asn Val Lys Tyr Lys Phe Glu Ala Trp Val Arg Met Lys
 1205 1210 1215
 aat acg acg ccg acg gca aga gcc gaa att caa aac tat ggc gga 4572
 Asn Thr Thr Pro Thr Thr Ala Arg Ala Glu Ile Gln Asn Tyr Gly Gly
 1220 1225 1230
 tca gcc att tat gcg aac ata agt aac agc ggt gtt tgg aaa tat atc 4620
 Ser Ala Ile Tyr Ala Asn Ile Ser Asn Ser Gly Val Trp Lys Tyr Ile
 1235 1240 1245
 agc gta agt gat att atg gtg acc aat ggt cag ata gat gtt gga ttt 4668
 Ser Val Ser Asp Ile Met Val Thr Asn Gly Gln Ile Asp Val Gly Phe
 1250 1255 1260
 tac gtg gat tca cct ggt gga act acg ctt cac att gat gat gtg cgc 4716
 Tyr Val Asp Ser Pro Gly Gly Thr Thr Leu His Ile Asp Asp Val Arg
 1265 1270 1275 1280
 gta acc aaa caa taa 4731
 Val Thr Lys Gln
 acaaacaacc agctctcccg ttaatggag ggctgggtgt ttgttatgtat aatccatcta 4791
 ttttagagtgg attaaacgtt ttgaagtgtc tgctgaactt cttgcacaat ggataacgcc 4851
 gcgggtgcggg cacttgagaa agcacgtct gcaagctct ccttacctgt acagccgtct 4911
 ccgcagaagt agaaaggaac gtttccacg cgtatccggca gcagattt ggaagcaatg 4971
 ttttcacgc tggaaaccat cgcttcttgc gaaaccgtt tcacggctgt gacatcgcc 5031
 cagcctggat aatgtttatc aaataaggct tccatggaa ggttcttctc ttccaggtac 5091
 gcttgcgtc gtcctcggtt atcaaagcgg tcgcttaagt atgcgatacc ttgcagcagc 5151
 tgccccctt ctggtaactag tgtgtgatc 5180

<210> 2
 <211> 3869
 <212> DNA
 <213> 微生物

<220>
 <221> CDS
 <222> (241)...(3522)

<400> 2

tcatcgctac	tggcaatcgg	attcaaacaa	atggctgcag	ctgcacaga	cgattgtgga	60										
aaggaaatat	ctgatttaac	cataccgcgg	tcgcgattga	ttgaatagga	ttcgtggccg	120										
cctaatattt	aaagggggga	tgcgtggagc	agcgcatgca	cggcgaggaa	taactgttgt	180										
tggagcctct	aagtcattca	tgttagcaa	acaaatttcg	gtacgaaagg	ggaaatgttt	240										
atg	tat	gta	agg	aat	cta	aca	ggt	tca	ttc	cga	ttt	tct	ctc	tct	ttt	288
Met	Tyr	Val	Arg	Asn	Leu	Thr	Gly	Ser	Phe	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Phe	
1	5	10	15													
ttg	ctc	tgt	ttc	tgt	ctc	ttc	gtc	ccc	tct	att	tat	gcc	att	gat	ggt	336
Leu	Leu	Cys	Phe	Cys	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Ile	Tyr	Ala	Ile	Asp	Gly	

20	25	30	
gtt tat cat gcg cca tac gga atc gat gat ctg tac gag att cag gcg			384
Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu Ile Gln Ala			
35	40	45	
acg gag cgg agt cca aga gat ccc gtt gca ggc gat act gtg tat atc			432
Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Asp Thr Val Tyr Ile			
50	55	60	
aag ata aca acg tgg ccc att gaa tca gga caa acg gct tgg gtg acc			480
Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser Gly Gln Thr Ala Trp Val Thr			
65	70	75	80
tgg acg aaa aac ggt gtc aat caa gct gct gtc gga gca gca ttc aaa			528
Trp Thr Lys Asn Gly Val Asn Gln Ala Ala Val Gly Ala Ala Phe Lys			
85	90	95	
tac aac acg ggc aac aac act tac tgg gaa gcg aac ctt ggc act ttt			576
Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu Gly Thr Phe			
100	105	110	
gca aaa ggg gac gtg atc agt tat acc gtt cat ggc aac aag gat ggc			624
Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val His Gly Asn Lys Asp Gly			
115	120	125	
gcg aat gag aag gtt atc ggt cct ttt act ttt acc gta acg gga tgg			672
Ala Asn Glu Lys Val Ile Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val Thr Gly Trp			
130	135	140	
gaa tcc gtt agc agt atc acg tct att acg gat aat acg aac cgt gtt			720
Glu Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Ile Thr Asp Asn Thr Asn Arg Val			
145	150	155	160
gtg ctg aat gcg gtg ccg aat aca ggc aca ttg aag cca aag atc aac			768
Val Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Lys Pro Lys Ile Asn			
165	170	175	
ctt tcc ttt acg gcg gat gat gtc ctc cgc gta cag gtt tct cca acc			816
Leu Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Leu Arg Val Gln Val Ser Pro Thr			
180	185	190	
gga aca gga acg tta agc agt gga ctt agt aat tac aca gtt tca gat			864
Gly Thr Gly Thr Leu Ser Ser Gly Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ser Asp			
195	200	205	
acc gcc tca acc act tgg ctt aca act tcc aag ctg aag gtg aag gtg			912
Thr Ala Ser Thr Thr Trp Leu Thr Thr Ser Lys Leu Lys Val Lys Val			
210	215	220	
gat aag aat cca ttc aaa ctt agt gtg tat aag cct gat gga acg acg			960
Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp Gly Thr Thr			
225	230	235	240
ttg att gcc cgt caa tat gac agc act acg aat cgt aac att gcc tgg			1008
Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Thr Asn Arg Asn Ile Ala Trp			
245	250	255	
tta acc aat ggc agt aca atc atc gac aag gta gaa gat cat ttt tat			1056

Leu Thr Asn Gly Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Glu Asp His Phe Tyr			
260	265	270	
tca ccg gct tcc gag gag ttt ttt ggc ttt gga gag cat tac aac aac			1104
Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu His Tyr Asn Asn			
275	280	285	
ttc cgt aaa cgc gga aat gat gtg gac acc tat gtg ttc aac cag tat			1152
Phe Arg Lys Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe Asn Gln Tyr			
290	295	300	
aag aat caa aat gac cgc acc tac atg gca att cct ttt atg ctt aac			1200
Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe Met Leu Asn			
305	310	315	320
agc agc ggt tat ggc att ttc gta aat tca acg tat tat tcc aaa ttt			1248
Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Lys Phe			
325	330	335	
cgg ttg gca acc gaa cgc acc gat atg ttc acg ttt acg gct gat aca			1296
Arg Leu Ala Thr Glu Arg Thr Asp Met Phe Ser Phe Thr Ala Asp Thr			
340	345	350	
ggg ggt agt gcc gcc tcg atg ctg gat tat tat ttc att tac ggt aat			1344
Gly Gly Ser Ala Ala Ser Met Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile Tyr Gly Asn			
355	360	365	
gat ttg aaa aat gtg gtg agt aac tac gct aac att acc ggt aag cca			1392
Asp Leu Lys Asn Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr Gly Lys Pro			
370	375	380	
aca gcg ctg ccg aaa tgg gct ttc ggg tta tgg atg tca gct aac gag			1440
Thr Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu			
385	390	395	400
tgg gat cgt caa acc aag gtg aat aca gcc att aat aac gcg aac tcc			1488
Trp Asp Arg Gln Thr Lys Val Asn Thr Ala Ile Asn Asn Ala Asn Ser			
405	410	415	
aat aat att ccg gct aca gcg gtt gtg ctc gaa cag tgg agt gat gag			1536
Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp Ser Asp Glu			
420	425	430	
aac acg ttt tat att ttc aat gat gcc acc tat acc ccg aaa acg ggc			1584
Asn Thr Phe Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Thr Tyr Thr Pro Lys Thr Gly			
435	440	445	
agt gct gcg cat gcc tat acc gat ttc act ttc ccg aca tct ggg aga			1632
Ser Ala Ala His Ala Tyr Thr Asp Phe Thr Phe Pro Thr Ser Gly Arg			
450	455	460	
tgg acg gat cca aaa gcg atg gca gac aat gtg cat aac aat ggg atg			1680
Trp Thr Asp Pro Lys Ala Met Ala Asp Asn Val His Asn Asn Gly Met			
465	470	475	480
aag ctg gtg ctt tgg cag gtc cct att cag aaa tgg act tca acg ccc			1728
Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr Ser Thr Pro			
485	490	495	

tat acc cag aaa gat aat gat gaa gcc tat atg acg gct cag aat tat			1776
Tyr Thr Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ala Tyr Met Thr Ala Gln Asn Tyr			
500	505	510	
gca gtt ggc aac ggt agc gga ggc cag tac agg ata cct tca gga caa			1824
Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro Ser Gly Gln			
515	520	525	
tgg ttc gag aac agt ttg ctg ctt gat ttt acg aat acg gcc gcc aaa			1872
Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Thr Ala Ala Lys			
530	535	540	
aac tgg tgg atg tct aaa cgc gct tat ctg ttt gat ggt gtg ggt atc			1920
Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly Val Gly Ile			
545	550	555	560
gac ggc ttc aaa aca gat ggc ggt gaa atg gta tgg ggt cgc tca aat			1968
Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg Ser Asn			
565	570	575	
act ttc tca aac ggt aag aaa ggc aat gaa atg cgc aat caa tac ccg			2016
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Lys Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr Pro			
580	585	590	
aat gag tat gtg aaa gcc tat aac gag tac gcg cgc tcg aag aaa gcc			2064
Asn Glu Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser Lys Lys Ala			
595	600	605	
gat gcg gtc tcc ttt agc cgt tcc ggc acg caa ggc gca cag gcg aat			2112
Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala Gln Ala Asn			
610	615	620	
cag att ttc tgg tcc ggt gac caa gag tcg acg ttt ggt gct ttt caa			2160
Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly Ala Phe Gln			
625	630	635	640
caa gct gtg aat gca ggg ctt acg gca agt atg tct ggc gtt cct tat			2208
Gln Ala Val Asn Ala Gly Leu Thr Ala Ser Met Ser Gly Val Pro Tyr			
645	650	655	
tgg agc tgg gat atg gca ggc ttt aca ggc act tat cca acg gct gag			2256
Trp Ser Trp Asp Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Pro Thr Ala Glu			
660	665	670	
ttg tac aaa cgt gct act gaa atg gct gct ttt gca ccg gtc atg cag			2304
Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Glu Met Ala Ala Phe Ala Pro Val Met Gln			
675	680	685	
ttt cat tcc gag tct aac ggc agc tct ggt atc aac gag gaa cgt tct			2352
Phe His Ser Glu Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu Glu Arg Ser			
690	695	700	
cca tgg aac gca caa ggc cgt aca ggc gac aat acg atc att agt cat			2400
Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile Ile Ser His			
705	710	715	720
ttt gcc aaa tat acg aat acg cgc atg aat ttg ctt cct tat att tat			2448
Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro Tyr Ile Tyr			

