

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年7月3日(03.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/103659 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/12 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/082768
- (22) 国際出願日: 2013年12月6日(06.12.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-286731 2012年12月28日(28.12.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人新潟大学(NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 Niigata (JP).
- (72) 発明者: 中井 博之(NAKAI, Hiroyuki); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 仁平 高則(NIHIRA, Takanori); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 齊藤 由華(SAITO, Yuka); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 大坪 研一(OHTSUBO, Kenichi); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 北岡 本光(KITAOKA, Motomitsu); 〒3058642 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護(USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: GLUCOSYL- α -1,2-GLYCEROL PHOSPHORYLASE AND METHOD FOR PRODUCING GLUCOSYL- α -1,2-GLYCEROL USING SAME

(54) 発明の名称: グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ及びそれをを用いたグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法

(57) Abstract: Provided are a novel glucosyl- α -1,2-glycerol phosphorylase that makes it possible to mass-produce glucosyl- α -1,2-glycerol easily and selectively from inexpensive materials, and a method for producing glucosyl- α -1,2-glycerol using the same. According to the present invention, glucosyl- α -1,2-glycerol is mass-produced easily and selectively by (1) conducting an enzymatic reaction in a solution containing β -glucose 1-phosphate, glycerol, and glucosyl- α -1,2-glycerol phosphorylase or (2) conducting an enzymatic reaction in a solution containing a carbohydrate phosphorolytic enzyme that produces β -glucose 1-phosphate, and a sugar that serves as a substrate thereof, and glycerol, phosphoric acid, and glucosyl- α -1,2-glycerol phosphorylase.

(57) 要約: 安価な材料から、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便かつ選択的に大量製造することを可能にする、新規のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ及びそれをを用いたグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法を提供する。(1) β -グルコース1-リン酸とグリセロールとグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行うことか、又は(2) β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖とグリセロールとリン酸とグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行うことで、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便かつ選択的に大量製造する。



WO 2014/103659 A1

明 細 書

発明の名称：

グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ及びそれを用いた
グルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ及びそれを用いたグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 日本の伝統食品である清酒や味噌、味醂に微量に含まれるグルコシル- α -1, 2-グリセロールは、がん細胞増殖抑制作用、抗アレルギー作用、血管内皮細胞増殖促進因子産生促進作用、血糖値上昇抑制作用、抗菌作用、細胞賦活作用、真皮マトリックス産生促進作用、中性脂肪蓄積抑制作用、メラニン産生抑制作用、皮膚刺激低減作用が報告されており、食品・化粧品・医薬品素材としての利用が期待されている（特許文献1及び2）。このように近年栄養面からだけでなく、オリゴ糖の機能性が注目されているが、その高純度調製の困難さ・高コストが当該研究の産業応用を妨げている。そのため、機能性オリゴ糖をはじめとする種々の有用糖質の選択的な低コスト大量調製法の確立が現在強く望まれている。

[0003] しかし、従来のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法には、以下の問題点があり、安価に製造することができなかった。化学的酸化法は、過ヨウ素酸を用いた酸化反応により、マルチトールから合成可能であるが、反応位置選択性は充分ではなく、収率が低かった（18%：重量比率）。また、酵素合成法は、 α -グルコシダーゼ及びスクロースホスホリラーゼの糖転移反応により合成可能であるが、反応自体がこれら酵素の本来の反応ではないため、過剰なグリセロール存在下で行わざるを得ず、さらに α -グルコシダーゼを用いた際は反応位置選択性が低く副産物を生じるため、収率も低かった（5.9%：グリセロールを基準としたモル比率）。また、合成産

物の分解も問題点として挙げられる。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：特開平9－124457号公報
特許文献2：特表2012－506882号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] そこで、本発明は上記問題点に鑑み、安価な材料から、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便且つ選択的に大量製造することを可能にする、新規のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ及びそれを用いたグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 上記課題を達成するため鋭意検討した結果、新規にグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを発見した。そして、 β -グルコース1-リン酸と、グリセロールを出発原料としたグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応（加リン酸分解反応の逆反応）、又は β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素の加リン酸分解反応と新規に発見したグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応を組み合わせることで、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便かつ選択的に大量製造できることを見出し、本発明を完成させた。
- [0007] すなわち、本発明の請求項1に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼは、 β -グルコース1-リン酸と、グリセロールとに作用して、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成することを特徴とする。
- [0008] また、本発明の請求項2に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロール

ホスホリラーゼは、以下の酵素学的性質を有することを特徴とする：

a) 作用

β -グルコース 1-リン酸とグリセロールとに作用してグルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成する；

b) 基質特異性

β -グルコース 1-リン酸とグリセロールとに作用する；

c) 至適 pH

30°Cの条件下で、pH 7.5；

d) 温度安定性

pH 7.5の条件下で、40°Cまで安定；

e) pH安定性

4°C、24時間の条件下で、pH 5.5-9.5で安定。

[0009] また、本発明の請求項3に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼは、配列番号1記載のアミノ酸配列、又は配列番号1記載のアミノ酸配列において、1つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換、付加、又は挿入された配列を有することを特徴とする。

[0010] また、本発明の請求項4に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼは、バチルス・セレニティレデュセンス由来であることを特徴とする。

[0011] また、本発明の請求項5に記載のベクターは、請求項3又は4に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼをコードするベクター又は配列番号2記載のDNAを含むことを特徴とする。

[0012] また、本発明の請求項6に記載の形質転換体は、請求項5記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする。

[0013] また、本発明の請求項7に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの製造方法は、請求項1~4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの製造方法であって、請求項6記載の形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において生産さ

れたグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを回収する工程を含むことを特徴とする。

[0014] また、本発明の請求項8に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法は、 β -グルコース1-リン酸と、グリセロールと、請求項1~4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行う工程と、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを回収する工程とを含むことを特徴とする。

[0015] また、本発明の請求項9に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法は、 β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖と、グリセロールと、リン酸と、請求項1~4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行う工程と、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを回収する工程とを含むことを特徴とする。

[0016] また、本発明の請求項10に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法は、 β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖の組み合わせが、マルトースホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 8）及びマルトースとの組み合わせ、トレハロースホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 64）及びトレハロースとの組み合わせ、コウジビオースホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 230）及びコウジビオースとの組み合わせ、ニゲロースホスホリラーゼ（EC 2. 4. 1. 279）及びニゲロースとの組み合わせ、よりなる群から選択される1つ以上の組み合わせであることを特徴とする。

[0017] また、本発明の請求項11に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法は、前記溶液がpH4. 5~9. 5であることを特徴とする。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、安価な材料からグルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便且つ選択的に大量製造することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]実施例1で調製したグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの至適pHを示した図である。

[図2]実施例1で調製したグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼのpH安定性を示した図である。