725	730	735	
agc gaa gcg aag atg gct agt gat act ggc gtt ccc atg atg cgc gcc			2496
Ser Glu Ala Lys Met Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met Met Arg Ala			
740	745	750	
atg gcg ctt gaa tat ccg aag gac acg aac acg tac ggt ttg aca caa			2544
Met Ala Leu Glu Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Thr Gln			
755	760	765	
cag tat atg ttc gga ggt aat tta ctt att gct cct gtt atg aat cag			2592
Gln Tyr Met Phe Gly Gly Asn Leu Leu Ile Ala Pro Val Met Asn Gln			
770	775	780	
gga gaa aca aac aag agt att tat ctt ccg cag ggg gat tgg atc gat			2640
Gly Glu Thr Asn Lys Ser Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp Ile Asp			
785	790	795	800
ttc tgg ttc ggt gct cag cgt cct ggc ggt cga aca atc agc tac acg			2688
Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile Ser Tyr Thr			
805	810	815	
gcc ggc atc gat gat cta ccg gtt ttt gtg aag ttt ggc agt att ctt			2736
Ala Gly Ile Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Phe Gly Ser Ile Leu			
820	825	830	
ccg atg aat ttg aac gcg caa tat caa gtg ggc ggg acc att ggc aac			2784
Pro Met Asn Leu Asn Ala Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr Ile Gly Asn			
835	840	845	
agc ttg acg agc tac acg aat ctc gcg ttc cgc att tat ccg ctt ggg			2832
Ser Leu Thr Ser Tyr Thr Asn Leu Ala Phe Arg Ile Tyr Pro Leu Gly			
850	855	860	
aca aca acg tac gac ttg aat gat gat att ggc ggt tcg gtg aaa acc			2880
Thr Thr Thr Tyr Asp Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser Val Lys Thr			
865	870	875	880
ata act tct aca gag caa tat ggg ttg aat aaa gaa acc gtg act gtt			2928
Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr Val Thr Val			
885	890	895	
cca gcg att aat tct acc aag aca ttg caa gtg ttt acg act aag cct			2976
Pro Ala Ile Asn Ser Thr Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr Thr Lys Pro			
900	905	910	
tcc tct gta acg gtg ggt tct gtg atg aca gag tac agt act tta			3024
Ser Ser Val Thr Val Gly Gly Ser Val Met Thr Glu Tyr Ser Thr Leu			
915	920	925	
act gcc cta acg gga gcg tcg aca ggc ttg tac tat gat act gta cag			3072
Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Thr Gly Trp Tyr Tyr Asp Thr Val Gln			
930	935	940	
aaa ttc act tac gtc aag ctt ggt tca agt gca tct gct caa tcc gtt			3120
Lys Phe Thr Tyr Val Lys Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ala Gln Ser Val			
945	950	955	960
gtg cta aat ggc gtt aat aag gtg gaa tat gaa gca gaa ttc ggc gtg			3168

Val Leu Asn Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Val
 965 970 975
 caa agc ggc gtt tca acg aac acg aac cat gca ggt tat act ggt aca 3216
 Gln Ser Gly Val Ser Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr Thr Gly Thr
 980 985 990
 gga ttt gtg gac ggc ttt gag act ctt gga gac aat gtt gct ttt gat 3264
 Gly Phe Val Asp Gly Phe Glu Thr Leu Gly Asp Asn Val Ala Phe Asp
 995 1000 1005
 gtt tcc gtc aaa gcc gca ggt act tat acg atg aag gtt cggt tat tca 3312
 Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Met Lys Val Arg Tyr Ser
 1010 1015 1020
 tcc ggt gca ggc aat ggc tca aga gcc atc tat gtg aat aac acc aaa 3360
 Ser Gly Ala Gly Asn Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn Asn Thr Lys
 1025 1030 1035 1040
 gtg acg gac ctt gcc ttg ccg caa aca aca agc tgg gat aca tgg ggg 3408
 Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Gln Thr Ser Trp Asp Thr Trp Gly
 1045 1050 1055
 act gct acg ttt agc gtc tcg ctg agt aca ggt ctc aac acg gtg aaa 3456
 Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Leu Ser Thr Gly Leu Asn Thr Val Lys
 1060 1065 1070
 gtc agc tat gat ggt acc agt tca ctt ggc att aat ttc gat aac atc 3504
 Val Ser Tyr Asp Gly Thr Ser Ser Leu Gly Ile Asn Phe Asp Asn Ile
 1075 1080 1085
 gcg att gta gag caa taa 3522
 Ala Ile Val Glu Gln
 1090
 aagggtcgaaa gggcaagtcc ctccttaat ttctaattca aagggagttat ccttgatg 3582
 tccaccaaacc aaagaaaattc cacgtattct tgctttttt acagcggttta cgttgtttgg 3642
 ttcaaccctt gccttgcctt ctgcgtccgcc tgcgcatgcc tatgtcagca gccttagggaa 3702
 aaatctcatt tcttcgagtg tcacccggaga taccttgacg ctaactgttg ataacgggtgc 3762
 gcccggatgtat gaccttttga ttgttcaaggc ggtgcaaaac ggtatttga aggtggattta 3822
 tcgtccaaat agcataaacgc cgagcgcgaa gacgccccatgc ctggatc 3869
 →

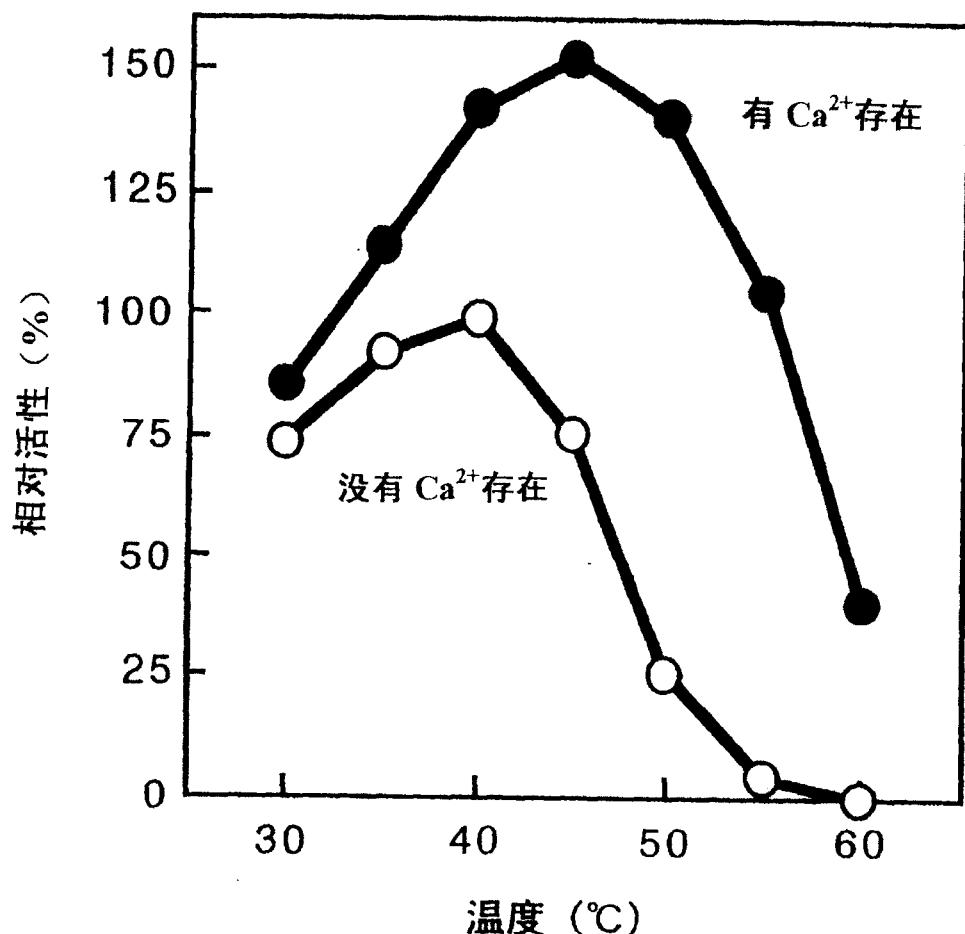


图 1

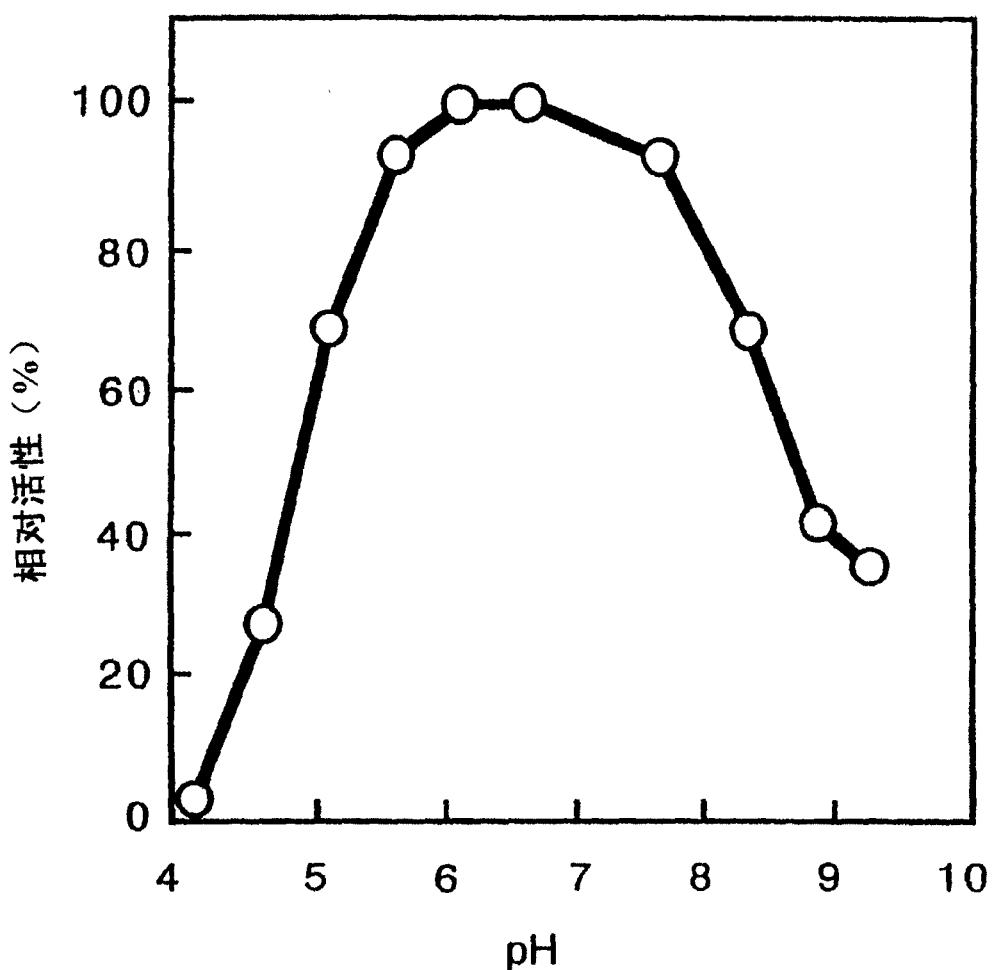


图 2

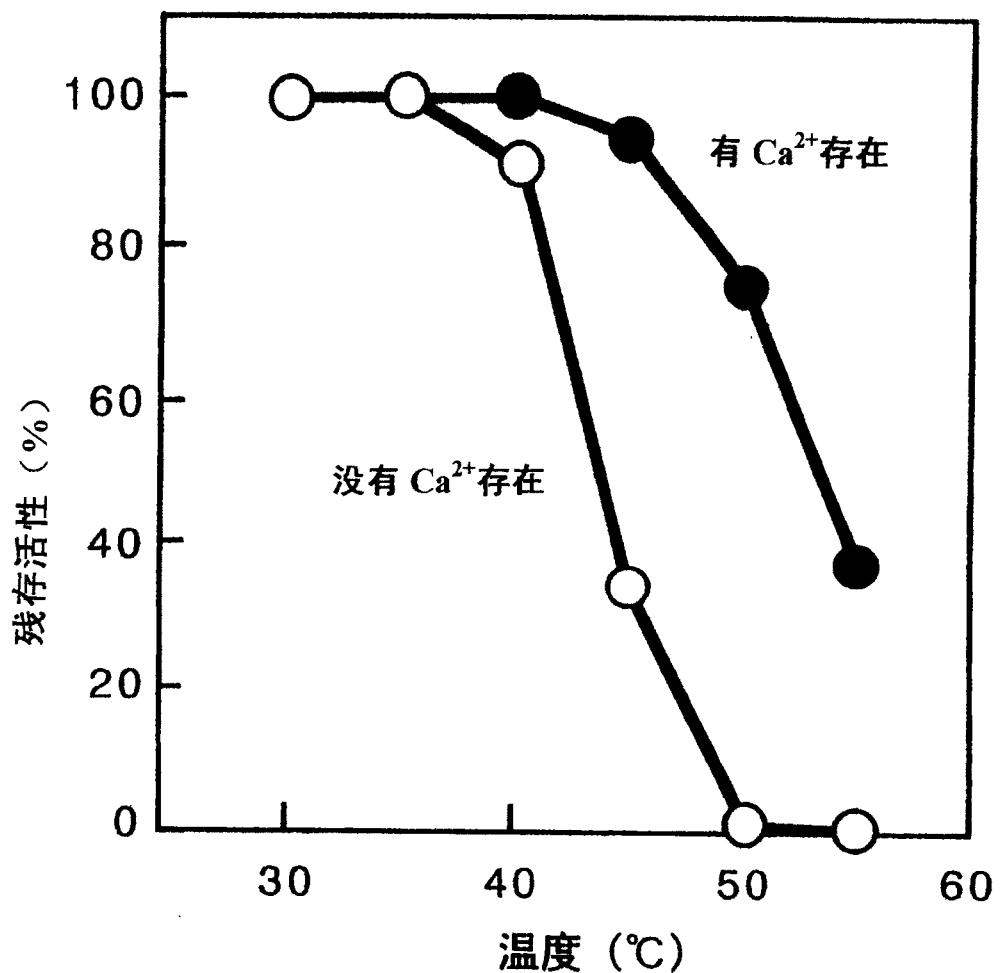


图 3

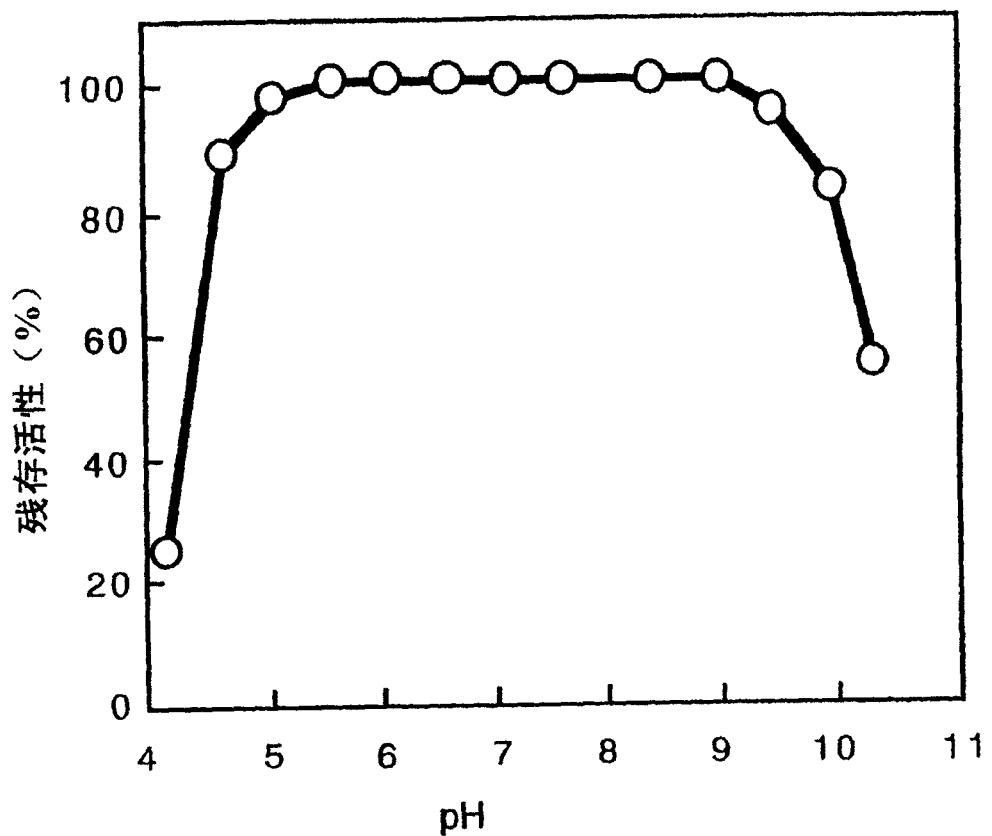