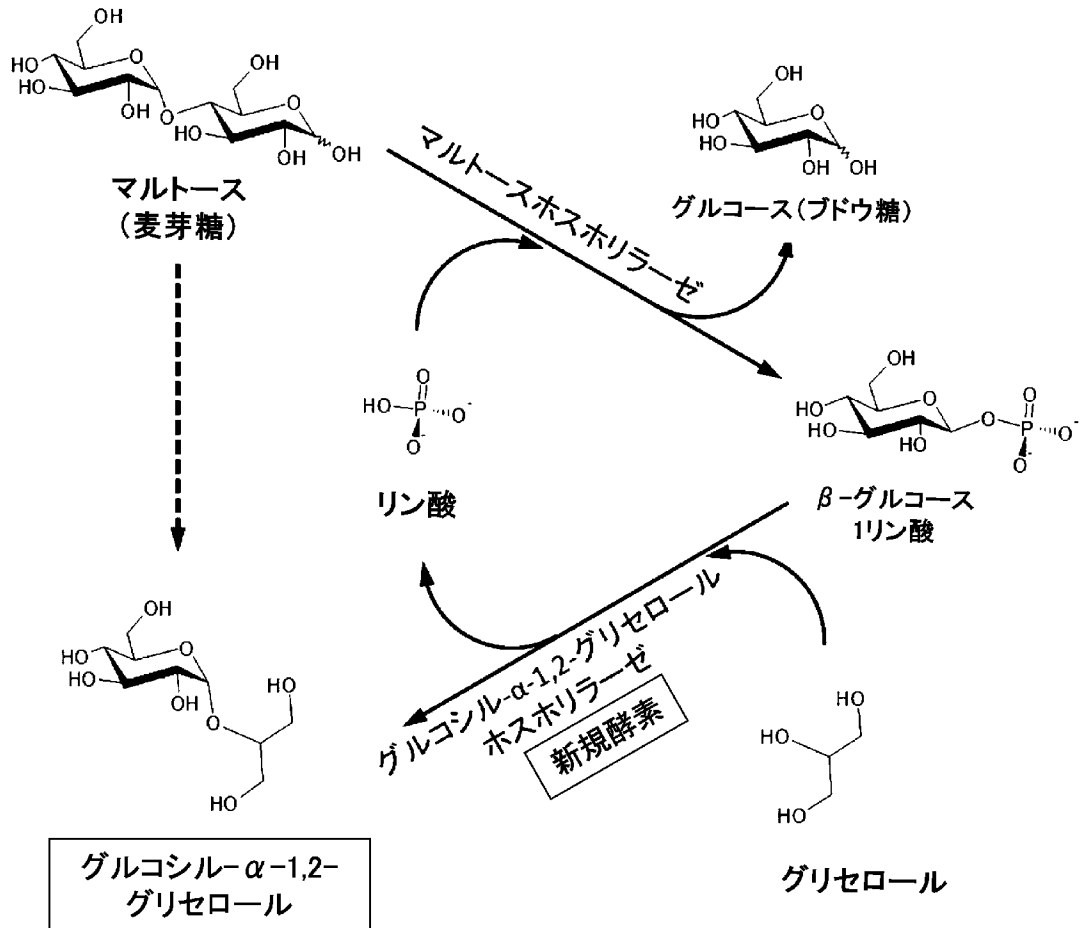
[図3]実施例1で調製したグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの温度安定性を示した図である。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明によれば、(1) β -グルコース1-リン酸と、グリセロールと、前記グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行うことで、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便かつ選択的に大量製造することができる。(2) β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖と、グリセロールと、リン酸と、前記グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行うことで、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを簡便かつ選択的に大量製造することができる。

[0021]

[化1]



[0022] β -グルコース 1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖の組み合わせは、マルトースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.8) 及びマルトースとの組み合わせ、トレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.64) 及びトレハロースとの組み合わせ、コウジビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.230) 及びコウジビオースとの組み合わせ、ニゲロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.279) 及びニゲロースとの組み合わせ、よりなる群から選択される1つ以上の組み合わせであり、最も好ましい組み合わせはマルトースホスホリラーゼ及びマルトースとの組み合わせである。

[0023] 本発明のグルコシル- α -1,2-グリセロールホスホリラーゼは、配列番号1に示すアミノ酸配列で規定される化学構造を持つものでもよい。なお、本発明のグルコシル- α -1,2-グリセロールホスホリラーゼは、 β -

グルコース 1-リン酸と、グリセロールとに作用してグルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成する酵素であれば、配列番号 1 のアミノ酸配列において、一つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠質、置換、付加若しくは挿入されていてもよい。このアミノ酸配列における「アミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入」は、当業者に公知の方法（例えば、突然変異誘発法や遺伝子組み換え法）に従って実施できる。

[0024] 本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼは、微生物、動物、植物等のような生物に由来するものでも良いが、好ましくはバチルス属、ハロテルモトリックス属、ハロバクテロイデス属、ハラナエロビウム属、スピロヘータ属に属する微生物、とりわけ好ましくはバチルス・セレニティレデュセンス由来の酵素を用いる。

[0025] 本発明のベクターは、 β -グルコース 1-リン酸と、グリセロールとに作用してグルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成するグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼをコードする DNA を含むベクターであればよく、配列番号 1 記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ、又は配列番号 1 のアミノ酸配列において、一つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠質、置換、付加若しくは挿入されているグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼをコードする DNA を含むベクターが好ましく、配列番号 2 記載の DNA を含むベクターがとりわけ好ましい。

[0026] 本発明の発現ベクターは、前記遺伝子もしくは配列番号 2 の DNA 又はその修飾体を適当なベクターに挿入することによって得ることができる。本発明の発現ベクターは、宿主中で複製可能なものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA、AcMNPV などのバキュロウイルス等のいずれであってもよい。プラスミド DNA としては、大腸菌由来のプラスミド（例えば pBR322、pUC118 等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば pUB110、pTP5 等）、酵母由来のプラスミド（例えば YEp13、YEp24、YEp50 等）などが挙げられ、ファージ DNA としては λ ファージ等が挙げられる。さらに、レトロウイ

ルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター等を用いることもできる。また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の機能が発揮されるように、本発明の発現ベクターには本発明のタンパク質をコードする遺伝子のほか、例えば、複製開始点、選択マーカー、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル等を組み込んでいてもよい。複製開始点としては、大腸菌用ベクターには、例えばC o l E 1, R 因子, F 因子由来のものが、酵母用ベクターには、例えば2 μ m DNA, A R S 1 由来のものが、動物細胞用ベクターには、S V 4 0, アデノウイルス由来のものが用いることができる。プロモーターとしては、大腸菌用ベクターには、t r p プロモーター、l a c プロモーター、P L プロモーター、P R プロモーター等が、酵母用ベクターには、g a l 1 プロモーター、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター、A O X 1 プロモーター等が、動物細胞用ベクターには、S R α プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター等が用いることができる。選択マーカーとしては、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等が、酵母用ベクターには、L e u 2, T r p 1, U r a 3 遺伝子等が、動物細胞用ベクターには、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等が用いることができる。また、前記遺伝子もしくは配列番号2のDNA又はその修飾体を挿入するベクターとして、商業的に入手可能なものを使用することができるが、そのようなベクターには、宿主が大腸菌である場合は、例えばp E T ベクター (N o v a g e n 社製)、p T r x F U S ベクター (I n v i t r o g e n 社製)、p C Y B ベクター (N e w E n g l a n d B i o L a b s 社製) p C o l d ベクター (タカラバイオ社製) 等が、宿主が酵母である場合は、例えばp E P - 1 発現ベクター (S t r a t a g e n e 社製)、p A U R 1 2 3 ベクター (タカラバイオ社製)、p P I C ベクター (I n v i t r o g e n 社製) 等が、また宿主が動物

細胞である場合は、例えば pMAM-neo 発現ベクター (CLONTECH 社製)、pCDNA3.1 ベクター (Invitrogen 社製)、pBK-CMV ベクター (Stratagene 社製) 等が、宿主が昆虫細胞である場合は、例えば pBacPAK ベクター (CLONTECH 社製)、pAcUW31 ベクター (CLONTECH 社製)、pAcP (+) IE1 ベクター (Novagen 社製) 等がそれぞれ挙げられる。また、本発明の発現ベクターには、発現されるタンパク質の検出及び精製を容易にするためにタグを組み込んでもよい。タグの例としては、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、ヒスチジン (His6) 等が挙げられる。これらのタグに親和性のある担体 (ヒスチジンであればニッケルをキレートした担体) を用いることにより、アフィニティー精製が可能となる。

[0027] ベクターへの遺伝子等の挿入は、例えば、精製された遺伝子の塩基配列を適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などを用いることができるが、これらに限定されない。また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子と他のタンパク質のコードする配列を融合したものを挿入してもよい。これら発現ベクターは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法又はその変法等により調製できる。

[0028] 本発明の形質転換体は、前記本発明の発現ベクターを宿主に組み込むことにより形質転換された形質転換体であれば良い。なお、宿主としては、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を発現できるものであれば、特に制限されるものではない。例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等の酵母、サル細

胞COS-7、Ver o、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ヒトGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞、あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

[0029] 宿主への発現ベクターの導入は、宿主の種類に応じて公知の方法で行うことができ、例えば、塩化カルシウム法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法等が挙げられる。また、上記の各宿主細胞への遺伝子導入は、組換えベクターによらない方法、例えばパーティクルガン法等も用いることができる。

[0030] 本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの製造方法は、前記形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において発現した前記グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを回収する工程とを含む製造方法である。前記培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌等の微生物を宿主とした形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行えるものであれば、天然培地、合成培地などのいずれを用いてもよい。本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの回収は、特に制限されない。前記グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによって前記グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを回収する。また、本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離などにより菌体又は細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを単独で又は適宜組み合わせるにより、培養物中から本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを単離精製できる。なお、培養液をそのまま使用する場合、熱処理などにより他の