图 4

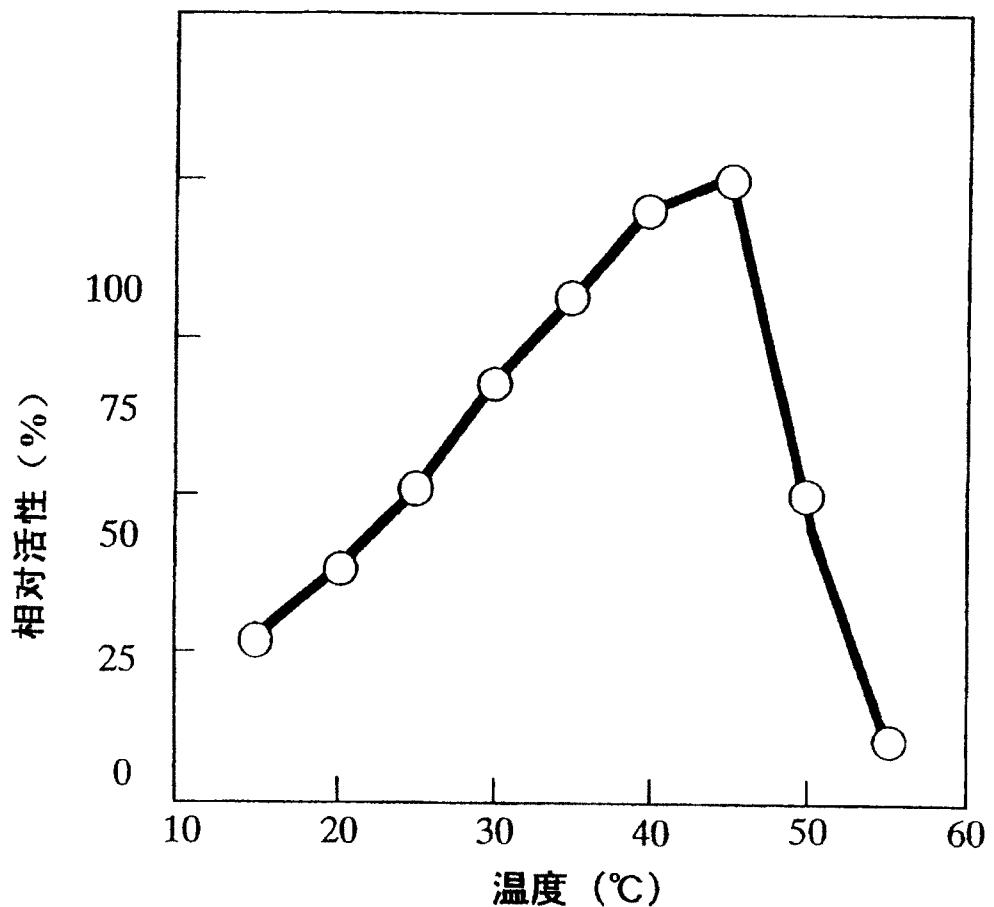


图 5

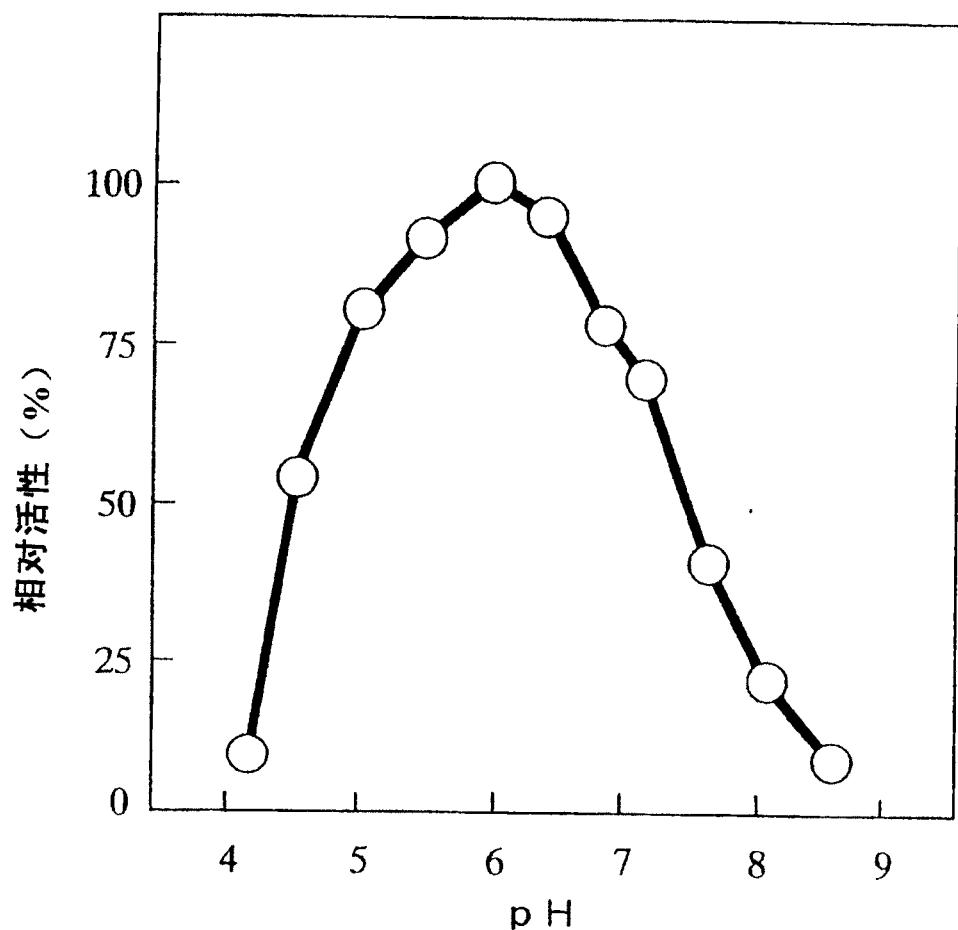


图 6

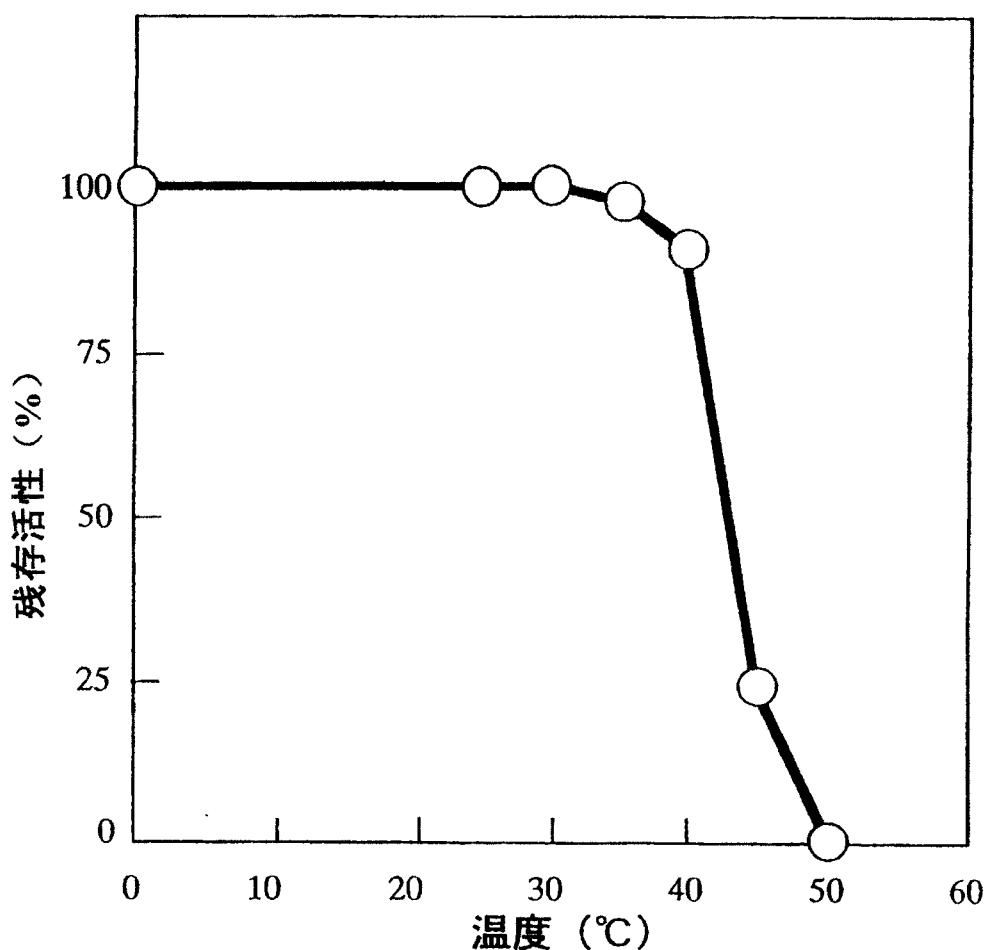


图 7

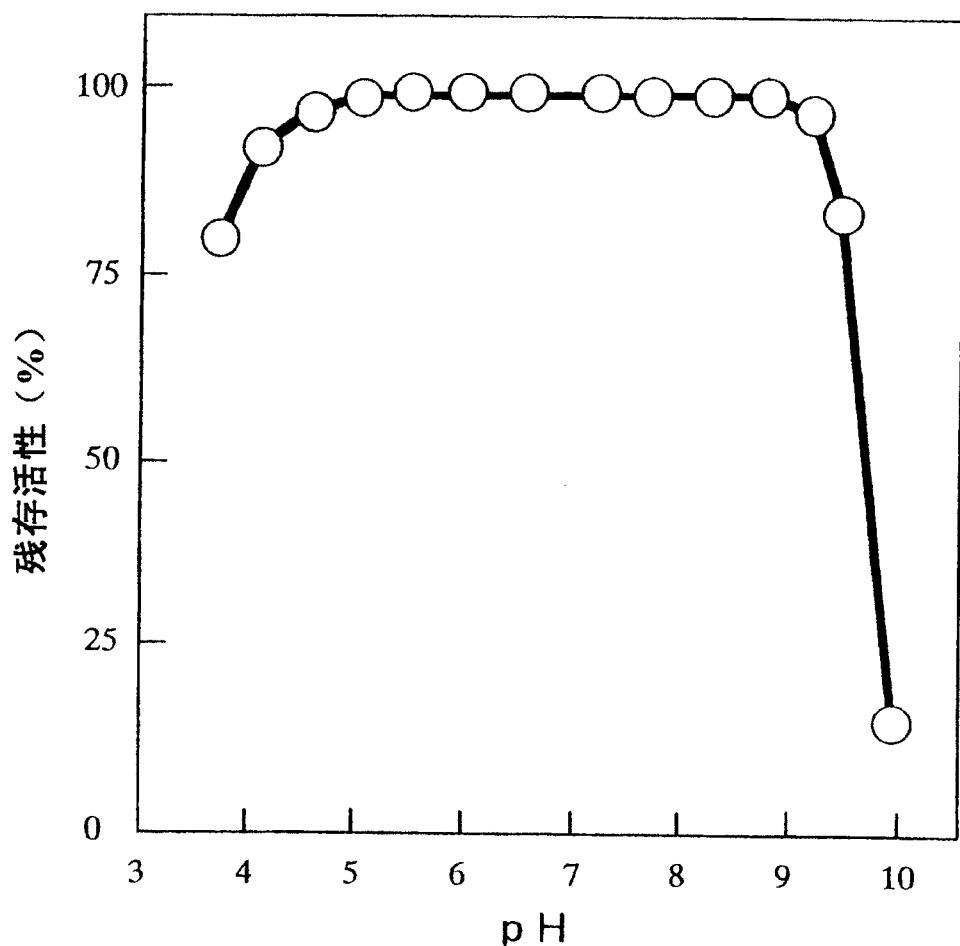


图 8

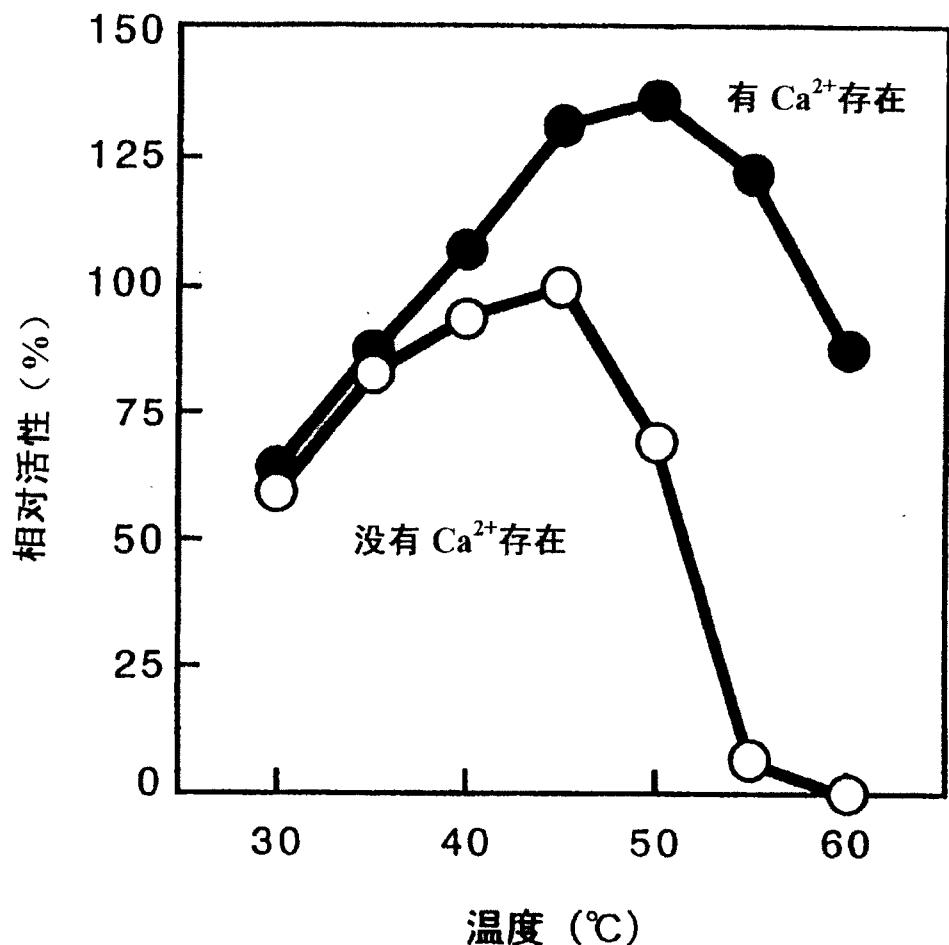


图 9

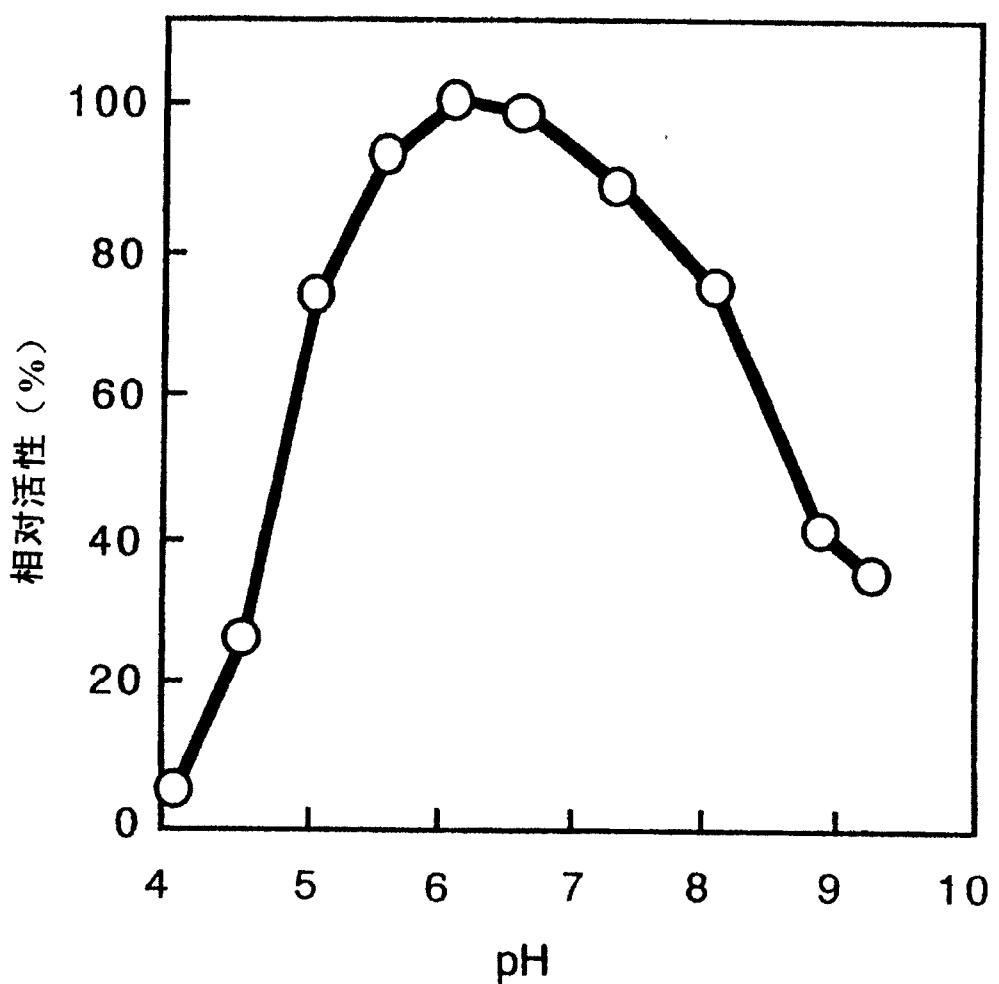
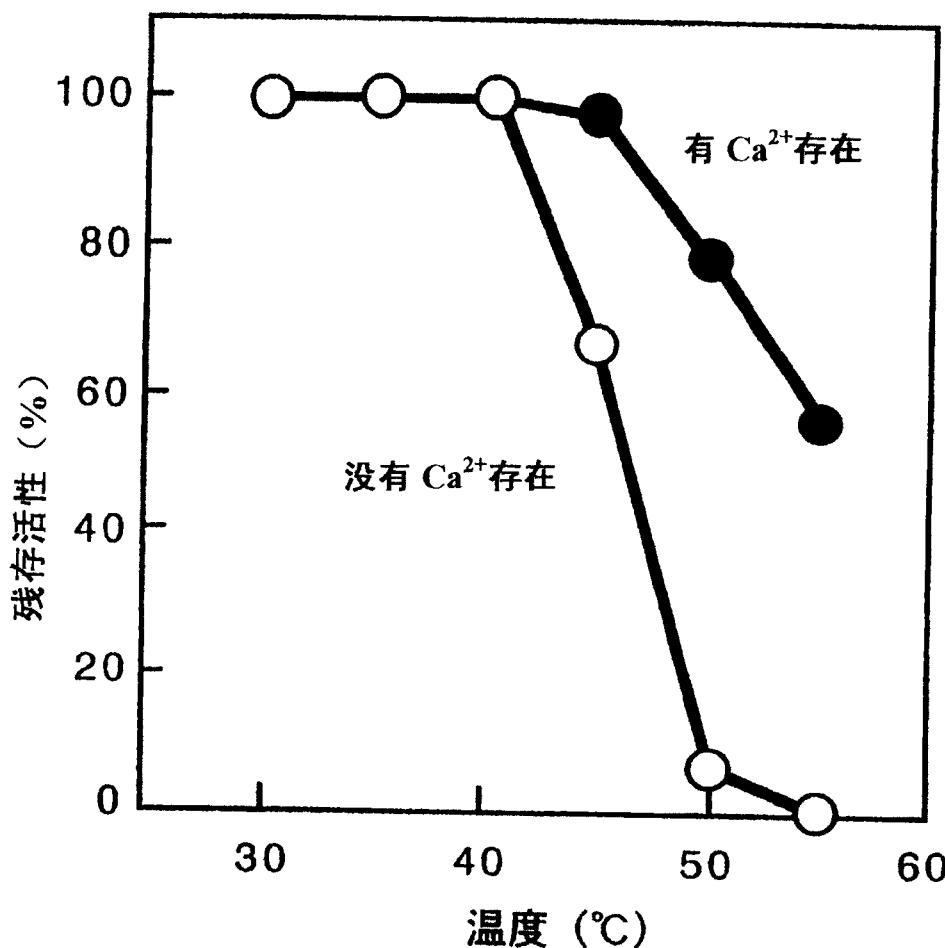