タンパク質が失活するので、実質上、本発明のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ酵素液として使用できる。

[0031] β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼは特に限定されるものではなく、いかなる起源の酵素を用いることも可能である。反応液中での β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの濃度は特に限定されないが、それぞれ、0.01~1000 μ M、好ましくは、0.1~100 μ Mで使用することができる。これらの酵素の使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。本発明の好適な実施形態によれば、上記反応に関わる全ての酵素を固定化したバイオリクターカラムを用いて、固定化酵素リアクターとして反応を行うことも可能である。

[0032] 出発原料として用いる糖質の使用濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは約1~約1000 g/Lであり、より好ましくは約10~約1000 g/Lである。

[0033] 酵素反応に関わるリン酸はいかなる起源のものであっても良い。反応系に加えるリン酸濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは約0.1 mM~約1000 mM、より好ましくは約1 mM~約100 mM程度である。

[0034] 反応形態は特に限定されるものではないが、水溶液又は緩衝液中で行われるのが好適である。反応液のpHは好ましくは4.5~9.5である。反応温度は特に限定されるものではないが、好ましくは5 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C、特に30 $^{\circ}$ Cが好ましい。また反応時間は特に限定されるものではないが、0.1~100時間であることが好ましい。

[0035] 本発明により得られるグルコシル- α -1, 2-グリセロールは任意の方法で精製することができる。例えば、本発明により得られるグルコシル- α -1, 2-グリセロールは、カラムクロマトグラフィーや結晶化により単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーとして、これに限定され

るものではないが、サイズ排除クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離が含まれる。結晶化方法としては、これに限定されるものではないが、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトンなど）が含まれる。

[0036] なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の思想を逸脱しない範囲で種々の変形実施が可能である。

[0037] 次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例 1

[0038] バチルス・セレニティレデュセンスのゲノム情報を基に、B s e l 2 8 1 6 遺伝子に対するフォワードプライマー（配列番号3）及びリバースプライマー（配列番号4）を設計し、合成した。B s e l 2 8 1 6 遺伝子の塩基配列を配列番号2に、またこの塩基配列にコードされているアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0039] バチルス・セレニティレデュセンスのゲノムDNAを鋳型とし、上記のプライマー及びK O D p l u s p o l y m e r a s e（T O Y O B O社製）を用い、95℃に2分間保持したのち、95℃で30秒間、60℃で30秒間、68℃で2分30秒間のサイクルを45回繰り返してPCR反応を行った。その結果、2300bpの増幅断片が得られた。このPCRで増幅されるDNA断片は、5'末端にN c o lサイトを、3'末端にX h o lサイトをそれぞれ有するB s e l 2 8 1 6をコードするDNAである。

[0040] 得られた増幅断片を制限酵素N c o l及びX h o lで消化後、同様に処理した市販の遺伝子発現用プラスミドp E T - 2 8 a（ノバジェン社製）に高効率ライゲーション試薬L i g a t i o n h i g h（T O Y O B O社製）を用いて連結した。さらに、ライゲーション反応液を用いて大腸菌コンピテントセルD H 5 α （T O Y O B O製）を形質転換し、C末端に6残基のヒスチジンからなるH i s タグが付加されたB s e l 2 8 1 6をコードするDN

Aを含む発現ベクターpET-28aを回収した。

[0041] この発現ベクターpET-28aを用いて、大腸菌BL21 (DE3)をHanahanらの方法(J. Mol. Biol.、1983年、第166巻、第557-580頁)に従って形質転換した。形質転換体を50 μ g/mLのカナマイシンを含むLB培地200mLに植菌し、IPTG濃度を0.1mMとして誘導培養を18 $^{\circ}$ Cで24時間行った。培養液から遠心分離で回収した菌体を10mLの500mM塩化ナトリウム及び10%グリセロールを含む20mM HEPES-NaOH緩衝液pH7.5に懸濁し、超音波処理により破碎した後、遠心分離後によって粗酵素液を得た。組換えタンパク質の精製は、Hisタグタンパク質精製用カラムHisTrapHP (GEヘルスケア社製)を用いたカラムクロマトグラフィーにより行った。得られた精製酵素溶液を、10mM HEPES-NaOH緩衝液pH7.0に対して透析を行い、遠心式フィルターユニットアミコンウルトラ-30 (ミリポア社製)を用いた限外濾過によって3mLに濃縮することで、BseI2816精製酵素標品を調製した。