图 10



HIC022660

图 11

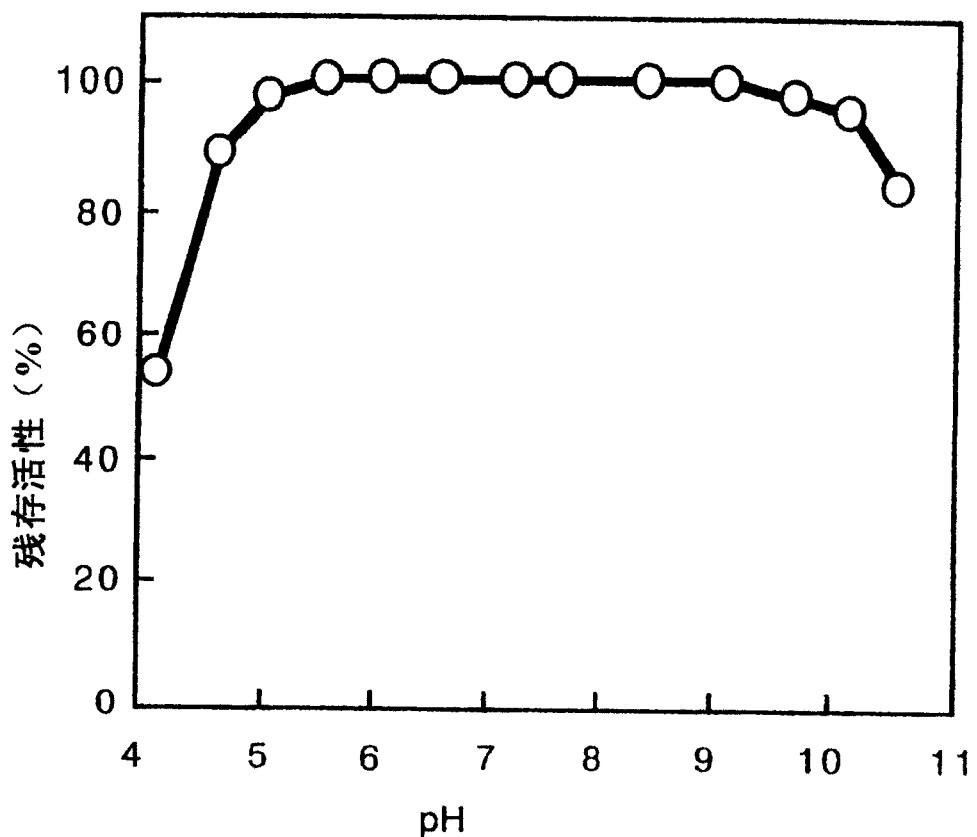


图 12

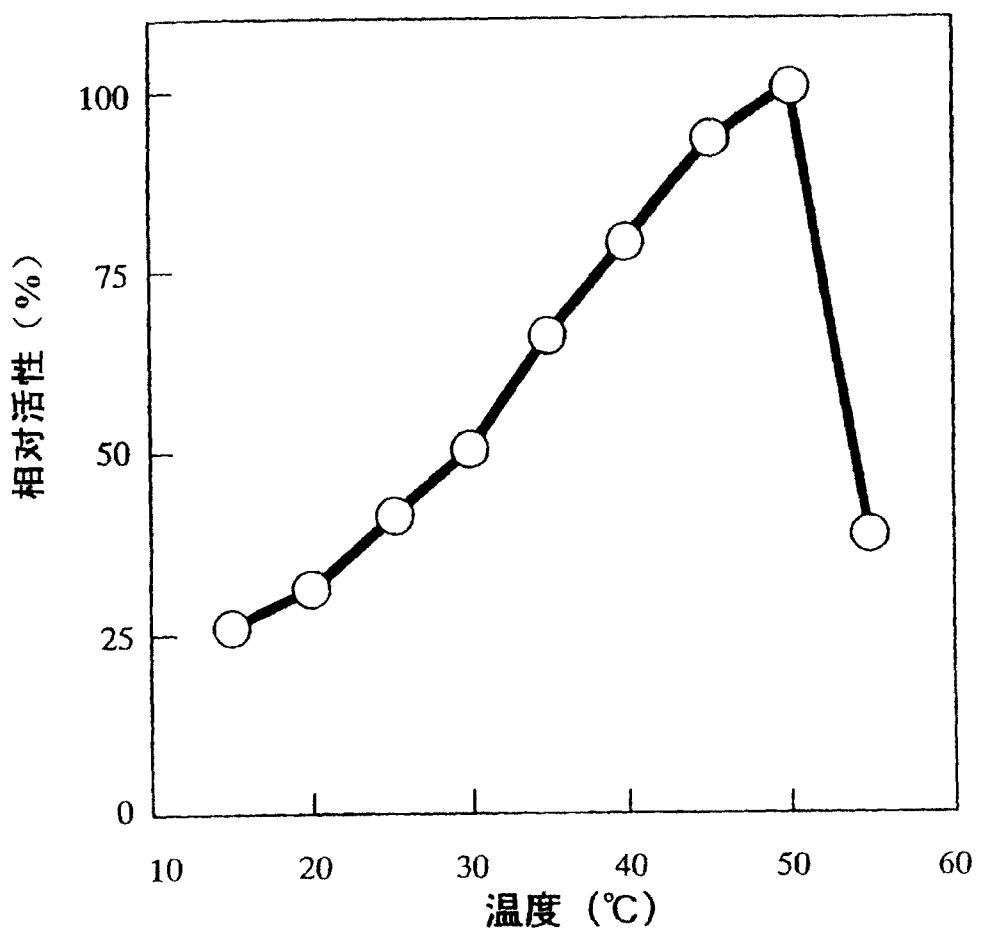


图 13

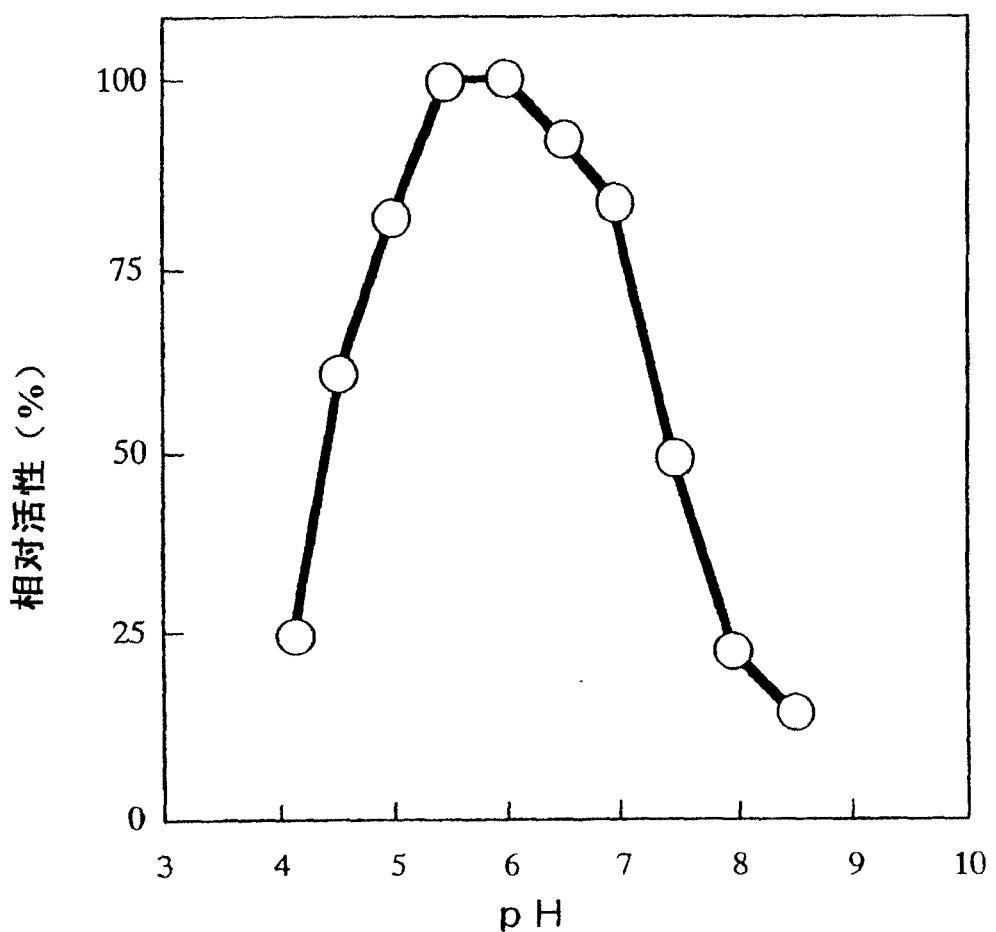


图 14

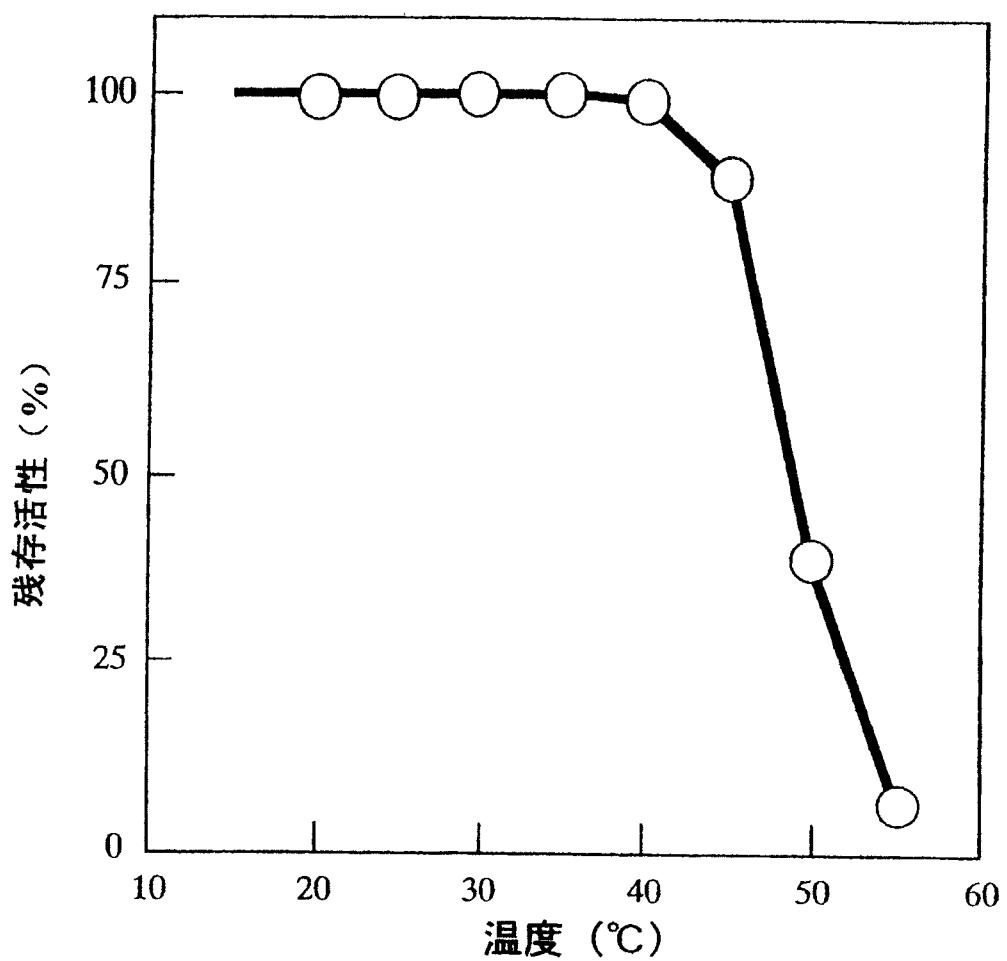


图 15