実施例 2

[0042] 得られたBseI2816精製酵素標品を用い、以下に示す方法によってBseI2816を新規酵素グルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼと同定し、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成した。

[0043] 500mMの β -グルコース1-リン酸(糖供与体)、500mMのグリセロール(糖受容体)、1.3 μ MのBseI2816を含む反応液1mL (pH7.5)中で酵素反応を30 $^{\circ}$ C、24時間行い、130 μ Lの6N塩酸を添加することで反応を停止した。反応液をイオン交換樹脂アンバーライトMB3及びIRA402BL-CL (オルガノ社製)で脱塩及び還元糖を除去した後、トヨパールHW-40S (東ソー社製)による水を溶媒としたゲル濾過クロマトグラフィー(径2.6cm、長さ100cm)により二糖画分を単離した。精製後の収量は63mgであった。生成物をNMRにより分析したところ、グルコシル- α -1, 2-グリセロールであることを確認

した。

[0044] 40 mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH 7.5) 中、10 mMのβ-グルコース1-リン酸及びグリセロールを用いて、Bse12816が合成反応時に生成するリン酸をモリブデンブルー法により定量した結果、グリセロールを糖受容体とした際のBse12816の活性は62.5ユニット/mgであった。

[0045] Bse12816の30℃における至適pHは7.5付近であり(図1)、安定pH範囲は4℃及び24時間の条件下でpH 5.5-9.5であった(図2)。本酵素のpH 7.5における安定性は40℃までであった(図3)。

[0046] 500 mMのマルトース、500 mMのグリセロール、10 mMのリン酸、1.1 μMのマルトースホスホリラーゼ、1.3 μMのBse12816を含む反応液1 mL (pH 7.5) 中で酵素反応を30℃、24時間行った後、10 μLの6 N塩酸を添加することで反応を停止した。反応液をイオン交換樹脂アンバーライトMB3及びIRA402BL-CL (オルガノ社製) で脱塩及び還元糖を除去した後、トヨパールHW-40S (東ソー社製) による水を溶媒としたゲル濾過クロマトグラフィー (径2.6 cm、長さ100 cm) によりグルコシル-α-1, 2-グリセロール画分を単離した。精製後の収量は57 mgであった。

産業上の利用可能性

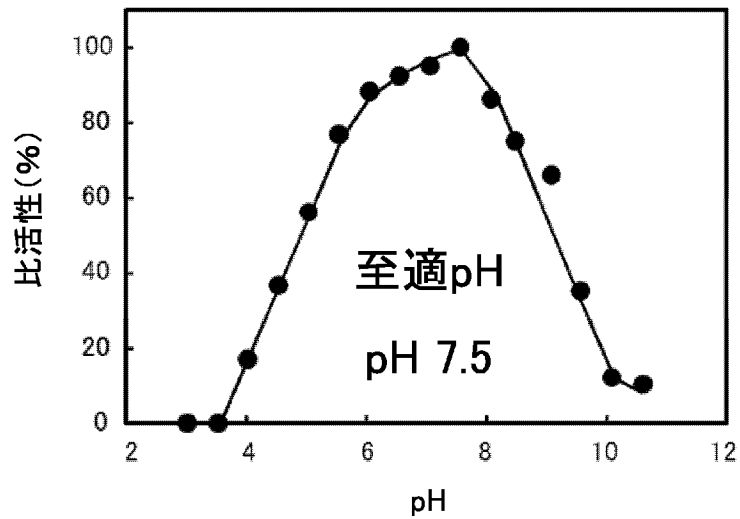
[0047] 以上のように本発明は、食品・化粧品・医薬品産業で利用できる。

請求の範囲

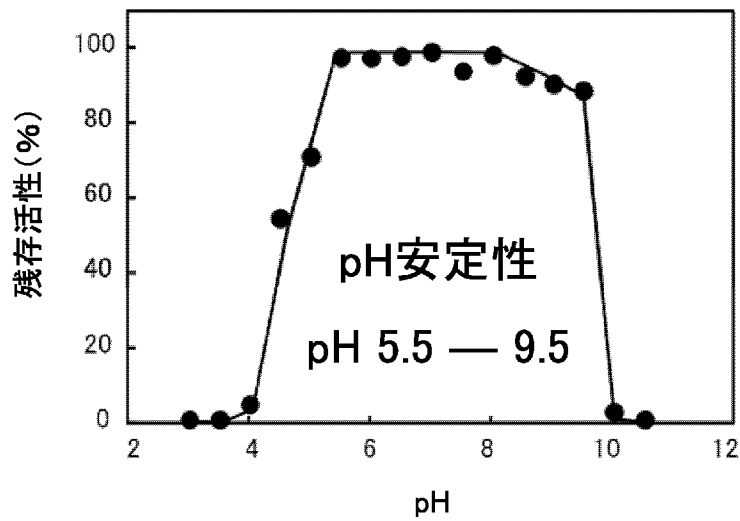
- [請求項1] β -グルコース1-リン酸と、グリセロールとに作用して、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成することを特徴とするグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ。
- [請求項2] 以下の酵素学的性質を有する請求項1記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ：
- a) 作用
 β -グルコース1-リン酸とグリセロールとに作用してグルコシル- α -1, 2-グリセロールを生成する；
 - b) 基質特異性
 β -グルコース1-リン酸とグリセロールとに作用する；
 - c) 至適pH
30°Cの条件下で、pH7.5；
 - d) 温度安定性
pH7.5の条件下で、40°Cまで安定；
 - e) pH安定性
4°C、24時間の条件下で、pH5.5-9.5で安定。
- [請求項3] 配列番号1記載のアミノ酸配列、又は配列番号1記載のアミノ酸配列において、1つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換、付加、又は挿入された配列を有する請求項1又は2に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ。
- [請求項4] バチルス・セレニティレデュセンス由来の請求項1～3のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼ。
- [請求項5] 請求項3又は4に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼをコードするベクター又は配列番号2記載のDNAを含むベクター。
- [請求項6] 請求項5記載のベクターにより形質転換された形質転換体。

- [請求項7] 請求項1～4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼの製造方法であって、請求項6記載の形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において生産されたグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを回収する工程を含む製造方法。
- [請求項8] β -グルコース1-リン酸と、グリセロールと、請求項1～4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行う工程と、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを回収する工程とを含むグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法。
- [請求項9] β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖と、グリセロールと、リン酸と、請求項1～4のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールホスホリラーゼを含む溶液中で酵素反応を行う工程と、グルコシル- α -1, 2-グリセロールを回収する工程とを含むグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法。
- [請求項10] β -グルコース1-リン酸を生成する糖質加リン酸分解酵素及びその基質となる糖の組み合わせが、マルトースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.8）及びマルトースとの組み合わせ、トレハロースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.64）及びトレハロースとの組み合わせ、コウジビオースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.230）及びコウジビオースとの組み合わせ、ニゲロースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.279）及びニゲロースとの組み合わせ、よりなる群から選択される1つ以上の組み合わせである、請求項9に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法。
- [請求項11] 前記溶液がpH4.5～9.5である請求項8～10のいずれか1項に記載のグルコシル- α -1, 2-グリセロールの製造方法。

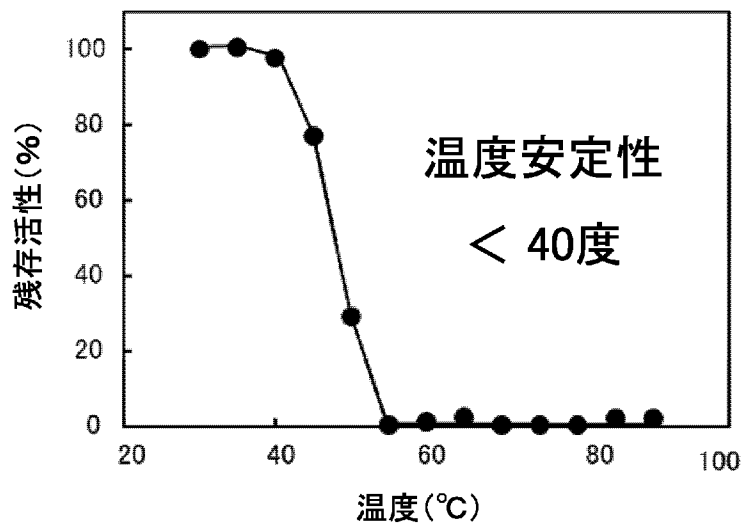
[图1]