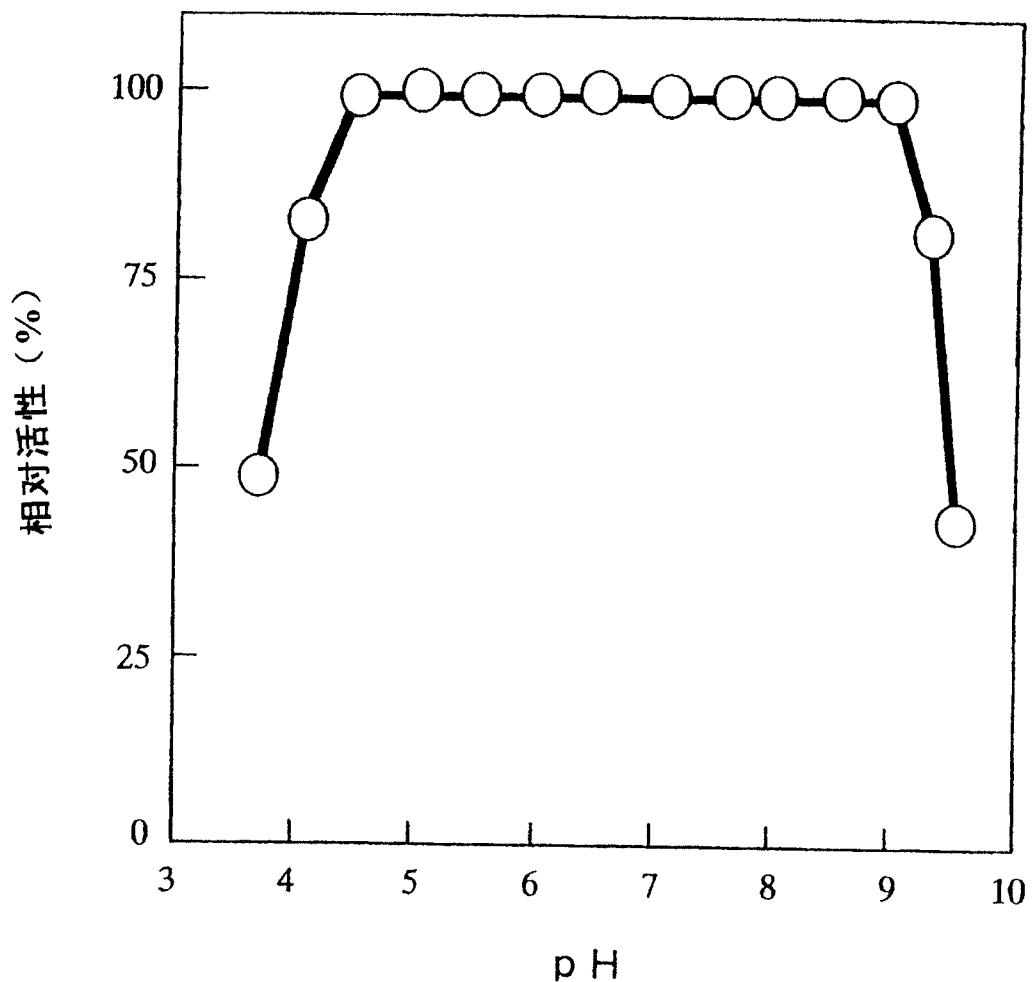


图 16

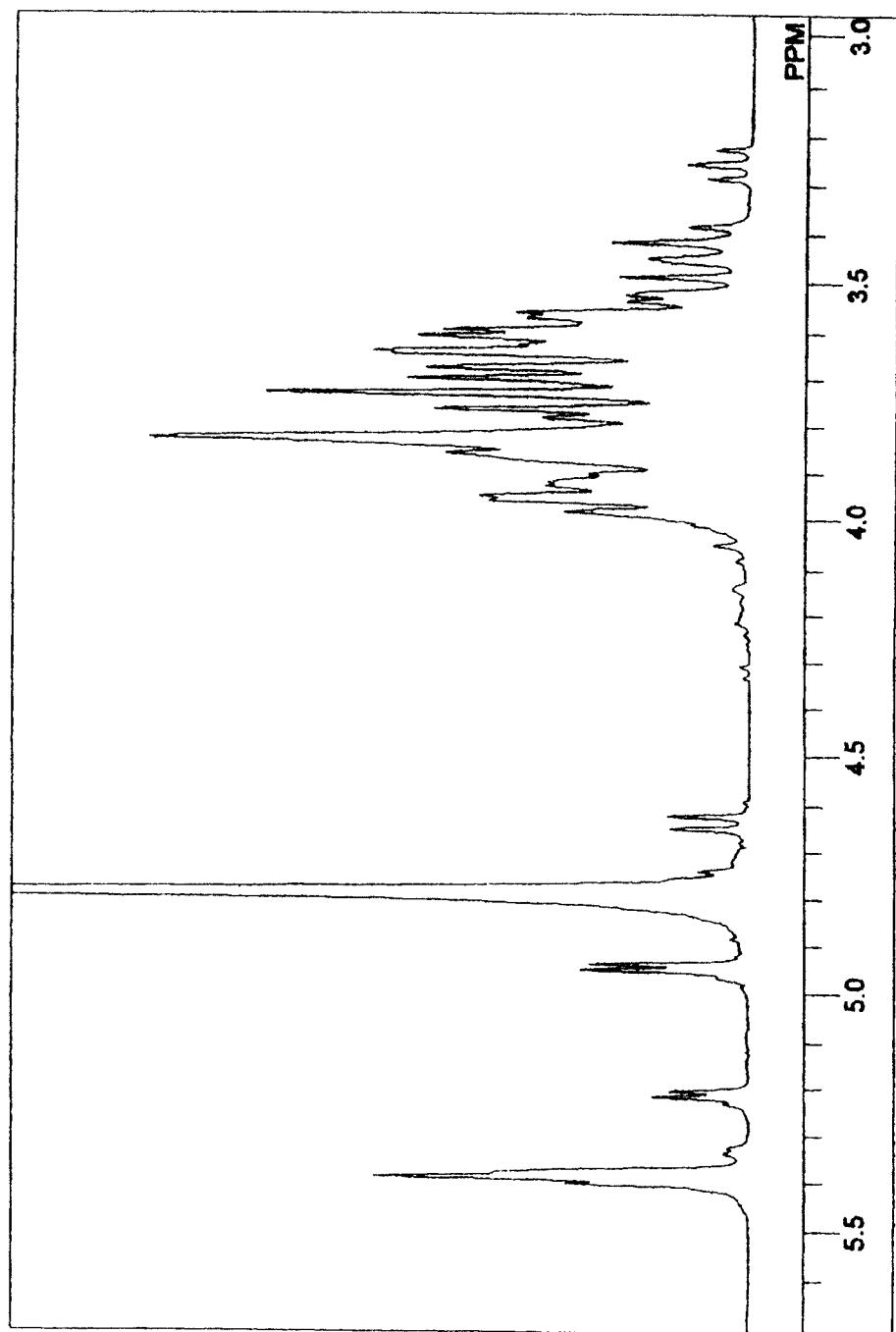


图 17

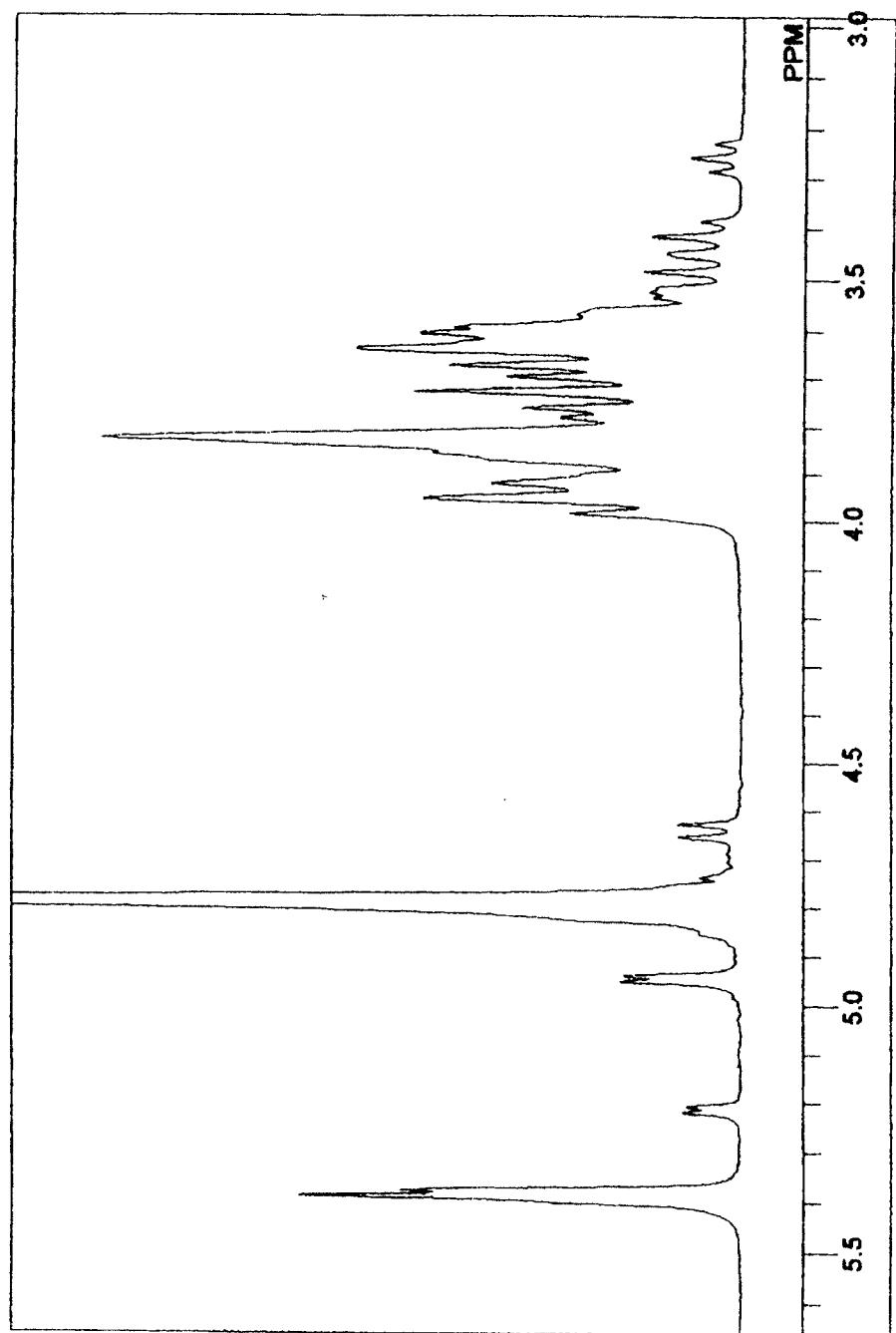


图 18

位移值(ppm)

相对强度

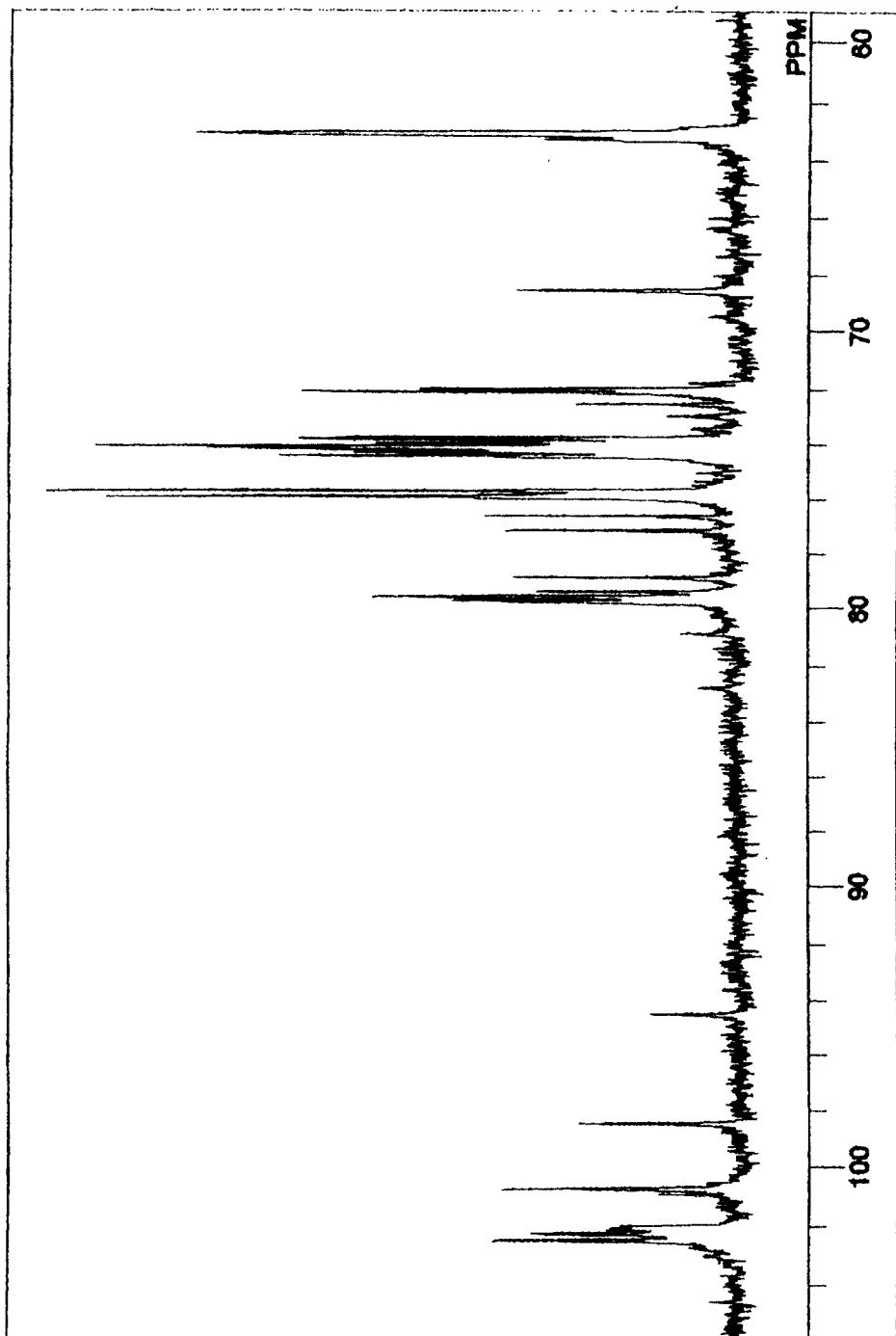


图 1.9
位移值(ppm)

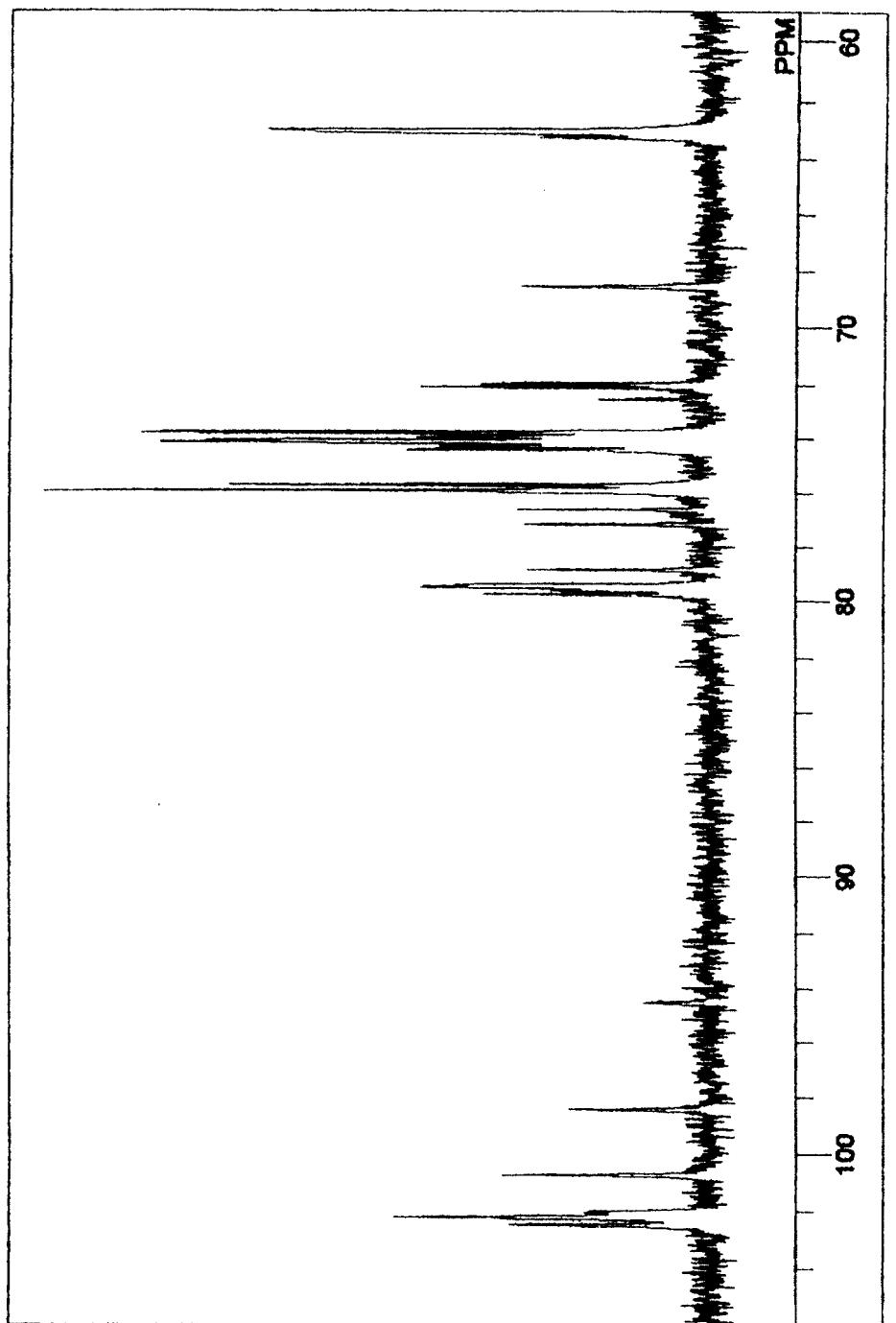


图 20
图 20

图 20

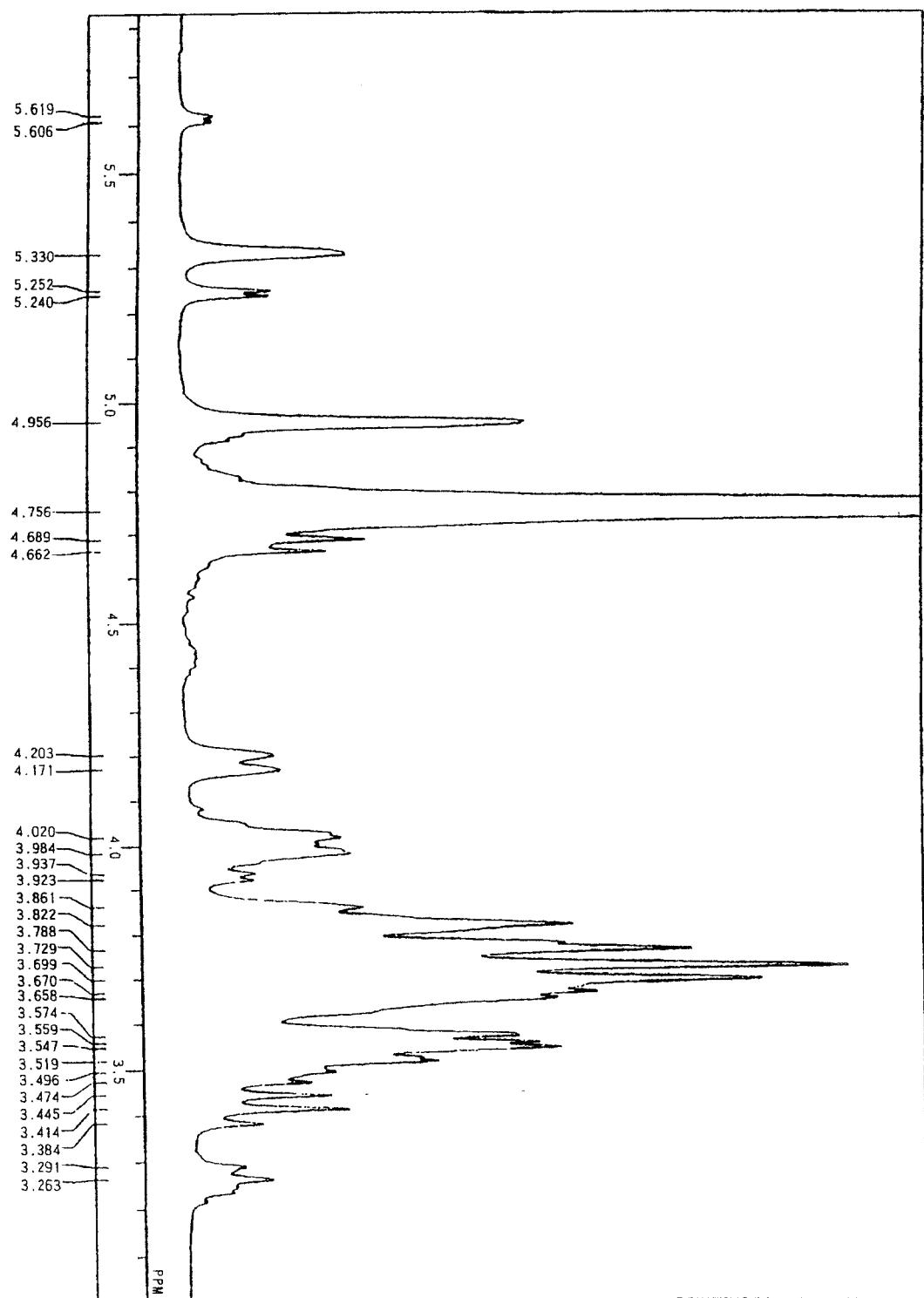


图 21

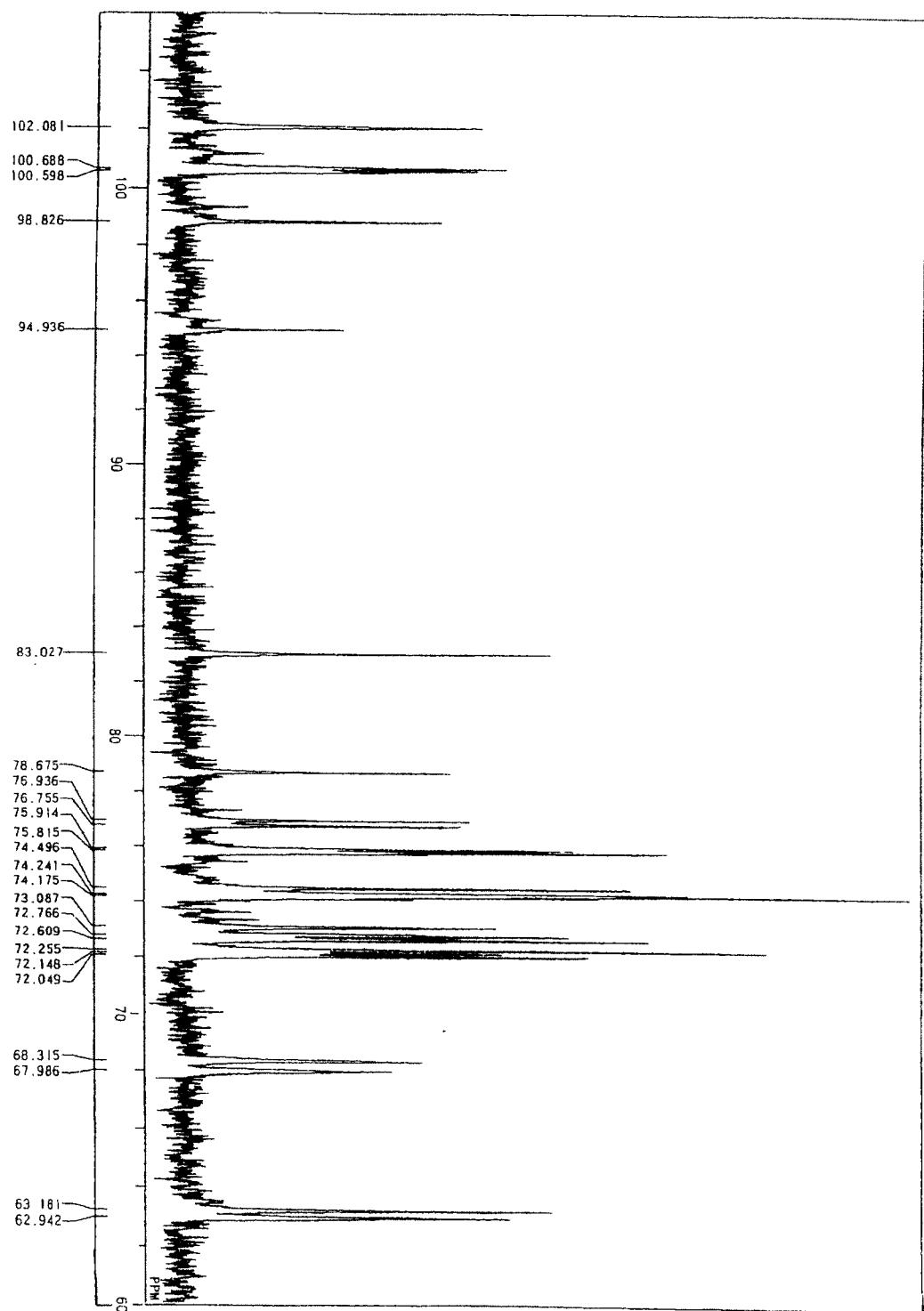


图 22