[图2]



[图3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/082768

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N9/12(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/00(2006.01)i</i></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N9/12, C12N15/09, C12P19/00</i></p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014</i> <i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014</i></p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI (Thomson Innovation)</i></p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">Category*</th> <th style="width:65%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">X/A</td> <td>Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/297582338?sat=17&satkey=24217801></td> <td align="center">1-7/8-11</td> </tr> <tr> <td align="center">P,X</td> <td>Takanori NIHIRA et al., "Bacillus selenitireducens Yurai 2-O-α-D-Glucosylglycerol Phosphorylase no Hakken", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2013 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2013 (05.03.2013), 2C16p01</td> <td align="center">1-11</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X/A	Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/297582338?sat=17&satkey=24217801 >	1-7/8-11	P,X	Takanori NIHIRA et al., "Bacillus selenitireducens Yurai 2-O-α-D-Glucosylglycerol Phosphorylase no Hakken", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2013 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2013 (05.03.2013), 2C16p01	1-11
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X/A	Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/297582338?sat=17&satkey=24217801 >	1-7/8-11									
P,X	Takanori NIHIRA et al., "Bacillus selenitireducens Yurai 2-O-α-D-Glucosylglycerol Phosphorylase no Hakken", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2013 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2013 (05.03.2013), 2C16p01	1-11									
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>							
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>										
<p>Date of the actual completion of the international search 30 January, 2014 (30.01.14)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 10 February, 2014 (10.02.14)</p>									
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>									
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/082768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-210925 A (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 11 August 2005 (11.08.2005), & US 2007-0154996 A1 & GB 002425533 A & WO 2005/073392 A1	1-11
A	T. Yamamoto et al., Acceptor recognition of kojibiose phosphorylase from <i>Thermoanaerobacter brockii</i> : syntheses of glycosyl glycerol and myo-inositol, <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> , 2006.05.30, 101(5), pp. 427-433	1-11
A	C. Goedl et al., A High-Yielding Biocatalytic Process for the Production of 2-O-(alpha-d-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a Natural Osmolyte and Useful Moisturizing Ingredient, <i>Angewandte Chemie International Edition</i> , 2008.11.21, 47(52), pp. 10086-10089	1-11

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/12(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/00(2006.01)i</p>										
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/12, C12N15/09, C12P19/00</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2014年									
日本国実用新案登録公報	1996-2014年									
日本国登録実用新案公報	1994-2014年									
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI (Thomson Innovation)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/ A</td> <td>Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/297582338?sat=17&satkey=2421780 1></td> <td>1-7/ 8-11</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X/ A	Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/297582338?sat=17&satkey=2421780 1>	1-7/ 8-11		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X/ A	Bacillus selenitireducens MLS10 chromosome, complete genome, NC_014219 REGION: 3048904..3051189. [online]. 2012-12-22. NCBI. [retrieved on 2014-01-27]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/297582338?sat=17&satkey=2421780 1>	1-7/ 8-11								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日 30.01.2014</p>	<p>国際調査報告の発送日 10.02.2014</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 佑一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 5 3 7 4</p>								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	仁平高則, 外 6 名, Bacillus selenitireducens 由来 2-0- α -D-グルコシルグリセロール ホスホリラーゼの発見 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 2013. 03. 05, 2C16p01	1-11
A	JP 2005-210925 A (株式会社林原生物化学研究所) 2005. 08. 11 & US 2007-0154996 A1 & GB 002425533 A & WO 2005/073392 A1	1-11
A	T. Yamamoto et al., Acceptor recognition of kojibiose phosphorylase from Thermoanaerobacter brockii: syntheses of glycosyl glycerol and myo-inositol, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006. 05. 30, 101(5), pp. 427-433	1-11
A	C. Goedl et al., A High-Yielding Biocatalytic Process for the Production of 2-0-(α -d-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a Natural Osmolyte and Useful Moisturizing Ingredient, Angewandte Chemie International Edition, 2008. 11. 21, 47(52), pp. 10086-10089	1-11